JEFFERSON GONÇALVES PINHEIRO SILVA

Estudo em biorreator e análise de fluxos metabólicos em cepas recombinantes de *Burkholderia sacchari* na conversão de xilose e ácido hexanóico em copolímero poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato [P(3HB-co-3HHx)]

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2020

JEFFERSON GONÇALVES PINHEIRO SILVA

Estudo em biorreator e análise de fluxos metabólicos em cepas recombinantes de *Burkholderia sacchari* na conversão de xilose e ácido hexanóico em copolímero poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato [P(3HB-co-3HHx)]

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2020

RESUMO

O impacto ambiental de produtos de origem petroquímica, como os plásticos, têm levado à busca por materiais similares que sejam ambientalmente corretos e possam ser produzidos a partir de fontes renováveis. Uma alternativa são os polihidroxialcanoatos (PHA), uma família de poliésteres termoplásticos ou elastoméricos, biodegradáveis e biocompatíveis, acumulados por algumas bactérias. A incorporação e a modulação de monômeros variáveis à estrutura dos PHA apresentam potencial para o desenvolvimento de novos materiais para aplicações médicas. A literatura e patentes recentes apontam copolímeros de poli-3-hidroxiбутirato-co-3-hidroxihexanoato (3HB-co-3HHx) como produtos de grande potencial nesta área. Foram construídos, no laboratório de Bioprodutos do Instituto de Ciências Biomédicas-USP, recombinantes da bactéria *Burkholderia sacchari*, abrigando genes de *Aeromonas sp.*, com o objetivo de se ter um organismo seguro capaz de produzir altos teores do copolímero. Este trabalho estudou aspectos da produção do copolímero 3HB-co-3HHx a partir de xilose e ácido hexanóico, por esses recombinantes, para dar subsídios à produção deste material com diferentes teores de 3HHx, potencialmente capazes de conferir variações nas propriedades e aplicações deste. Analisaram-se os perfis desses recombinantes, frente ao consumo de xilose e ácido hexanóico, para propor alternativas metabólicas para o aprimoramento no consumo de xilose por esses mutantes a partir da análise de fluxos metabólicos. A xilose foi selecionada como principal fonte de carbono por ser uma pentose oriunda de hidrolisados hemicelulósicos do bagaço de cana-de-açúcar que se apresenta como um resíduo da produção de etanol de segunda geração. Foram testados seis recombinantes, abrigando os genes P, C e J de *Aeromonas sp.* ou *Aeromonas hydrophila*, em frascos agitados, selecionando-se o recombinante *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* para ensaios em biorreator. Esses experimentos, em meio de cultura contendo xilose mais ácido hexanóico como fontes de carbono, permitiram delimitar: a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}=0,18 \text{ h}^{-1}$), a eficiência de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3\text{HB}/\text{xil}}=0,40 \text{ g.g}^{-1}$) e a eficiência de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3\text{HHx}/\text{AHex}}=0,89 \text{ g.g}^{-1}$), este último maior do que dados reportados na literatura. Foram propostas e aplicadas condições para experimentos visando modular o teor de 3HHx no copolímero a partir de xilose e ácido hexanóico em biorreator. As células foram capazes de acumular entre 35 a 64% da biomassa na forma de PHA. Os teores de 3HHx nos copolímeros variaram de 10 mol% a 40mol %, mostrando que é possível controlar a composição monomérica e as propriedades do material. Os valores obtidos foram superiores a experimentos da literatura com glicose e ácido hexanóico. Finalmente, utilizaram-se os programas *Metatool* e *Matlab* para análise preliminar de fluxos metabólicos, sendo observada a necessidade de se melhorar a produção de poder redutor (NADPH) pela célula.

Palavras chave: Poli (3-hidroxiбутirato-co-3-hidroxihexanoato). Copolímeros biodegradáveis. Xilose. *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*. Ensaios em biorreator. Análise de fluxos metabólicos.

