

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM AGRONEGÓCIOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONEGÓCIOS**

Antonio Luiz Fantinel

**A BIOLOGIA SINTÉTICA NA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE
BIOCOMBUSTÍVEIS**

Porto Alegre, 2020

Antonio Luiz Fantinel

**A BIOLOGIA SINTÉTICA NA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE
BIOCOMBUSTÍVEIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronegócios, do Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios (CEPAN), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Agronegócios.

Orientador: Prof. Dr Homero Dewes

Co-orientação: Prof. Dr. Edson Talamini

Porto Alegre, 2020

Antonio Luiz Fantinel

**A BIOLOGIA SINTÉTICA NA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE
BIOCOMBUSTÍVEIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronegócios, do Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios (CEPAN), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Agronegócios.

Aprovada em 27 de abril de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Homero Dewes
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Prof. Dr. Rogério Margis
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Prof. Dr. Antônio Domingos Padula
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Prof. Dr. Cicero Urbanetto Nogueira
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

*Dedico esta tese a minha família pelo apoio,
força e incentivo.*

Agradecimentos

Este trabalho é fruto do esforço de um grupo de pessoas com as quais convivi. Todos de alguma forma que colaboraram em diferentes etapas do trabalho, lendo e fazendo sugestões, corrigindo e ensinando-me conceitos os quais eu não dominava completamente, incentivando e algumas vezes simplesmente me ouvindo.

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado saúde e sabedoria para chegar até aqui. À minha mãe Iselete, meu pai Arno e a minha avó Corandina dedico a minha eterna gratidão por terem tornado todas as minhas conquistas possíveis e por estarem sempre ao meu lado, me apoiando em qualquer que seja a situação. As minhas irmãs Ana e Angela pelo apoio e conforto em todas as horas.

A minha namorada Yesica, por ser a principal incentivadora desse sonho, agradeço pela paciência, companheirismo, dedicação e amor. Obrigado por ter feito do meu sonho o nosso sonho.

Agradeço de modo especial ao meu orientador Prof. Dr. Homero Dewes, pela confiança, orientação e paciência neste trabalho. Além de orientador, foi um grande amigo e um segundo pai. Sem o professor Homero não teria conhecido a temática da biologia sintética, que como ele mesmo diz “tem que ser um tema que te instiga e tira o sono”. Meu muito obrigado!

Agradeço aos meus co-orientadores Edson Talamini e Rogério Margis pela sua experiência e disposição para a realização deste trabalho. Aos professores do programa pós-graduação em Agronegócios, pelos conhecimentos e experiências transmitidas.

Não posso deixar de citar o belo trabalho desenvolvido pela colega, amiga e secretária do PPG em Agronegócio, Débora Azevedo. Sempre disposta em ajudar os alunos em suas diferentes necessidades acadêmicas.

Agradeço ao grupo de pesquisa em Bioeconomia (NEB-AGRO) e seus integrantes.

Quero agradecer as amigas que a pós-graduação me propusera. Dentre os principais a Denise, Débora, Marcela, Alessandra, Anelise, Jaqueline, Tiago, Giovanna, Cristian, Felipe, Carolina e Omar. Não posso de deixar de agradecer a gêmeas (Alessandra e Anelise) por me ajudarem quando mais precisei. Agradeço a Alice e ao Felipe pela ajuda nas discussões e no debate das ideias que fizeram parte deste trabalho. Estendo minha gratidão e amizade aos amigos que dividiram AP durante últimos três anos de pós-graduação.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Universidade Federal de Santa Maria por incentivar o desenvolvimento de novas pesquisas, disponibilizando suporte, dedicação e zelo.

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitou a dedicação integral ao programa de Pós-Graduação em Agronegócios e a operacionalização do estudo.

Agradeço ao Dr. Chaomei Chen, da Universidade de Drexel-US, pelo uso gratuito do software CiteSpace e a AGITTEC pelo uso do software Questel-Orbit. Agradeço também à Dra. Verena Siewers, da Universidade de Chalmers, EUA, e ao Dr. Gregory Stephanopoulos, Instituto de Tecnologia de Massachusetts, EUA e a Aline Dumaresq do SENAI CETIQT por seus valiosos comentários sobre os aspectos desta pesquisa.

