Juliano Cherix

Avaliação de genes para o catabolismo de xilose e seu potencial para geração de bioprodutos

Dissertação 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
2015**

RESUMO

CHERIX, J. **Avaliação de genes para o catabolismo de xilose e seu potencial para geração de bioprodutos**. 2015. 140 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Recentemente, tem havido um grande esforço no país na obtenção de etanol de segunda geração (ou 2G) por via microbiana, tendo como matéria-prima o bagaço de cana-de-açúcar. Para ser metabolizado por microrganismos, este ou qualquer material lignocelulósico, necessita ser submetido à hidrólise, ácida ou enzimática, liberando a celulose e hemicelulose do complexo formado com a lignina, com posterior quebra dos polímeros de açúcares e liberação de uma mistura de hexoses e pentoses, principalmente glicose, xilose e arabinose. Ainda que a xilose seja um dos principais componentes da lignocelulose e o segundo açúcar mais abundante da natureza, a sua utilização eficiente ainda representa uma barreira técnica. Duas limitações para o consumo microbiano desta pentose têm sido destacadas: a repressão catabólica quando em mistura de açúcares e a ineficiência do consumo de xilose comparado com o consumo de glicose. Como a levedura produtora de etanol ainda não é capaz de utilizar eficientemente a xilose, caso apenas a glicose oriunda do bagaço seja utilizada para etanol 2G, estima-se como subproduto uma disponibilidade de xilose da ordem de 10^7 ton/ano. Assim, há necessidade de estudos para viabilizar seu uso para produzir etanol 2G ou outros produtos microbianos, como os biopolímeros da família dos polihidroxialcanoatos (PHA). Neste contexto, este trabalho foi proposto com objetivo principal de buscar por genes envolvidos no metabolismo de xilose que contenham modificações capazes de gerar enzimas mais eficientes no consumo deste açúcar, expressá-los em *Burkholderia sacchari*, uma grande produtora de PHA, avaliando os efeitos sobre o consumo desta pentose e seus impactos sobre a produção de biopolímeros da família dos PHA. Foram levantadas e comparadas *in silico* sequências da proteína xilose isomerase, produto do gene *xylA*, que transforma a xilose em xilulose, estabelecendo variações entre os diferentes grupos de bactérias presentes nas famílias *Enterobacteriaceae* e *Burkholderiaceae*. Com esta análise observou-se que na sua grande maioria as sequências são bem conservadas, a não ser para as bactérias *Photorhabdus luminescens* e *Enterobacter sp. Ag1* que apresentaram uma mutação indicada como melhoradora da atividade da enzima. A análise do draft do genoma de *B. sacchari* indicou que esta bactéria apresenta os genes *xylABFGH*, da via da xilose isomerase, orientados no mesmo sentido, e *xylR* orientado no sentido contrário. Observou-se que esta bactéria apresenta ainda quatro genes similares aos de outra via de metabolismo de xilose, a via de Weimberg, composta por cinco genes. Visando melhorar o consumo de xilose em *B. sacchari*, com base nesta análise preliminar foram então selecionados os seguintes genes codificadores de xilose isomerase, para serem nela inseridos e avaliados: *xylA_{Bc}* e *xylA_{Pl}*, respectivamente de *B. cenocepacia* e *Photorhabdus luminescens* e da própria *B. sacchari*, *xylA_{Bs}*, genes de *B.*

xenovorans (*xylA_{Bx}*) e de *B. phymatum* (*xylA_{Bp}*). Foi ainda sintetizado o gene de *B. sacchari* (*xylA**) no qual foram inseridas as seguintes modificações, descritas na literatura como capazes de aumentar a interação entre enzima substrato e a estabilidade da enzima, resultando no aumento do consumo de xilose em outros organismos: E15D, E114G, E129D, T142S, A177T e V433I. Assim, foram obtidos seis genes codificadores de xilose isomerase, incluindo o da própria *B. sacchari*, clonados em pBBR1MSC-2 que permitiram a construção de seis recombinantes de *B. sacchari*, além de um controle abrigando o vetor sem inserto. Estes recombinantes foram avaliados em experimentos em frascos agitados, medindo-se o consumo de xilose, produção de polihidroxialcanoatos e a atividade da enzima xilose isomerase. Os resultados indicaram que as medidas de atividade enzimática da xilose isomerase nos recombinantes de *B. sacchari*, abrigando os genes *xylA_{Bx}*, *xylA_{Bs}* e *xylA_{Bp}* tiveram um aumento de 113%, 52% e 39%, respectivamente, quando comparadas com a linhagem controle. Obteve-se um aumento na eficiência de conversão de xilose em P3HB de aproximadamente 30% para as linhagens recombinantes abrigando os genes *xylA_{Bs}*, *xylA** e *xylA_{Bc}*, e de 40% no caso daquelas abrigando os genes *xylA_{Bp}* e *xylA_{Bx}*, quando comparadas com a linhagem controle. As linhagens recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes *xylA_{Bs}* e *xylA** tiveram um aumento de aproximadamente 30%, e aquelas abrigando os genes *xylA_{Bp}* e *xylA_{Bx}* de 23%, no consumo de xilose quando comparadas com a linhagem controle. Essas quatro linhagens recombinantes foram aquelas que conseguiram produzir maior quantidade de PHB, aproximadamente 70% a mais do que linhagem controle. No caso da linhagem *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xylA_{Bc}* o aumento foi de aproximadamente 40%. Essa linhagem foi também aquela que teve maior eficiência de conversão de xilose em células, aproximadamente 22% a mais que a linhagem controle.

Palavras Chave: *Burkholderia sacchari*. Xilose. Polihidroxialcanoatos. Xilose isomerase. Via isomerase. P3HB.