ABSTRACT

The environmental impact of products of petrochemical origin, such as plastics, has led to the search for similar materials that are environmentally friendly and can be produced from renewable sources. An alternative is the polyhydroxyalkanoates (PHA), a family of thermoplastic or elastomeric polyesters, biodegradable and biocompatible, accumulated by some bacteria. The incorporation and modulation of variable monomers to the PHA structure present potential for the development of new materials for medical applications. Recent literature and patents have reported poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate copolymers (3HB-co-3HHx) as products of great potential in this area. *Burkholderia sacchari* recombinants, harboring *Aeromonas* sp. genes, were constructed in the laboratory of Bioproducts of the Institute of Biomedical Sciences-USP, with the objective of having a safe organism capable of producing high levels of the copolymer. This work studied some aspects of the production of 3HB-co-3HHx from xylose and hexanoic acid, by these recombinants, to subsidize the production of this material with different levels of 3HHx, potentially conferring improved properties to the copolymer and widening its applications. Recombinants profiles in xylose and hexanoic were analyzed, to propose metabolic alternatives to improve xylose consumption based on metabolic flux analysis. Xylose was selected as the main carbon source due to the fact that, besides being a significant component of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates, it is a residue of second generation ethanol production. Six *B. sacchari* recombinants, harboring genes P, C and J from *Aeromonas* sp. or *Aeromonas hydrophila*, were tested shaken flasks; recombinant *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2 :: *phaPCJ*_{Asp} was selected for bioreactor experiments. The parameters delimited were: the maximum specific growth rate ($\mu_{\max} = 0,18 \text{ h}^{-1}$), the efficiency in converting xylose to 3HB monomers ($Y_{3\text{HB} / \text{xil}} = 0,40 \text{ g.g}^{-1}$), the efficiency in converting hexanoic acid to 3HHx monomers ($Y_{3\text{HHx} / \text{AHex}} = 0,89 \text{ g.g}^{-1}$) in culture medium containing xylose plus hexanoic acid as carbon sources. Conditions were proposed and applied in order to modulate 3HHx content in the copolymer. Cells were able to accumulate from 35 to 64% of cell dry biomass as PHA. 3HHx content in the copolymers ranged from 10 mol% to 40 mol%, evidencing the possibility of controlling monomers composition and thus polymer properties. Moreover, those figures were higher than previous values from the literature. Finally, *Metatool* and *Matlab* programs were tested as a preliminary analysis of metabolic fluxes, indicating the need for the cell to improve reducing power production (NADPH).

Keywords: Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Biodegradable copolymers. Xylose. *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2 :: *phaPCJ*_{Asp}. Bioreactor tests. Analysis of metabolic transfers.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nas décadas recentes, devido ao impacto ambiental do uso de plásticos de origem petroquímica, de difícil degradação, diversas alternativas vêm sendo estudadas para se produzirem materiais dotados das mesmas propriedades, que sejam menos danosos ao meio ambiente. Uma dessas alternativas são os polihidroxialcanoatos (PHA), que constituem uma classe de ésteres poliméricos, presentes tanto em procariotos quanto em eucariotos, porém, a quantidade detectada nesses últimos é considerada baixa, quando comparada à capacidade em que os procariotos têm em acumular até 80% de sua biomassa na forma de PHA (SILVA et al., 2001, SILVA et al., 2007, SILVA et al., 2014). O poli β -hidroxibutirato (PHB) foi o primeiro tipo de PHA descoberto, em 1923 por Lemoigne (GOMEZ, 1994), tendo sido inicialmente utilizado como um dado adicional na identificação bacteriana. A partir da década de 1980, suas propriedades termoplásticas foram detectadas e, com isso, surgiu o interesse na sua produção em maior escala (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

O acúmulo de PHA por bactérias ocorre em forma de grânulos citoplasmáticos. Nos microrganismos, os PHA constituem uma reserva de carbono, energia e equivalentes redutores, tendo sido reportado seu envolvimento em processos de resistência à pressão osmótica, a proteção da célula contra a dessecação e a ação dos raios ultravioleta (UV) (BRANDL et al, 1990). Para que o microrganismo seja capaz de acumular o biopolímero de modo mais expressivo, em geral, é necessário que no meio de cultivo haja excesso da fonte de carbono e a limitação simultânea de ao menos um nutriente essencial a sua multiplicação, como nitrogênio, fósforo, oxigênio e etc. (LAFFERTY et al., 1988; BRANDL et al., 1990).

Além de serem termoplásticos, ou seja, poderem ser conformados e moldados sob ação do calor (SILVA et al., 2004), PHA são biocompatíveis e assim podem ser empregados em procedimentos cirúrgicos, sem que haja rejeição do órgão ou tecido, e na produção de cápsulas para liberação controlada de fármacos (SILVA et al., 2001), entre outras aplicações médico-farmacêuticas. São biodegradáveis por fungos e bactérias, quando descartados no meio ambiente, liberando como produtos CO₂ e água (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995). Em meio intracelular, a degradação ocorre por meio de enzimas denominadas PHA

despolimerases e é realizada em todos os microrganismos que possuem a capacidade de acumular esse polímero naturalmente (GOMEZ, 1994). Uma vantagem industrial e ambiental dos PHA é que podem ser produzidos a partir de matérias-primas de baixo custo econômico e de fontes renováveis, como carboidratos, óleos vegetais e até mesmo a partir de resíduos agroindustriais (SILVA et al., 2007, SILVA et al., 2014).