Obrigada a todos!

En biología sintética, imaginar es poder
(Alejandro Nadra, 2014).

RESUMO

A BIOLOGIA SINTÉTICA NA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Preocupações crescentes com a dependência de combustíveis fósseis instigaram a demanda pela produção de biocombustíveis a base de culturas agrícolas, maximizando a concorrência por terras agricultáveis e modificando o seu uso. Tais mudanças podem impactar significativamente na segurança alimentar e nas condições ambientais das futuras gerações. Pensando em uma economia baseada em recursos renováveis, a produção de bens e mercadorias não devem impactar na produção de alimentos e nem causar degradação ambiental ou consequências socioeconômicas negativas. Na tentativa de superar tais desafios, novas possibilidades biotecnológicas pautadas no uso de abordagens de biologia sintética estão sendo consideradas para suprir a demanda por alimento e energia a longo prazo. Apesar de recente, a biologia sintética está revolucionando as diferentes cadeias industriais. Na produção de biocombustíveis, os avanços ferramentais em microrganismos contribuem significativamente para esse progresso a partir de matérias-primas não alimentares que não contenham amido ou açúcares em sua formulação. Além de aliviar as preocupações em relação ao meio ambiente, a sustentabilidade e a segurança alimentar e energética, a biologia sintética pode inaugurar uma nova bioeconomia, a base de biomassa. Novos produtos químicos e materiais atualmente fabricados a partir do petróleo poderão ser produzidos a partir dessa matéria-prima. No entanto, ainda há muitas dúvidas acerca das novas direções científicas e tecnológicas das ferramentas de biologia sintética em microrganismos para a produção de biocombustíveis e quais serão seus impactos em uma economia de base biológica. Visando aproximar o trabalho desenvolvido por inúmeros pesquisadores sintéticos à realidade brasileira, primeiramente analisamos a literatura científica (Capítulo 4) mapeando seu desenvolvimento científico e seus impactos. Considerando os últimos vinte anos (1999-2018), capturamos e visualizamos o domínio científico (países, instituições e autores) e as possibilidades tecnológicas emergentes. Por ser um espaço de pesquisa altamente tecnológico, inúmeras empresas estão surgindo circunscritas pela biologia sintética e orientadas para a produção de combustíveis e químicos renováveis, o capítulo 5 se propõe a fornecer uma visão geral dos caminhos, aplicações e tendências em biologia sintética relacionadas a etanol celulósico mediante a análise de patentes. Nessa análise, diferentes indicadores geopolíticos, mercadológicos e análise de conteúdo forneceram uma visão geral dos esforços de P&D para o campo analisado. Os dados obtidos (Capítulo 4 e 5) nos permitem inferir que as abordagens de biologia sintética aplicadas a produção de biocombustíveis vêm evoluindo nos últimos anos. Diferentes abordagens e ferramentas baseadas em omics, engenharia de genoma, engenharia genética e metabólica está sendo empregadas no desenvolvimento de microrganismos para torná-los fábricas vivas robustas as atividades industriais necessárias a produção de biocombustíveis. Destacamos ainda que as abordagens de biologia sintética reverberam o conceito de bioeconomia na busca pelo desenvolvimento de novas formas de produção de bioenergia e no desenvolvimento de novos produtos com maior valor agregado, utilizando recursos biológicos renováveis como matéria-prima.

Palavras chaves: Produção microbiana, Biodiesel, Bioenergia, Desenvolvimento bioeconômico.