ABSTRACT

CHERIX, J. **Evaluation of xylose catabolism genes and their potential for the generation of bioproducts.** 2015. 140 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Recently there has been a lot of effort in the country (Brazil) to obtain second-generation ethanol (or 2G) by microbial way using, as the main material, the sugarcane bagasse. In order to be metabolized by microorganisms, this or any lignocellulosic material needs to be subjected to hydrolysis, acid or enzymatic, freeing the cellulose and hemicellulose from the complex formed with the lignin, with subsequent breakdown of sugar polymers and the release of a mixture of hexoses and pentoses, especially glucose, xylose and arabinose. Although the xylose is one of the main components of lignocellulose and the second most abundant sugar in nature, its efficient use still represents a technical barrier. Two limitations to microbial consumption of the pentose have been discussed: the catabolite repression when in a mixture of sugars and the inefficient consumption of xylose compared with the consumption of glucose. Since the ethanol producing yeast still is not capable of efficiently using xylose, if only the glucose derived from the bagasse is used for 2G ethanol, it is estimated as a byproduct a xylose availability of 10^7 order tons / year. Thus, we need studies to enable its use to produce 2G ethanol or other microbial products such as biopolymers of the family of polyhydroxyalkanoates (PHA). In this context, this work was proposed with the main purpose of searching for genes involved in the metabolism of xylose that contains modifications able to generate more efficient enzymes in the consumption of this sugar, expressing them in *Burkholderia sacchari*, a major PHA producer, assessing the effects on the consumption of this pentose and its impacts on biopolymer production of the family of PHA. Sequences of the xylose isomerase protein, product of *xylA* gene, which is responsible for the transformation of xylose in xylulose, were raised and compared *in silico*, setting variations between different groups of bacteria in the *Enterobacteriaceae* and *Burkholderiaceae* families. This analysis showed that the majority of sequences are well maintained, except for the *Photorhabdus luminescens* and *Enterobacter sp. Ag1* bacteria that had a mutation indicated as improving the activity of the enzyme. The analysis of *B. sacchari* genome draft indicated that this bacteria has *xylABFGH* genes, the xylose isomerase pathway, facing the same way, and *xylR* oriented in the opposite direction. It was observed that this bacteria has 4 similar genes to another xylose pathway, the Weimberg's, composed of five genes. In order to improve the consumption of xylose in *B. sacchari*, based on this preliminary analysis, the following xylose isomerase codifying genes were selected to be inserted therein and evaluated: *xylA_{Bc}*, *xylA_{Pl}*, *xylA_{Bx}* and *xylA_{Bp}* respectively from *B. cenocepacia*, *P. luminescens*, *B. xenovorans* and *B. phymatum* and, *xylA_{Bs}*, from *B. sacchari*. The *B. sacchari* gene (*xylA**) was also synthesized and the following modifications were inserted as described in literature as capable of increasing the interaction between the enzyme and its substrate and enzyme stability, resulting in the increase of xylose consumption in other organisms: E15D, E114G, E129D, T142S, A177T V433I. Thus, six genes encoding xylose isomerase were obtained, including the one from *B. sacchari*. They were cloned

into pBBR1MSC-2 which allowed the construction of six *B. sacchari* recombinant strains, and a control harboring the empty vector. These recombinant strains were evaluated in shake flask experiments, measuring the xylose consumption, polyhydroxyalkanoates production and the activity of xylose isomerase enzyme. The results indicated that the enzymatic activity of xylose isomerase in the recombinant strains of *B. sacchari*, harboring either *xyIA_{Bx}*, *xyIA_{Bs}* or *xyIA_{Bp}* gene had an increase of 113%, 52% and 39%, respectively, compared to the control strain. An increase in the conversion efficiency of xylose in P3HB was obtained of approximately 30% for the recombinant strains harboring either *xyIA_{Bs}*, *xyIA** or *xyIA_{Bc}* gene and 40% for those harboring *xyIA_{Bp}* or *xyIA_{Bx}* gene, compared with the control strain. Recombinant strains harboring *xyIA_{Bs}* or *xyIA** gene had an increase of approximately 30%, and those harboring the gene *xyIA_{Bx}* or *xyIA_{Bp}* of 23%, in the xylose consumption compared to the control strain. These four recombinant strains were those that were able to produce greater quantities of P3HB, approximately 70% more than the control strain. In the case of the *B. sacchari* pBBR1MCS-2::*xyIA_{Bc}* strain, the increase was approximately 40%. This strain was also the one that had higher xylose conversion efficiency in cells, approximately 22% more than the control line.

Keywords: *Burkholderia sacchari*. Xylose. Polyhydroxyalkanoates. Xylose isomerase. Isomerase pathway. P3HB.

1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação acerca da depleção das reservas e oscilação dos preços do barril de petróleo, bem como as mudanças climáticas resultantes da geração de resíduos provenientes dessa matéria-prima, tem resultado em várias pesquisas que buscam por fontes energéticas seguras, de natureza renovável, com a finalidade de reduzir a dependência dos combustíveis fósseis (Jojima et al., 2010). Os materiais lignocelulósicos são os recursos orgânicos renováveis mais abundantes no planeta (Silva et al., 2004). Dentre esses materiais, a madeira e subprodutos agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar, a casca de arroz, a palha de milho e a serragem têm sido utilizadas para a produção de etanol (Doran-Peterson et al., 2008) e de polihidroxialcanoatos (PHA), uma família de polímeros para a geração de plástico biodegradável. (LOPES et al., 2014; SASAKI et al., 2008; SILVA et al., 2014).