Diversos estudos foram realizados para buscar no meio ambiente bactérias com bom potencial de produção de PHA, destacando-se neste trabalho *Burkholderia sacchari*, isolada no Brasil a partir de solo de canavial (GOMEZ et al., 1996, BRÄMER et al., 2001, ALEXANDRINO et al., 2015) sendo capaz de produzir até 80% da biomassa na forma de PHA. Esta bactéria mostrou-se promissora para uso industrial, sendo alvo de patente (SILVA;GOMEZ.,2013), tendo sido utilizada em estudos recentes e proposta como plataforma biológica para a expressão de genes de outras vias envolvidos na produção de PHA, visando obter PHA com composição monomérica variável, o que implica na diversificação de propriedades físico-químicas e, portanto, ampliando suas aplicações, diretamente dependentes dessa composição monomérica, como apresentado mais adiante (GOMEZ et al., 1996, SILVA et al., 2000, BRÄMER et al., 2001, 2002, SILVA et al., 2004, PEREIRA et al., 2009; LOPES et al 2009; 2011, MENDONÇA et al., 2013; SILVA et al., 2015; MENDONÇA et al., 2016, NASCIMENTO et al., 2016). Os monômeros constituintes dos PHA podem ser hidroxialcanoatos dotados de estrutura química de cadeia curta (SCL), contendo 3-5 átomos de carbono, ou ainda, monômeros de cadeia média (MCL), com 6-12 carbonos. Copolímeros contendo mais de um monômero diferente podem ser formados a depender da especificidade da PHA sintase, enzima responsável pela esterificação dos monômeros. Quatro classes de PHA sintases foram descritas e, de modo geral, têm especificidade ou para monômeros SCL ou MCL, sendo difícil incorporar percentuais equivalentes de ambos (MADISON; HUISMAN, 1999; RHEM 2003). Este aspecto é relevante, já que, a variedade da composição monomérica determina as propriedades mecânicas do polímero e, conseqüentemente suas aplicações. A partir de carboidratos como xilose ou sacarose, o PHA produzido é o 3HB cristalino e quebradiço, com limitadas aplicações (SUDESH et al., 2000). A inserção de outros monômeros na cadeia, como 3-hidroxivalerato (3HV), 4-hidroxibutirato (4HB), ou especialmente monômeros de cadeia média (mcl-HA) com 6 (3- hidroxihexanoato, 3HHx) ou mais

átomos de C confere maior elasticidade aos PHA. O copolímero P (3HB-co-3HHx) exibe uma flexibilidade adequada para muitos usos, com propriedades mecânicas similares ao polietileno de baixa densidade, tornando-se mais flexível com o aumento do teor de 3HHx. Atualmente, várias empresas estão investindo na produção deste copolímero. A Kaneka no Japão e Bélgica produzem a AONILEX®, a base de 3HB-co-HHx. A Meredian, Ga, USA, inaugurou recentemente o que parece ser a maior instalação de produção de PHA, principalmente dos copolímeros (PHB-co-HHx) P (3HB-co-3HO, 3HO:3-hidroxiocetanoato) e (3HB-co-3HOD, 3HOD: 3-hidroxiocetadecanoato), com uma capacidade anual de cerca de 300.000 toneladas. O uso de 3HB-co-3HHx tem sido reportado na área médica (tecidos cartilaginosos, suporte para a proliferação de células ósseas e musculares) (LIZARRAGA-VALDERRAMA et al., 2015). 3HB-co-3HHx é naturalmente produzido por bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas*, (*A. caviae* e *A. hydrophila*) a partir de óleos vegetais ou ácidos graxos com uma incorporação de 5 a 25 % molar de 3HHx (DOI et al., 1995; Lu et al., 2005). No entanto, a porcentagem (m/m) em copolímero é geralmente baixa e a separação das células é difícil devido à elevada viscosidade do meio decorrente da fonte de C utilizada. *B. sacchari* demonstrou ser capaz de acumular cerca de 60 % de PHB a partir de hidrolisados lignocelulósicos (SILVA et al., 2004; CESÁRIO et al., 2014) e de sintetizar 3HB-co-3HHx a partir de glicose e ácido hexanóico (MENDONÇA et al., 2012, MENDONÇA et al., 2013, MENDONÇA et al., 2014) com uma incorporação de cerca de 2 % de 3HHx. De modo a aumentar a incorporação dos monômeros de 3HHx na cadeia polimérica, foram construídos recombinantes de *B. sacchari* com genes de *A. hydrophila* ou genes de *Ralstonia eutropha* envolvidos na síntese de PHA, tendo-se obtido 10 a 15 vezes maior teor de HHx no copolímero, modulando o teor de 3HHx no PHA (MENDONÇA, 2009; MENDONÇA et al., 2012; MENDONÇA et al., 2013 a, b; TAVARES et al., 2012; MENDONÇA et al., 2017).