ABSTRACT

SYNTHETIC BIOLOGY IN THE SUSTAINABLE PRODUCTION OF BIOFUELS

Increasing concerns about dependence on fossil fuels instigated the demand for the production of biofuels based on agricultural crops, maximizing competition for agricultural land and modifying its use. Such changes can significantly impact food security and the environmental conditions of future generations. Thinking of an economy based on renewable resources, the production of goods and commodities should not impact on food production nor cause environmental degradation or negative socioeconomic consequences. In an attempt to overcome these challenges, new biotechnological possibilities based on the use of synthetic biology approaches are being considered to supply the demand for food and energy in the long term. Although recent, synthetic biology is revolutionizing different industrial chains. In the production of biofuels, tooling advances in microorganisms contribute significantly to this progress from non-food raw materials that do not contain starch or sugars in their formulation. In addition to alleviating concerns about the environment, sustainability and food and energy security, synthetic biology can usher in a new bioeconomy, based on biomass. New chemicals and materials currently made from petroleum may be produced from this raw material. However, there are still many doubts about the new scientific and technological directions of synthetic biology tools in microorganisms for the production of biofuels and what will be their impacts on a bio-based economy. To bring the work developed by countless synthetic researchers closer to the Brazilian reality, we first analyzed the scientific literature (Chapter 4) mapping its scientific development and its impacts. Considering the last twenty years (1999-2018), we capture and visualize the scientific domain (countries, institutions, and authors) and the emerging technological possibilities. Because it is a highly technological research space, numerous companies are emerging circumscribed by synthetic biology and oriented towards the production of renewable fuels and chemicals, chapter 5 proposes to provide an overview of the paths, applications, and trends in synthetic biology related to ethanol cellulosic by analyzing patents. In this analysis, different geopolitical, market and content analysis indicators provided an overview of R&D efforts for the analyzed field. The data obtained (Chapters 4 and 5) allow us to infer that synthetic biology approaches applied to the production of biofuels have been evolving in recent years. Different approaches and tools based on omics (metagenomics, metaproteomic, metabolomics), genome engineering, genetic and metabolic engineering are being employed in the development of microorganisms to make them robust living plants and the industrial activities necessary for the production of biofuels. We also highlight that synthetic biology approaches reverberate the concept of bioeconomy in the search for the development of new forms of bioenergy production and the development of new products with greater added value, using renewable biological resources as raw material.

Keywords: Microbial production, Biodiesel, Bioenergy, Bioeconomic development.

Índice de Figuras

Capítulo 2

Figura 1- Gerações de produção de biocombustíveis.....	24
Figura 2- Processo de produção de etanol de primeira geração; (a) a partir açúcar; (b) a partir de amido.....	24
Figura 3- Processo de conversão bioquímica de etanol de segunda geração.	25
Figura 4- Diagrama dos principais processos de transformação de biomassa de microalgas para produção de biocombustíveis.	26
Figura 5- Microrganismos fotossintéticos projetados para secretar o bcombustível.	27

Capítulo 4

Figure 1- Synthetic biology, metabolic engineering, and biofuel-related articles, and reviews, according to Web of Science (1999-2018).....	47
Figure 2 Dual-Map Overlays in research on synthetic biology-related biofuels.....	49
Figure 3 Countries co-citation map in research on synthetic biology-related biofuels. The generated map comprises 51 nodes and 57 links.	50
Figure 4 Institution co-citation map in research on synthetic biology-related biofuels.	51
Figure 5 Network of the dominant research topics and the leading authors on synthetic biology-related biofuels.	53

Capítulo 5

Figura 1 - Distribuição das patentes em biologia sintética relacionadas a etanol celulósico.	86
Figura 2 - Conceitos predominantes nas famílias de patentes recuperadas.....	87
Figura 3 - Número de pedidos prioritários de patentes nos vários escritórios.	92
Figura 4 - Número de patentes vivas protegidas nos vários escritórios.	93
Figura 5 - Gastos em pedidos de patentes.	96

Índice de Tabelas

Capítulo 4

Table 3- Summary of emerging clusters on synthetic biology-related biofuels.....	54
Table 2 Top scientific articles with the strongest citation bursts in the research on synthetic biology-related biofuels.....	55
Table 5 The top 20 keywords with the strongest bursts of citation in the research on synthetic biology-related biofuels, as published in the most recent years of the period of analysis.	58

Capítulo 5

Tabela 1 Principais códigos IPC para famílias de patentes em biologia sintética para etanol celulósico.....	88
Tabela 2 Famílias de patentes por cessionários com indicadores de valor	94

lista de siglas

PCR - Proteína c-reativa

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DSB - Nuclease indutoras de dupla cadeia