Na procura de novas estratégias mais amigáveis com o meio ambiente, o uso do bioetanol tomou força na década dos anos 1970 (Goldemberg, 2008) e a tecnologia de produção a partir de biomassa começou a se desenvolver. Sendo líder na produção de açúcar refinado a partir de cana, o Brasil posicionou-se num bom lugar para explorar a opção do etanol como alternativa à gasolina. Como consequência do investimento a tecnologia tem melhorado consideravelmente, porém, ainda existe um excesso de bagaço de cana que não é utilizado para gerar energia e pode ser alvo na produção de outros compostos já que para atingir o máximo grau de eficiência tem que se garantir o uso dos açúcares presentes nesse bagaço (SILVA et al., 2014; WISSELINK et al., 2009).

Os bioplásticos são cada vez mais estudados e são propostos como uma alternativa para a substituição dos plásticos de origem petroquímica. Neste contexto, destacam-se os polihidroxialcanoatos (PHA) que compõem um grupo bastante diversificado de poliésteres acumulados por um grande número de bactérias (Hazer, Steinbüchel, 2007) e já que apresentam propriedades termoplásticas além de serem biodegradáveis e biocompatíveis estes são um dos focos das atenções da comunidade científica (AKARAONYE, 2010).

O PHA produzido a partir de hidrolisado de bagaço de cana tem sido proposto como uma alternativa viável para melhorar a eficiência das usinas de bioetanol (Albuquerque et al., 2007; Lopes et al., 2014; Silva et al., 2004; Silva et al., 2014) e um dos objetivos principais nesta área

da pesquisa é aumentar o fator de conversão dos açúcares do bagaço de cana em PHA, e já que a xilose é um dos polissacarídeos que está em maior porcentagem no bagaço, procura-se aumentar o rendimento de PHA a partir de xilose, sendo este um pré-requisito para a produção desse biopolímero num nível industrial.

Um dos principais fatores limitantes para a produção industrial deste poliéster natural é o elevado custo associado à fonte de carbono (Keenan et al., 2006). Por essa razão, têm sido feitos esforços para utilizar substratos de baixo custo como materiais lignocelulósicos renováveis. Duas plataformas são consideradas para a produção de PHA a partir subprodutos agrícolas e resíduos florestais: (1) hidrolisados celulósicos e hemicelulósicos que geram uma mistura de açúcares incluindo principalmente glicose, xilose e arabinose (Silva et al., 2004) ou (2) hidrolisados hemicelulósicos ricos em xilose (KEENAN et al., 2004; SILVA et al., 2014).

A xilose é um dos principais constituintes da matéria-prima nas abordagens descritas na literatura e o segundo açúcar mais abundante na natureza. No entanto a sua utilização eficiente apresenta barreiras técnicas para vários bioprocessos (Jeffries, 2006; Saha, 2003), incluindo a produção de etanol (Jeffries, Jin, 2004) e de PHA (SILVA et al., 2004).

6 CONCLUSÕES FINAIS

6.1 Análise de genes do metabolismo de xilose no draft do genoma de *B. sacchari*

A bactéria *Burkholderia sacchari* provavelmente consome xilose através da via isomerase composta pelos genes *xylABFGH*, orientados no mesmo sentido, e *xylR* orientado no sentido contrário.

Esta bactéria parece apresentar genes similares aos de outra via de metabolismo de xilose, a via de Weimberg, composta por 5 genes. Esta talvez pudesse se tornar ativa se complementada e aumentar a eficiência do consumo de xilose.

Esta bactéria não parece apresentar a via de metabolismo de xilose Oxidoredutase.

Pelo grande potencial apresentado pela enzima xilose isomerase, produto do gene *xylA*, e pelas dificuldades impostas pelo transportador do tipo ABC codificado pelo operon *xylFGH*, foi decidido dar ênfase para a proteína xilose isomerase, ao decorrer deste trabalho.

6.2 Busca de genes na biblioteca metagenômica

As atividades de busca de genes na biblioteca metagenômica e sua inserção em mutantes mostraram-se infrutíferas, no nosso caso, já que não foram detectados genes íntegros nem operons, nem mesmo regiões, embora de pequeno tamanho, que contivessem algumas das modificações descritas na literatura como capazes de aumentar a atividade de enzimas sobre o catabolismo de xilose.

6.3 Construção de mutante de *B. sacchari* inativado especificamente no gene *xylA*

Duas metodologias foram empregadas para se gerar tal mutante: utilizando o vetor suicida pNPTS138 e o uso de radiação UV. Foram realizados e repetidos exaustivamente os experimentos planejados para se obter tais mutantes sem sucesso. Diante deste cenário, foi adotada a estratégia de sintetizar genes com as mutações descritas na literatura como melhoradoras, ou oriundas de *Burkholderia* mais distantes filogeneticamente de *B. sacchari* e inserir na própria *B. sacchari* de maneira extracromosomal, utilizando o vetor pBBR1MCS-2.

6.4 Construção dos recombinantes de *B. sacchari*

Foram então selecionados genes codificadores de xilose isomerase para inserir em *B. sacchari* por meio do vetor pBBR1MCS-2. Os genes *xylA_{Bc}* e *xylA_{Pl}*, respectivamente de *B. cenocepacia* e *P. limnescens* e da própria *B. sacchari*, *xylA_{Bs}* foram amplificados a partir do DNA genômico destas bactérias. Genes de *B. xenovorans* (*xylA_{Bx}*) e de *B. phymatum* (*xylA_{Bp}*) foram sintetizados por uma empresa comercial pois as culturas não estavam disponíveis para aquisição. Foi ainda sintetizado o gene de *B. sacchari* (*xylA**) no qual foram inseridas as modificações, descritas na literatura, como capazes de aumentar o consumo de xilose. Assim, seis recombinantes de *B. sacchari* foram construídos, além de um controle abrigando o vetor sem inserto.