Em projeto finalizado no nosso laboratório (FAPESP BeBasic, processo 2012/51533-6), em colaboração com a empresa ChainCraft, B. V. (<http://www.chaincraft.nl/home-en/>), esta desenvolveu um processo em que, a partir de resíduos agro-alimentícios, gerou uma mistura de ácidos graxos de cadeia média (MCFA) especialmente desenhada para alimentar os recombinantes construídos, que foram testados nessa mistura de MCFA em presença de glicose

(Mendonça et al., artigo em preparação).

No Brasil, com o desenvolvimento de etanol de 2ª geração e a incapacidade de leveduras fermentarem a xilose a etanol de modo eficiente, há a perspectiva de haver grandes quantidades de xilose disponíveis para gerar outros produtos (SILVA et al., 2015). Embora diversas iniciativas tenham sido anunciadas, dados científicos ainda são escassos. Biopolímeros da família dos PHA tem sido um dos bioprodutos modelo de estudo empregando diversos derivados de biomassa.

Neste contexto, este trabalho de mestrado se propõe a avaliar linhagens de *B. sacchari* construídas por Mendonça 2014, abrigando genes do operon *phaPCJ* de *Aeromonas* sp.

7 CONCLUSÃO

Ensaio em frascos agitados com recombinantes de *B. sacchari* permitiram verificar o acúmulo de 3HB-co-3HHx a partir de xilose e ácido hexanóico. Os parâmetros experimentais obtidos nesses ensaios para o consumo de ácido hexanóico e síntese de 3HHx foram similares aos valores reportados por MENDONÇA (2014). Em relação aos parâmetros experimentais referentes ao fornecimento de xilose, os valores obtidos foram próximos reportados por LOPES (2010).

Cultivos em biorreator foram realizados com a linhagem selvagem *B.sacchari* LFM 101 e o recombinante *B.sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*. Esses ensaios indicaram que entre as limitações avaliadas (fósforo ou nitrogênio), o acúmulo de PHA é mais eficiente quando o cultivo é limitado em nitrogênio, para ambas as linhagens. Em relação à metabolização de xilose e sua conversão em P3HB, a linhagem selvagem se demonstrou mais eficiente.

Ensaio em biorreator com o fornecimento de xilose e ácido hexanóico foram realizados apenas com a linhagem recombinante *B.sacchari* LFM 344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* com o objetivo de se controlar a composição molar de 3HHx no copolímero total produzido (3HB-co-3HHx). A composição do copolímero (3HB-co-3HHx) produzido pela linhagem recombinante *B.sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* pode ser modulada pela relação xilose/ácido hexanoico fornecida, atingindo valores iguais a 40 mol % de 3HHx. Esses valores são o dobro dos dados obtidos na literatura, quando glicose e ácido hexanóico são fornecidos. Foram obtidos teores poliméricos (3HB-co-3HHx) entre 51 a 64 % da massa seca celular. Também foram alcançados fatores de conversão de xilose a 3HB (entre 0,26 e 0,40 g.g⁻¹) e ácido hexanóico a 3HHx (entre 0,54 e 0,89 g.g⁻¹).

Foram analisados os períodos pseudo-estacionários de produção de polímeros 3HB e 3HB-co-3HHx, verificando-se um balanço de carbono entre 93 e 105%.

Nos períodos pseudo-estacionários investigados, a eficiência de conversão do ácido hexanoico em 3HHx correspondeu a 90%, isso é relevante, já que a literatura mostra que esses valores estavam anteriormente em torno 50% do máximo teórico para a linhagem *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*. A eficiência de conversão da xilose em monômeros de 3HB variou entre 54 a 83% do máximo teórico. Observou-se menores valores de conversão de xilose em 3HB em copolímeros com frações maiores frações molares de 3HHx.