ZFNs - Zinc finger nucleases

TALENS - Transcription activator-like effector nucleases

CRISPR - Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats

Cas9 – Proteína 9

USA – Estados Unidos da América

CO₂ - Dióxido de carbono

RNA - Ácido ribonucleico

mg/L - Miligrama por litro

g/L - Gramas por litros

CoaR - CoA Biosynthesis Regulatory sRNA

MAA7 - Tryptophan synthase

cpSRP - Partícula de reconhecimento de sinal de cloroplasto

ChIM - Teor de clorofila dos mutantes

CPFTSY - Proteína receptora de partículas de reconhecimento de sinal

AGL - Ácidos graxos livres

acil-ACP - Síntese de ácidos graxos livres

FAME - Éster metílico de ácidos graxos

IPC - Classificação Internacional de Patentes

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Problema de pesquisa.....	17
1.2. Objetivo geral	17
1.2.1. Objetivos específicos	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1. Biologia sintética	19
2.2. Bioeconomia	21
2.3. Biocombustíveis.....	23
2.3.1. Biocombustíveis de primeira geração	24
2.3.2. Biocombustíveis de segunda geração	25
2.3.3. Biocombustíveis de terceira geração	25
2.3.4. Biocombustíveis de quarta geração ou microbianos	26
3. Metodologia	33
3.1. Synthetic Biology in the Bioeconomy of Non-Food-Competing Biofuels.....	33
3.1.1. Coleta dos dados	35
3.1.2. Análise dos dados	35
3.1.3. Métricas	36
3.2. Explorando oportunidades tecnológicas em biologia sintética para etanol celulósico: Será o futuro da bioeconomia sustentável	37
3.2.1. Coleta dos dados	38
3.2.2. Análise das patentes.....	39
4. SYNTHETIC BIOLOGY IN THE BIOECONOMY OF NON-FOOD- COMPETING BIOFUELS	42
4.1.1. Changes in the knowledge on synthetic biology-related biofuels	48
4.1.2. Worldwide distribution of research on synthetic biology-related biofuels 49	
4.1.3. Institutions co-citation network	50
4.1.4. Clusters co-citation map of authors and research topics on synthetic biology-related biofuels.....	51
4.1.5. Papers with the strongest citation bursts on synthetic biology-related biofuels	54
4.1.6. Emerging trends and new developments in the research on synthetic biology-related biofuels.....	56
4.2. Discussion and future perspectives	58
4.3. Conclusion	62

4.4. References.....	63
5. OPORTUNIDADES TECNOLÓGICAS EM BIOLOGIA SINTÉTICA PARA ETANOL CELULÓSICO: SERÁ O FUTURO DA BIOECONOMIA SUSTENTÁVEL?.....	80
5.1. Introdução	80
5.2. Métodos	82
5.2.1. Seleção de fonte de dados e amostra	83
5.2.2. Análises e métricas	84
5.3. Resultados.....	86
5.3.1. Distribuição temporal de depósitos de patentes	86
5.3.2. Principais conceitos e agrupamentos tecnológicos.....	86
5.3.3. Principais domínios tecnológicos e aplicações.....	87
5.3.4. Distribuição geográfica dos depósitos de patentes	91
5.3.5. Principais censitários	93
5.3.6. Gastos com pedidos de patentes	95
5.4. Discussão	96
5.5. Conclusões e caminhos para pesquisas futuras.....	101
5.6. Referências.....	102
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
6.1. Contribuições	123
6.2. Limitações.....	123
7. Referências.....	124
Apêndices.....	162

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a economia de base biológica apoiada pela produção agrícola está enfrentando severas críticas. Preocupações crescentes com a dependência de combustíveis fósseis instigaram a demanda pela produção de biocombustível a base de culturas agrícolas, o que levou tanto à maximização da concorrência por terras agricultáveis quanto a mudanças em seu uso (COLEMAN; GOOLD, 2019; FRENCH, 2019a). Essas transformações no uso e no gerenciamento de terras podem ocasionar impactos significativos na segurança alimentar (ORT et al., 2015; ROELL; ZURBRIGGEN, 2020; RULLI et al., 2016a; SINGH; TRIVEDI, 2017), e no meio ambiente (GHOSH; WESTHOFF; DEBNATH, 2019).