6.5 Avaliação da produção de PHA por linhagens recombinantes de *B. sacchari* a partir de xilose

Os recombinantes foram avaliados em experimentos em frascos agitados, avaliando-se o consumo de xilose, produção de polihidroxialcanoatos e a atividade da enzima xilose isomerase. Os resultados indicaram que a atividade enzimática da xilose isomerase dos recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes *xylA_{Bx}*, *xylA_{Bs}*, *xylA_{Bp}* tiveram um aumento de 113%, 52% e 39% respectivamente, quando comparado com a linhagem controle abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2. Os recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes *xylA_{Bx}*, *xylA_{Bs}*, *xylA_{Bp}*, *xylA** foram capazes de consumir aproximadamente 30%, para *xylA_{Bs}* e *xylA**, e 23%, para *xylA_{Bp}* e *xylA_{Bx}*, a mais de xilose quando comparadas com a linhagem controle. Esses mesmos recombinantes foram aqueles que conseguiram produzir maior quantidade de P3HB, 70% a mais do que a linhagem controle. Os recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes *xylA_{Bs}*, *xylA** e *xylA_{Bc}* foram aqueles que tiveram um aumento de aproximadamente 30% a mais do que a linhagem controle na eficiência de conversão de xilose em PHB. Para as linhagens recombinantes de *B. sacchari* abrigando os genes *xylA_{Bp}* e *xylA_{Bx}*, esse aumento foi de 40%. A linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando o gene *xylA_{Bc}* foi aquela que obteve maior eficiência de conversão de xilose em células (Xr). Para a linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando o gene *xylA_{Pl}* não foi possível observar nenhuma diferença na atividade enzimática, consumo de xilose e produção de P3HB quando comparada com a linhagem controle. Quando os resultados

obtidos pelos diferentes recombinantes são comparados com a linhagem *B.sacchari* pBBR1MCS-2::*xylA_{BS}*, foi possível perceber que não houve uma diferença muito grande entre as proteínas xilose isomerase testadas, mas que a superexpressão desta proteína aumenta tanto a produção de P3HB como o consumo de xilose na maioria dos recombinantes.

REFERÊNCIAS*

ALEXANDRINO P., M. T. T., GUAMÁN L. P., CHERIX J., LOZANO G. C., FUJITA A., RAMOS E., LONG P., PADILLA G., TACIRO M. 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. submitted, 2014.

AKARAONYE, E., KESHAVARZ, T., ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 85: 732-743 p. 2010.

ALBUQUERQUE, M. G., EIROA, M., TORRES, C., NUNES, B. R., REIS, M. A. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J Biotechnol*, v. 130, n. 4, p. 411-421, Jul 2007. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17602776> >.

ANTUNES F. A. F., C. A. K., MILESSI T. S. S., SANTOS J. C., ROSA C. A., SILVAS. S. DA. Bioethanol Production from Sugarcane Bagasse by a Novel Brazilian Pentose Fermenting Yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Evaluation of Fermentation Medium. *International Journal of Chemical Engineering*, v. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/180681>, p. 8, 2014.

ASBOTH, B.; NARAY-SZABO, G. Mechanism of Action of D-Xylose Isomerase. *Current Protein & Peptide Science*, v. 1, n. 3, p. 237-254, Nov 2000. ISSN 1389-2037. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000207654100001 >.

AUSUBEL FM, B. R., KINGSTON R, MOORE DD, SEIDMAM JG, SMITH J, ET AL. **Current protocols in Molecular Biology**: New York: John Wiley & Sons 1992. 3 v.

BIOSCIENSES, I. Biological sequence alignment editor (Bioedit) 1997.

BONFIELD, J. K.; STADEN, R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. *DNA Seq*, v. 6, n. 2, p. 109-117, 1996. ISSN 1042-5179. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8907307> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-254, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRÄMER, C. O., VANDAMME, P., SILVA, L. F., GOMEZ, J. G., STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 51, n. Pt 5, p. 1709-1713, Sep 2001. ISSN 1466-5026. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11594600> >.

CALDEIRA-PIRES, A., DA LUZ, SANDRA MARIA, PALMA-ROJAS, SILVIA, RODRIGUES, THIAGO OLIVEIRA, SILVERIO, VANESSA, HAVES, VILELA, FREDERICO, BARBOSA, PAULO CESAR, ALVES, ANA MARIA. Sustainability of the Biorefinery Industry for Fuel Production. *Energies*, v. 6, n. 1, p. 329-350, Jan 2013. ISSN 1996-1073. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314021900019 >.

CARVALHO, L. K. G. **Fermentação de resíduos por *Escherichia coli* KO11: influência do inóculo, suplemento nutricional e neutralização do hidrolizado**. 2001. 122 (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CESÁRIO, M. T., RAPOSO, R. S., DE ALMEIDA, M. C., VAN KEULEN, F., FERREIRA, B. S., DA FONSECA, M. M. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *N Biotechnol*, Oct 2013. ISSN 1876-4347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157713> >.

CHANDEL, A. K., CHAN, E.C., RUDRAVARAM, R., NARASU, M.L., RAO, L.V., RAVINDRA, P. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal: *Biotechnol. Mol. Biol.* 2: 14-32 p. 2007b.

CHANDEL, A.K., KAPOOR, R.K., NARASU, M.L., VISWADEVAN, V., KUMARAN, S.S.G., RAVINDER, R., RAO, L.V., TRIPATHI, K.K., LAL, B., KUHAD, R.C. Economic evaluation and environmental benefits of biofuel: an Indian perspective: *Int. J. Global Energy Issues*. 28: 357-381 p. 2007c.