A partir dos resultados dos dados experimentais e da análise preliminar dos fluxos metabólicos, foi possível obter um bom ajuste ao modelo metabólico proposto (Balanço de carbono entre 93-105%). De acordo com os modelos, para aumentar a conversão de intermediários em 3HB a partir de xilose, haveria necessidade de maiores teores de poder redutor (NADPH). Nesses modelos observa-se que há um fluxo igual a zero na reação catalizada por uma das transidrogenases de membrana (PNTAB). O aumento nesse fluxo poderia ser considerado como uma forma de promover um maior acúmulo, uma hipótese a ser mais bem discutida. Análises futuras e mais aprofundadas sobre o catabolismo de xilose poderão demonstrar alternativas mais eficazes na conversão dessa fonte de carbono em monômeros de 3HB.

REFERÊNCIAS

Alexandrino, P. M. R., Mendonça, T. T., Bautista, L. P. G., Cherix, J., Lozano-Sakalauskas, G. C., Fujita, A., ... & Gomez, J. G. C. (2015). Draft genome sequence of the polyhydroxyalkanoate-producing bacterium *Burkholderia sacchari* LMG 19450 isolated from Brazilian sugarcane plantation soil. **Genome Announc.**, 3(3), e00313-15.

ANDERSON, A. J., & DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v. 54, n.4, p. 450–472, 1990

BAJPAI, P. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production. 2016.

BATISTA, LINDA PRISCILA GUMÀN. Clonagem e super expressão dos genes do catabolismo de xilose em *Burkholderia Sacchari* e avaliação do seu efeito na repressão catabólica e produção de polihidroxibutirato a partir de açúcar hemicelulósicos. Tese (Doutorado em Microbiologia). São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 2016.

biodegradable plastics from
bacterial cells <http://www.bioeconomia.mincyt.gob.ar/wp-content/uploads/2014/12/3.-Producción-de-plásticos-biodegradables-a-partir-de-bacterias-L.-Ferreira-Da-Silva.pdf>

BOCANEGRA, Johanna Katherine et al. Influence of pH on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyric acid (P3HB) produced by recombinant *Escherichia coli*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1336-1347, 2013.

BRÄMER, C. O. et al. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1709–1713, 2001.

BRÄMER, C. O. et al. Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101T and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 1, p. 271-279, 2002.

Brandl, Helmut; Gross, R.A., Lenz, R. W. . Plastics from bacteria and for bacteria: poly (β - hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Microbiopro.* **Springer Berlin Heidelberg**, 1990; 77-93.

BUFFONI, E. Avaliação da composição de polímeros biodegradáveis produzidos por *Burkholderia sacchari* a partir de diferentes substratos. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) –Instituto de Pesquisas Tecnológicas –Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CABALLERO, R.C, KAREL, S.F., REGISTER, R. Biosynthesis and characterization of hydroxybutyrate-hydroxycaproate copolymers. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 17, p. 86-92, 1995.

CARERE, C. R. et al. Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1342–1360, 2008.

CESÁRIO, M. T.; RAPOSO, R. S.; ALMEIDA, M. C. M. D.; KEULEN, F. V.; FERREIRA, B. S.; TELO, J. P.; FONSECA, M. M. R. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Burkholderia sacchari* using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. *Int. J. Biol. Macromol.* DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054 0141-8130, 2014.

CHANDRA, R. P. et al. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, n. May, p. 67–93, 2007.

DAHMS, A. S. 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 60, n. 4, p. 1433-1439, Oct 1974. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4423285> >

DENNIS, D.E. Expression of polyhydroxyalkanoates in recombinant bacteria. In: International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Montreal, Canada. Abstract. n. p., 1994.

DESVaux, M. *Clostridium cellulolyticum*: Model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 741–764, 2005.

DOI, Y. KITAMURA, S. ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly (3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v. 28, p. 4822-4828, 1995.

FILHO, EDMAR RAMOS DE OLIVEIRA. Melhoramento da eficiência de conversão de xilose e co-substratos em copolímeros híbridos P (3HB-co-3HAMCL) por *Burkholderia sacchari*. Tese em desenvolvimento. São Paulo. 2017-2021.

Gomez, J. G. C. Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de Polihidroxialcanoatos. Tese (Mestrado em Biotecnologia)- São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1994.

GOMEZ, J. G. C. et al. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 6, p. 785–791, 1996.

GRANSTRÖM, Tom Birger; IZUMORI, Ken; LEISOLA, Matti. A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 273, 2007.

GROSS, R. A., BRANDL, H.; ULMER, H. W.; POSADA, M. A.; FULLER, R. C.; LENZ, R. W. The biosynthesis and characterization of new poly(P-hydroxyalkanoates). **Polymer Prepr.**, v. 30, p. 492-493, 1989.

HAHN-HAEGERDAL, B., KARHUMAA, K., JEPPSSON, M., GORWA-GRAUSLUND, M.F. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofuels*, v. 108, p. 147-177, 2007. ISSN 0724- 6145. Disponível em: < ://WOS:000250578300006 >.

HEATHMAN, T. R. J.; WEBB, W. R.; HAN, J.; DAN, Z.; CHEN, G. Q.; FORSYTH, N. R.; EL HAJ, A. J.; ZHANG, Z. R.; SUN, X. Controlled production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHX) nanoparticles for targeted and sustained drug delivery. **Pharmaceutical Nanotechnology**. DOI 10.1002/jps.24035, 2014.

HÖFFNER, K.; HARWOOD, S.; BARTON, P. A reliable simulator for dynamic flux balance analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 3, p. 792-802, 2013. ISSN 1097-0290.

JIANG, G. et al. Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery. **International Journal of Molecular Sciences**.v. 17, n.7, 2016.

K.; GOMEZ, J. G. C.; SILVA, L. F. Draft Genome Sequence of the Polyhydroxyalkanoate- Producing *Bacterium Burkholderia sacchari* LMG 19450 Isolated from Brazilian Sugarcane Plantation Soil. **Genome Announcement**. 3(3): 1-2, 2015.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 137-145, 2004.

KAHAR, P.; TSUGE, T.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. High yield of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Pol. Deg. Stab.**, v. 83, p. 79-86, 2004.

Kabus, Armin, et al. "Expression of the *Escherichia coli* *pntAB* genes encoding a membrane-bound transhydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* improves L-lysine formation." **Applied microbiology and biotechnology** 75.1 (2007): 47-53.

Kämäräinen, Jari, et al. "Pyridine nucleotide transhydrogenase PntAB is essential for optimal growth and photosynthetic integrity under low-light mixotrophic conditions in *Synechocystis* sp. *PCC 6803*." **New Phytologist** 214.1 (2017): 194-204.

KICHISE, T., FUKUI, T., YOSHIDA, Y. , DOI, Y. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 69-77, 1999.

KICHISE, T.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Enhanced accumulation and changed monomer composition in polyhydroxyalkanoate (PHA) copolyester by in vitro evolution of *Aeromonas caviae* PHA synthase. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2411–2419, maio 2002.

LAFFERTY, R. M.; KORSATKO, B.; KORSATKO, W. Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. **Biotechnology**, v. 6, n. 66, p. 135-176, 1988.

LEE, G. N.; NA, J. FUTURE OF MICROBIAL POLYESTERS. **MICROBIAL CELL FACTORIES**, V. 12, P. 1-4. 2013.

LÍCIO, D.C.P.; GOMEZ, J.G.C.; SILVA, L.F. Avaliação da produção de PHA por linhagens bacterianas isoladas de amostra de lodo de esgoto. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17., 2-5 ago. 2009, Natal. Anais... Natal- RN: UFRN, 2009.

LIU, W. et al. Engineering of the xylose metabolic pathway for microbial production of bio-based chemicals. *Sheng wu gong cheng xue bao Chinese journal of biotechnology*, v. 29, n. 8, p. 1161-1172, 2013. ISSN 1000-3061.

LIZARRAGA-VALDERRAMA, L. R.; NIGMATULLIN, R.; TAYLOR, C.; HAYCOCK, J. W.; CLAEYSSSENS, F.; KNOWLES, J. C.; ROY, I. Nerve tissue engineering using blends of poly(3- hydroxyalkanoates) for peripheral nerve regeneration. *Eng. Life Sci.*, 15, 612–621, 2015.

LOMAS, A.J., CHEN, G.Q ., HAJ, A. J.E., FORSYTH, N.R. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) supports adhesion and migration of mesenchymal stem cells and tenocytes *World J. Stem Cells*, v. 4, p. 94-100, 2012.

Lopes, M.S.G.; Rocha, R. C. S.; Zanotto, S. P.; Gomez, J. G. C.; Silva, L. F. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. **World J Micro Biotech**. 2009; v.25, p.1751– 1756.

Lopes, M.S.G.; Produção de plásticos biodegradáveis utilizando hidrolizado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

LOPES, M. S., GOSSET, G., ROCHA, R. C., GOMEZ, J. G. C., SILVA, L. F. PHB biosynthesis in catabolite repression mutant of *Burkholderia sacchari*. **Curr Microbiol**, v. 63, n. 4, p. 319-326, Oct 2011.