CHANDEL, ANUJ KUMAR, KAPOOR, RAJEEV KUMAR, SINGH, AJAY, KUHAD, RAMESH CHANDER. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 10, p. 1947-1950, Jul 2007. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244821300010 >.

CHANDEL, A. K., SILVIO SILVÉRIO DA SILVA, OM V. SINGH. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology: *BioEnergy Research*. 6: 388-401 p. 2013.

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> >.

DE FIGUEIREDO VILELA, L., DE MELLO, V. M., REIS, V. C., BON, E. P., GONÇALVES TORRES, F. A., NEVES, B. C., ELEUTHERIO, E. C. Functional expression of *Burkholderia cenocepacia* xylose isomerase in yeast increases ethanol production from a glucose-xylose blend. *Bioresour Technol*, v. 128, p. 792-796, Jan 2013. ISSN 1873-2976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23186665> >.

DEUTSCHER, J.; FRANCKE, C.; POSTMA, P. W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, p. 939–1031, 2006.

DIAS, M. O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D., ROCHA, G. J., PRADELLA, J. G., ROSSELL, C. E., FILHO, R. M., BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? *Bioresour Technol*, v. 102, n. 19, p. 8964-8971, Oct 2011. ISSN 0960-8524.

DISCHE, Z. Spectrophotometric method for the determination of free pentose and pentose in nucleotides. *J Biol Chem*, v. 181, n. 1, p. 379-392, Nov 1949. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15390421> >.

DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun*, v. 59, n. 12, p. 4310-4317, Dec 1991. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1937792> >.

DORAN-PETERSON, J.; COOK, D. M.; BRANDON, S. K. Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol. *The Plant Journal*, p. 54, p. 582–592, 2008.

FELIPE, M. G. A., VITOLO, M., MANCHILA, I.M., SILVA, S.S. Enviromental parameters affecting xylitol production form sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysis by *Candida quilliermondii*: *J. Ind. Mricrobiol. Biotechnol.* 18: 251-254 p. 1997.

FENN, T. D.; RINGE, D.; PETSKO, G. A. Xylose isomerase in substrate and inhibitor michaelis states: atomic resolution studies of a metal-mediated hydride shift. *Biochemistry*, v. 43, n. 21, p. 6464-6474, Jun 2004. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157080> >.

FISCHER-LE SAUX, M., VIALARD, V., BRUNEL, B., NORMAND, P., BOEMARE, N. E. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, v. 49 Pt 4, p. 1645-1656, Oct 1999. ISSN 0020-7713. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555346> >.

FREIRE, R. K. B. **Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GARCIA-VILOCA, M., ALHAMBRA, C., TRUHLAR, D. G., GAO, J. Hydride transfer catalyzed by xylose isomerase: mechanism and quantum effects. *J Comput Chem*, v. 24, n. 2, p. 177-190, Jan 2003. ISSN 0192-8651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12497598> >.

GAY, P., LE COQ, D., STEINMETZ, M., FERRARI, E., HOCH, J. A. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, v. 153, n. 3, p. 1424-1431, Mar 1983. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6402497> >.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnology for biofuels*, p. 10.1186/1754-6834-1-6, 2008.

GOMEZ, J. G. C. et al. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoate acids from carbohydrates and propionic acid.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 785-791 p. 1996.

GOMEZ, J.G.C. **Produção por *Pseudomonas* sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: Avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes**. 2000. 155 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2000.

GOSSET, G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*, v. 4, May 16 2005. ISSN 1475-2859. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000232695200001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15700001) >.

HAHN-HAGERDAL, B., WAHLBOM, C.F., GÁRDONYI, M., VAN ZYL, W.H., OTERO, R.R.C., JONSSON, L.J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 73: 53-84 p. 2001.

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: < [Go to ISI>://WOS:000250578300006](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17146652) >.

HAZER, B.; STEINBÜCHEL, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 74, n. 1, p. 1-12, Feb 2007. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17146652> >.

HECTOR, R. E., DIEN, B. S., COTTA, M. A., MERTENS, J. A. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella rumenicola* TC2-24. *Biotechnol Biofuels*, v. 6, n. 1, p. 84, 2013. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721368> >.

HERNANDEZ-MONTALVO, V., VALLE, F, BOLIVA, F, GOSSET, G. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Appl Microbiol Biotechnol*, p. 57(1-2):186-191., 2001.

HU, H.; LIU, H.; SHI, Y. The reaction pathway of the isomerization of D-xylose catalyzed by the enzyme D-xylose isomerase: a theoretical study. *Proteins*, v. 27, n. 4, p. 545-555, Apr 1997. ISSN 0887-3585. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9141134> >.

INGRAM, L. O., ALDRICH, H. C., BORGES, A. C., CAUSEY, T. B., MARTINEZ, A., MORALES, F., SALEH, A., UNDERWOOD, S. A., YOMANO, L. P., YORK, S. W., ZALDIVAR, J., ZHOU, S. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol Prog*, v. 15, n. 5, p. 855-866, 1999 Sep-Oct 1999. ISSN 8756-7938. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10514255> >.

ITALIANI, V. C.; MARQUES, M. V. The transcription termination factor Rho is essential and autoregulated in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, v. 187, n. 12, p. 4290-4294, Jun 2005. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937192> >.

JARBOE, L. R., GRABAR, T. B., YOMANO, L. P., SHANMUGAN, K. T., INGRAM, L. O. Development of ethanologenic bacteria. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v. 108, p. 237-261, 2007. ISSN 0724-6145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17665158> >.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr Opin Biotechnol*, v. 17, n. 3, p. 320-326, Jun 2006. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713243> >.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 63, n. 5, p. 495-509, Feb 2004. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14595523> >.

JIN, Y. S.; JEFFRIES, T. W. Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 105 -108, p. 277-286, 2003. ISSN 0273-2289. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12721451> >.

JOHNSEN, U., DAMBECK, M., ZAISS, H., FUHRER, T., SOPPA, J., SAUER, U., SCHÖNHEIT, P. D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *J Biol Chem*, v. 284, n. 40, p. 27290-27303, Oct 2009. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584053> >.

JOJIMA, T., OMUMASABA, C.A., INUI, M., YUKAWA, H. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, p. 85:471-480, 2010.

JURADO, M., PRIETO, A., MARTÍNEZ-ALCALÁ, A., MARTÍNEZ, A. T., MARTÍNEZ, M. J. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour Technol*, v. 100, n. 24, p. 6378-6384, Dec 2009. ISSN 1873-2976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683434> >.

JÄGER, W., SCHÄFER, A., PÜHLER, A., LABES, G., WOHLLEBEN, W. Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*, v. 174, n. 16, p. 5462-5465, Aug 1992. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644774> >.

JÄGER, W., SCHÄFER, A., KALINOWSKI, J., PÜHLER, A. Isolation of insertion elements from gram-positive *Brevibacterium*, *Corynebacterium* and *Rhodococcus* strains using the *Bacillus subtilis* sacB gene as a positive selection marker. *FEMS Microbiol Lett*, v. 126, n. 1, p. 1-6, Feb 1995. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7896070> >.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the reserve material poly-beta-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Appl Environ Microbiol*, v. 69, n. 6, p. 3244-3250, Jun 2003. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788722> >.

KARIMÄKI, J., PARKKINEN, T., SANTA, H., PASTINEN, O., LEISOLA, M., ROUVINEN, J., TURUNEN, O. Engineering the substrate specificity of xylose isomerase. *Protein Eng Des Sel*, v. 17, n. 12, p. 861-869, Dec 2004. ISSN 1741-0126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713782> >.

- KEENAN, T. M., TANENBAUM, S. W., STIPANOVIC, A. J., NAKAS, J. P. Production and characterization of poly-beta-hydroxyalkanoate copolymers from *Burkholderia cepacia* utilizing xylose and levulinic acid. *Biotechnol Prog*, v. 20, n. 6, p. 1697-1704, 2004 Nov-Dec 2004. ISSN 8756-7938. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15575701> >.
- KEENAN, T. M.; NAKAS, J. P.; TANENBAUM, S. W. Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 33, n. 7, p. 616-626, Jul 2006. ISSN 1367-5435. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16761168> >.
- KERSTERS-HILDERSON H., C. M., VAN OPSTAL O., VANGRYPERRE W., DE BRUYNE C. K. Kinetic characterization of d-xylose isomerases by enzymatic assays using d-sorbitol dehydrogenase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 9, n. 3, p. 145-148, 1987.
- KOVACH, M. E., ELZER, P. H., HILL, D. S., ROBERTSON, G. T., FARRIS, M. A., ROOP, R. M., PETERSON, K. M. 4 new derivatives of the broad-host-range cloning vector pbb1mcs, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, v. 166, n. 1, p. 175-176, Dec 1 1995. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TK18700028 >.
- KOVALEVSKY, A. Y., HANSON, L., FISHER, S. Z., MUSTYAKIMOV, M., MASON, S. A., FORSYTH, V. T., BLAKELEY, M. P., KEEN, D. A., WAGNER, T., CARRELL, H. L., KATZ, A. K., GLUSKER, J. P., LANGAN, P. Metal ion roles and the movement of hydrogen during reaction catalyzed by D-xylose isomerase: a joint x-ray and neutron diffraction study. *Structure*, v. 18, n. 6, p. 688-699, Jun 2010. ISSN 1878-4186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20541506> >.
- KUROSAWA, K.; WEWETZER, S. J.; SINSKEY, A. J. Engineering xylose metabolism in triacylglycerol-producing *Rhodococcus opacus* for lignocellulosic fuel production. *Biotechnol Biofuels*, v. 6, n. 1, p. 134, 2013. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24041310> >.
- LARSSON, S.; CASSLAND, P.; JÖNSSON, L. J. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase: *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1163-1170 p. 2001.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.*, v. 56, n. 1-24, 1997.
- LEE, S. M.; JELLISON, T.; ALPER, H. S. Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, v. 78, n. 16, p. 5708-5716, Aug 2012. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22685138> >.
- LOPES, M. S. G., ROCHA, R. C. S., ZANOTTO, S. P. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, p. 1751-1756, 2009a.
- LOPES, M. S. G., GOMEZ, J.G.C., SILVA, L.F. Cloning and over-expression of xylose isomerase gene from *Burkholderia sacchari* and the polyhydroxybutyrate production from xylose.: *Canadian Journal of Microbiology* 2009b.
- LOPES, M. S. C. **Produção de plásticos biodegradáveis utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** 2010. 129 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- 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.
- LOPES, M. S., GOMEZ, J. G., TACIRO, M. K., MENDONÇA, T. T., SILVA, L. F. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simultaneous removal of organic inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysate by *Burkholderia* sp. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 41, n. 9, p. 1353-1363, Sep 2014. ISSN 1476-5535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25059637> >.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E.; SILVA. Green house gases emissions in production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005 / 2006 averages and a prediction for 2020: *Biomass & Bioenergy*. 32: 582-595 p. 2008.

MADHAVAN, A., TAMALAMPUDI, S., USHIDA, K., KANAI, D., KATAHIRA, S., SRIVASTAVA, A., FUKUDA, H., BISARIA, V. S., KONDO, A. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 82, n. 6, p. 1067-1078, Apr 2009. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19050860> >.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V., CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128 p.