LU, X.; ZHANG, W.; JIAN, J.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Molecular cloning and functional analysis of two polyhydroxyalkanoate synthases from two strains of *Aeromonas hydrophila* spp. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 24, p. 149–155, 2005.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 21-53, 1999.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Bioquímica básica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 3ª ed., 2011. 386 p.

Mendonça, T. T. Avaliação do potencial de *Burkholderia Sacchari* produzir o copolímero biodegradável Poli (3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxihexanoato)[P(3HB-co-3HHx)]. Tese (Mestrado em Microbiologia)-São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

MENDONÇA, THATIANE TEIXEIRA; Cabrera; BUFFONI, Ernesto ; RODRIGUEZ, RUBEN SÁNCHEZ ; SCHRIPSEMA, JAN ; Lopes, Mateus Schreiner Garcez ; Silva, Luiziana Ferreira . Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology (Print) JCR**, v. 1, p. n/a-n/a, 2013.

MENDONÇA, T. T. ESTUDO DE BACTÉRIAS RECOMBINANTES E ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS PARA A BIOSÍNTESE DO COPOLÍMERO BIODEGRADÁVEL POLI(3- HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIHEXANOATO) [P(3HB-co-3HHx)]. **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. 255, 2014.

MENDONÇA, T. T. Estudo de bactérias recombinantes e análise de fluxos metabólicos para a biossíntese do copolímero biodegradável poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) [P(3HB-co-3HHx)]. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo

MENDONÇA, T. T. et al. Combining molecular and bioprocess techniques to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with controlled monomer composition by *Burkholderia sacchari*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 654–663, 2017.

MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna; POKOJ, Tomasz. Exploring nutrient limitation for polyhydroxyalkanoates synthesis by newly isolated strains of *Aeromonas sp.* using biodiesel-derived glycerol as a substrate. **PeerJ**, v. 6, p. e5838, 2018.

MURUGAN, Paramasivam et al. Production of P (3HB-co-3HHx) with Controlled Compositions by *Recombinant Cupriavidus necator Re2058/pCB113* from Renewable Resources. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 44, n. 9, p. 1234-1241, 2016.

NASCIMENTO, VALKIREA MATOS ; Silva, Luiziana Ferreira ; GOMEZ, José Gregório Cabrera ; FONSECA, GUSTAVO GRACIANO . Growth of *Burkholderia sacchari* LFM 101 cultivated in glucose, sucrose and glycerol at different temperatures. **Scientia Agricola JCR**, v. 73, p. 429- 433, 2016.

NEIDHARDT, Frederick Carl; INGRAHAM, John L.; SCHAECHTER, Moselio. Physiology of the bacterial cell: a molecular approach. Sunderland, MA: **Sinauer Associates**, 1990.

PAN, W. et al. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 459–469, 2012.

PEREIRA, EM, SILVA-QUEIROZ, SR, GOMEZ, JGC, SILVA, LF .Disruption of the 2-methylcitric acid cycle and evaluation of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate biosynthesis suggest alternate catabolic pathways of propionate in *Burkholderia sacchari*. **Can. J. Microbiol.**, v. 55, p. 688-697, 2009.

PFEIFFER, Thomas et al. METATOOL: for studying metabolic networks. **Bioinformatics**, v. 15, n.

PRADELHA, F. et al. Flux balance analysis of mixed microbial cultures: application to the production of polyhydroxyalkanoates from complex mixtures of volatile fatty acids. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 336-345, 2012. ISSN 0168-1656.

QU, X. H.; WU, Q.; LIANG, J.; ZOU, B.; CHEN, G. Q. Effect of 3-hydroxyhexanoate content in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on in vitro growth and differentiation of smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, p. 2944–2950, 2006.

RADECKA, I. et al. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**. V. 102, n. 6, P. 1437–1449, 2007

RAICHER, GIL. Analise Econômica da produção de Polímeros Biodegradáveis no contexto de uma Biorefinaria a partir da cana-de-açúcar. Tese (Doutorado em Biotecnologia). São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 2010.

RAPOSO, R. S. et al. A *Burkholderia sacchari* cell factory: production of poly-3-hydroxybutyrate, xylitol, and xylonic acid from xylose-rich sugar mistures. **New Biotechnology**. V.34, p. 12-22, 2016

RHEM Bernd, H. A. "Polyester synthases: natural catalysts for plastics." **Biochemical Journal** 376.1 (2003): 15-33.

RHEM,HJ,REED,G.(eds) Biotechnology. **Weinheim:VCH**, 1988; V.6b,p.136-176.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass-ester hydrochloric acid propanolysis. **J. Chromatogr.**, v. 445, p. 285-289, 1988.