MAEHARA, T.; TAKABATAKE, K.; KANEKO, S. Expression of *Arabidopsis thaliana* xylose isomerase gene and its effect on ethanol production in *Flammulina velutipes*. *Fungal Biol*, v. 117, n. 11-12, p. 776-82, 2013 Nov-Dec 2013. ISSN 1878-6146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24295916> >.

MARTIN, C., GALBE, M., WAHLBOM, C.F., HAHN-HÄGERDAL, B., JÖNSEN, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*: *Enzyme Microb. Technol.* 31: 274-282 p. 2002.

MARTINS, L. F., ANTUNES, L. P., PASCON, R. C., DE OLIVEIRA, J. C., DIGIAMPIETRI, L. A., BARBOSA, D., PEIXOTO, B. M., VALLIM, M. A., VIANA-NIERO, C., OSTROSKI, E. H., TELLES, G. P., DIAS, Z., DA CRUZ, J. B., JULIANO, L., VERJOVSKI, LMEIDA, S., DA SILVA, A. M., SETUBAL, J. C. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the são paulo zoo park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. *PLoS One*, v. 8, n. 4, p. e61928, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23637931> >.

MATSUSHIKA, A., INOUE, H., KODAKI, T., SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 84, n. 1, p. 37-53, Aug 2009. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19572128> >.

MEIJNEN, J. P.; DE WINDE, J. H.; RUIJSSENAARS, H. J. Establishment of oxidative D-xylose metabolism in *Pseudomonas putida* S12. *Appl Environ Microbiol*, v. 75, n. 9, p. 2784-2791, May 2009. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270113> >.

MENDONÇA, T. T. **Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)[p(3hb-co-3hhx)]**. 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MENG, M., LEE, C., BAGDASARIAN, M., ZEIKUS, J. G. Switching substrate preference of thermophilic xylose isomerase from D-xylose to D-glucose by redesigning the substrate binding pocket. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 88, n. 9, p. 4015-4019, May 1991. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2023950> >.

NONATO, R. V.; MANTELATTO, P. E.; ROSSELL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, n. 1-2, p. 1-5, Oct 2001. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171671100001 >.

PAN, W., PERROTTA, J. A., STIPANOVIC, A. J., NOMURA, C. T., NAKAS, J. P. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 39, n. 3, p. 459-469, Mar 2012. ISSN 1476-5535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953365> >.

PATEL, D. H., CHO, E. J., KIM, H. M., CHOI, I. S., BAE, H. J. Engineering of the catalytic site of xylose isomerase to enhance bioconversion of a non-preferential substrate. *Protein Eng Des Sel*, v. 25, n. 7, p. 331-6, Jul 2012. ISSN 1741-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22586153> >.

PELICIC, V.; REYRAT, J. M.; GICQUEL, B. Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol*, v. 178, n. 4, p. 1197-1199, Feb 1996. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8576057> >.

PEREIRA, E. M., SILVA-QUEIROZ, S. R., GOMEZ, J. G. C., SILVA, L. F. 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, n. 6, p. 688-697, Jun 2009. ISSN 1480-3275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767840> >.

PIRT, S. J. principle of microbe and cell cultivation. Wiley, 1975. 274.

RAICHER, G. **Análise econômica da produção de polímeros biodegradáveis no contexto de uma biorefinaria a partir de cana-de-açúcar**. 2011. 178 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

REHM, B. H. A. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 9, p. 41-62, 2007 2007. ISSN 1467-3037. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243237000003 >.

REINECKE, F.; STEINBUECHEL, A. *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 16, n. 1-2, p. 91-108, 2009 2009. ISSN 1464-1801. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260494300009 >.

REYRAT, J. M., PELICIC, V., GICQUEL, B., RAPPUOLI, R. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect Immun*, v. 66, n. 9, p. 4011-4017, Sep 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712740> >.

RIIS V., Mai W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography A*, v. 445, n. doi:10.1016/S0021-9673(01)84535-0, p. 285–289, 1988.

ROCHA, R., SILVA, LF, TACIRO, MK, PRADELLA, JGC. Production of P3HB-co-3HV with a broad range of 3HV content at high Y3HV/Prop values by *B. sacchari* IPT 189. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, p. 24:427-431, 2008.

RODRIGUES, M. F., VALENTIN, H. E., BERGER, P. A., TRAN, M., ASRAR, J., GRUYS, K. J., STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate accumulation in *Burkholderia* sp.: a molecular approach to elucidate the genes involved in the formation of two homopolymers consisting of short-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 53, n. 4, p. 453-460, Apr 2000. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10803903> >.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 30, n. 5, p. 279-291, May 2003. ISSN 1367-5435. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12698321> >.

SAMBROOK J., F. E. F., MANIATIS T. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 v.

SARROUH, B.; DA SILVA, S. S. Repeated batch cell-immobilized system for the biotechnological production of xylitol as a renewable green sweetener. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 169, n. 7, p. 2101-2110, Apr 2013. ISSN 1559-0291. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23397324> >.

SASAKI, M., JOJIMA, T., INUI, M., YUKAWA, H. Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose, and D-xylose by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, n. 4, p. 691-699, Dec 2008. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261374300011 >.

SCHENK M., BISSWANGER H. A microplate assay for d-xylose/ d-glucose isomerase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, n. doi:10.1016/S0141-0229(98)00003-9, p. 721–723, 1998.

SILVA, A. F. D. et al. *In vitro* inhibition of adhesion of *Escherichia coli* strains by Xylitol: AGRICULTURE, AGRIBUSINESS AND BIOTECHNOLOGY. 2011.

SILVA, L., GOMEZ, JGC, OLIVEIRA, MS, ALTERTHUM, F. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of recovered cells. *Rev. Microbiol*, v. 23, n. 2, p. 117-122, 1992.

SILVA, L. F. **Estudo do catabolismo de propionate em *Burkholderia sp* visando o aumento da eficiência na produção de poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (P3HB-co-3HV) – um plástico biodegradável.** 62 f. 1998. Tese (Doutorado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SILVA, L.F., GOMEZ, J.C.G, ROCHA, R.C.S, TACIRO, M.K., PRADELLA, J.G.C.. Produção biotecnológica de poli-hidroxi-alcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, p. 30 (7):1732-1743, 2007.

SILVA, LF, TACIRO, MK, MICHELIN RAMOS, ME, CARTER, JM, PRADELLA, JGC, GOMEZ, JGC. Process development of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugar cane bagasse hydrolysate. *J Ind. Microbiol. Biotechnol*, p. 31, 245-254, 2004.

SILVA, L. F., TACIRO, M.K., PRADELLA, J.G.C., GOMEZ, J.G.C., CARTER, J.M., RAMOS, M.E.M. Processo de produção de PHB e seu copolímero PHB-co-HV a partir de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar: Patente, PI0207356-0 A2 depositado no INPI em 24/09/2002, sob no 004350 2002.

SILVA, L. F., TACIRO, M. K., RAICHER, G., PICCOLI, R. A., MENDONÇA, T. T., LOPES, M. S., GOMEZ, J. G. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. *Int J Biol Macromol*, v. 71, p. 2-7, Nov 2014. ISSN 1879-0003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043132> >.

SIMON, R., PRIEFER, U., PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic-engineering - transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio-Technology*, v. 1, n. 9, p. 784-791, 1983. Disponível em: < [Go to ISI://WOS:A1983RQ64200021](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043132) >.

SOFIA, H. J.; BURLAND, V.; DANIELS, D. L. Analysis of the *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0 to 81.5 minutes: *Nucleic Acids Research*. 22: 2576-2584 p. 1994.

SONG, S.; PARK, C. Organization and regulation of the D-xylose operons in *Escherichia coli* K-12: XylR acts as a transcriptional activator. *J Bacteriol*, v. 179, n. 22, p. 7025-7032, Nov 1997. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371449> >.

SRIPRAPUNDH, D.; VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Directed evolution of *Thermotoga neapolitana* xylose isomerase: high activity on glucose at low temperature and low pH. *Protein Eng*, v. 16, n. 9, p. 683-690, Sep 2003. ISSN 0269-2139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14560054> >.

STEPHENS, C., CHRISTEN, B., FUCHS, T., SUNDARAM, V., WATANABE, K., JENAL, U. Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, v. 189, n. 5, p. 2181-2185, Mar 2007. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172333> >.

TAMURA K, P. D., PETERSON N, STECHER G, NEI M, AND KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods: *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739 p. 2011.

TAO, H.; GONZALEZ, R.; MARTINEZ, A. Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation.: *Journal of Bacteriology*. 183: 2979-2988 p. 2001.

TASHA, A.; RAO, V. D.; RAO, V. C. Regulation of Arabinose and Xylose Metabolism in *Escherichia coli*.: *Applied and Environmental Microbiology*: 1524-1532 p. 2010.

TOKIWA, Y.; UGWU, C. U. Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. *J Biotechnol*, v. 132, n. 3, p. 264-272, Nov 2007. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17543411> >.

UNICA: União da Indústria de Cana-de-Açúcar. <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4>. 2014.

VAN MARIS, A. J., ABBOTT, D. A., BELLISSIMI, E., VAN DEN BRINK, J., KUYPER, M., LUTTIK, M. A., WISSELINK, H. W., SCHEFFERS, W. A., VAN DIJKEN, J. P., PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 90, n. 4, p. 391-418, Nov 2006. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17033882> >.

VAN MARIS, A. J., WINKLER, A. A., KUYPER, M., DE LAAT, W. T., VAN DIJKEN, J. P., PRONK, J. T. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v. 108, p. 179-204, 2007. ISSN 0724-6145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17846724> >.

VAN VLEET, J. H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Curr Opin Biotechnol*, v. 20, n. 3, p. 300-306, Jun 2009. ISSN 1879-0429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19545992> >.

VILLARREAL, M. L. M., PRATA, A.M.R., FELIPE, M.G.A., ALMEIDA, E., SILVA, J.B. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*: *Enzyme Microbial Technol*. 40: 17-24 p. 2006.

WANG, R., LI, L., ZHANG, B., GAO, X., WANG, D., HONG, J. Improved xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperature through construction of a xylose isomerase pathway. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 40, n. 8, p. 841-854, Aug 2013. ISSN 1476-5535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23657586> >.

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> >.

WHITLOW, M., HOWARD, A. J., FINZEL, B. C., POULOS, T. L., WINBORNE, E., GILLILAND, G. L. A metal-mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1.6 Å *Streptomyces rubiginosus* structures with xylitol and D-xylose. *Proteins*, v. 9, n. 3, p. 153-173, 1991. ISSN 0887-3585. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2006134> >.

WISSELINK, H. W., TOIRKENS, M. J., WU, Q., PRONK, J. T., VAN MARIS, A. J. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Environ Microbiol*, v. 75, n. 4, p. 907-914, Feb 2009. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074603> >.

ZHOU, H., CHENG, J. S., WANG, B. L., FINK, G. R., STEPHANOPOULOS, G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, v. 14, n. 6, p. 611-622, Nov 2012. ISSN 1096-7184. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22921355> >.