ROCHA, Rafael CS et al. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P (3HB- co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 427-431, 2008.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

Santos, Amélia SF, José Augusto M. Agnelli, and Sati Manrich. "Tendências e desafios da reciclagem de embalagens plásticas." **Polímeros: Ciência e Tec.** 2004;14.5: 307-312.

SCHMIDELL, Willibaldo et al. Biotecnologia industrial-vol. 2: engenharia bioquímica. **Editores Blucher**, 2001.

SILVA, S. S. et al. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros**, v. 8, n. 2, p. 25–33, 1998.

SILVA, L. F. et al. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 2–3, p. 165–174, 2000.

SILVA, L. F. et al. Poly-3-hydroxybutyrate (3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 245–254, 2004.

Silva, L. F.; Gomez, J. G. C. Produção biotecnológica de PoliHidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**. 2007; v. 30, n. 7, p. 1732-1743.

SILVA, L.F. & GOMEZ, J.G.C Processo de obtenção e mutante de *Burkholderia* sp mais eficiente na utilização de propionato para produção de copolímero biodegradável, PI 9806557-2 . . Concedida em 11/2013

SILVA, L. F. et al. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorrefineries associated with the production of sugar and ethanol. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 71, p. 2 – 7, 2014

SMITH, J.; VAN RENSBURG, E.; GÖRGENS, J. F. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. **BMC biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 41, 2014. ISSN 1472-6750.

SONG, S.; PARK, C. Utilization of d-ribose through d-xylose transporter. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, n. 2, p. 255-261, 1998. ISSN 1574-6968.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.128, p. 219-228, 1995.

STEPHANOPOULOS, George; ARISTIDOU, Aristos A.; NIELSEN, Jens. Metabolic engineering: principles and methodologies. **Academicpress**, 1998.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

TACIRO, Marilda Keico. Processo contínuo de produção de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHAMCL) sob limitação múltipla de nutrientes. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TAVARES, RR, MENDONÇA, TT, GOMEZ, JGC, CESPEDES, LG, SILVA, LF. 2012 Expression of *Aeromonas* sp. and *Ralstonia eutropha* Genes in Mutant *Burkholderia sacchari* for the Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate). International Symposium on Biopolymers ISBP 2012, Cairns, Australia, Abstracts, Oct7-10th , 2012.

VOLOVA, Tatiana G. et al. Synthesis of P (3HB-co-3HHx) copolymers containing high molar fraction of 3-hydroxyhexanoate monomer by *Cupriavidus eutrophus* B10646. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 2, p. 416-425, 2016.

Wei, Yu-Hong et al. Screening and Evaluation of Polyhydroxybutyrate- Producing Strains from Indiginous Isolate Cupriavidustaiwanensis Strains. **Int journal of Mol Scie**. 2011;V.12,p.

WEIMBERG, R. Pentose oxidation by *Pseudomonas fragi*. J Biol Chem, v. 236, p. 629-635, Mar 1961. ISSN 0021- 9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13783864> >.

WEN, Qinxue et al. Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 10, p. 1602-1607, 2010.

WHITE, D. The physiology and biochemistry of prokaryotes. New York: Oxford Univerty Press, 3^a ed., 2007. 628 p.

WU, Q.; WANG, Y.; CHEN, G.Q. Medical application or microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. Artif. Cells Blood Substit. Immobil. **Biotechnol.**, v. 8, p. 1-22, 2009.

WU, S; LIU, Y.L.; CUI, B.; QU, X. H.; CHEN, G. Q. Study on decellularized porcineaortic valve/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxuhexanoate) hybrid heart valve in sheep model. Artif. Organs., v. 30, p. 690-697, 2007.

YANG, M., ZHU, S., CHEN, Y. CHANG, Z., CHEN, G., GONG, Y., ZHAO, N., ZHAN, X. Studies on bone marrow stromal cells affinity of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Biomaterials**, v. 25, p.1365–1373, 2004.

YOGESH S. et al. Effect of pH and Temperature on Synthesis of Polyhdyroxyalkanoates from Dairy Waste Water. **International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)**, v. 3, p. 1081-1086,2014.

ZHANG, Mengxiao et al. Modification of acetoacetyl-CoA reduction step in *Ralstonia eutropha* for biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from structurally unrelated compounds. **Microbial cell factories**, v. 18, n. 1, p. 147, 2019.

ZHOU, H. et al. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 6, p. 611-622, 2012. ISSN 1096-7176.