Uma economia baseada em recursos renováveis não deve impactar negativamente na produção de alimentos e nem causar degradação ambiental ou consequências socioeconômicas adversas às futuras gerações (BENNICH; BELYAZID, 2017). Na tentativa de superar tais desafios, novas possibilidades biotecnológicas pautadas no uso de abordagens de biologia sintética estão sendo consideradas a fim de suprir a demanda de alimento e energia proveniente de uma população crescente (ARORA et al., 2019; CLARKE, 2019).

Apesar de estar na sua infância a biologia sintética está revolucionando a forma de produzir mercadorias e compostos de alto valor por meio de plataformas microbianas sintéticas (DARVISHI et al., 2017; GEORGIANNA; MAYFIELD, 2012; HAGEMANN; HESS, 2018; HILLMAN; READNOUR; SOLOMON, 2017; JAGADEVAN et al., 2018; MADHAVAN et al., 2017a; RAHMAN et al., 2018; SHARMA; XU; QIN, 2019a; SPAGNUOLO; YAGUCHI; BLENNER, 2019; WANG et al., 2017a; WANG; PFLEGER; KIM, 2017), cada vez mais adaptadas às características industriais para produção de biocombustíveis (ALMEIDA; FÁVARO; QUIRINO, 2012; DAS; PATRA; GHOSH, 2020; FISCHER; KLEIN-MARCUSCHAMER; STEPHANOPOULOS, 2008; KNOCKE; VOGT, 2009; LEE; LEE; LEE, 2013; WEHRS et al., 2019) e produtos químicos finos (CARBONELL et al., 2016a; CLARKE, 2019; MARTINS-SANTANA et al., 2018).

A biologia sintética possibilita tornar processos biológicos competitivos e proficientes para o bem-estar humano e animal (GUZMÁN-TRAMPE et al., 2017; SINGH, B. et al., 2019; KHAMBHATI et al., 2019; LIN et al., 2019). O uso dessas ferramentas oportuniza a fermentação e a fabricação de produtos não gerados

naturalmente em grandes quantidades em microrganismos nativos (WEHRS et al., 2029; XU et al., 2019; CHI et al., 2019; THORWALL et al., 2020; XU et al., 2020). *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* são linhagens hospedeiras amplamente utilizadas como fábricas vivas devido às suas características desejáveis (JULLESSON et al., 2015). Outros microrganismos são objeto de estudos para superar as dificuldades dessas fábricas de células-modelo. Exemplos são organismos fotossintéticos (ATSUMI; HIGASHIDE; LIAO, 2009; MACHADO; ATSUMI, 2012), leveduras não convencionais (MARKHAM; ALPER, 2018) e bactérias metanotróficas (STRONG; XIE; CLARKE 2015; LIAO et al., 2016).

A aplicação de biologia sintética em microrganismos para a produção de biocombustíveis explora a capacidade matérias-primas de baixo custo e menos nobres como a biomassa lignocelulósica (CHEN et al., 2020; ELKINS; RAMAN; KELLER, 2010; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; RUBIN, 2008; SHARMA; XU; QIN, 2019a; WEI et al., 2015), dióxido de carbono (ARO, 2016b; SADHUKHAN et al., 2016; WOO, 2017) e resíduos (GARCIA-GOMEZ et al., 2016; NARNOLIYA; JADAUN; SINGH, 2018), tornando-se uma alternativa sustentável para geração de bioenergia usando substratos da bioeconomia (PHILP, 2015; ARO, 2016; GUERRIERO et al., 2016; LARA-FLORES et al., 2018; DUPONT-INGLIS; BORG, 2018). Contribuindo significativamente para o progresso da produção de biocombustíveis a partir de matérias-primas não alimentares, revolucionando a forma como produzimos mercadorias e compostos de alto valor (JULLESSON et al., 2015; CHUBUKOV, et al. 2016). Esses avanços poderão provocar mudanças significativas nos sistemas socioeconômicos, agrícolas, e energéticos quando utilizadas de forma eficiente (TYE et al., 2016; NARNOLIYA; JADAUN; SINGH, 2018; PAUL; DUTTA, 2018; DAHMEN et al., 2019; INGLE et al., 2019).

Em síntese, observando os resultados e discussões apresentadas até esse momento, não podemos desconsiderar a incrível diversidade de compostos e moléculas para diferentes fins que podem ser produzidos ou otimizados usando biologia sintética (JEZ, 2020; XU et al., 2020 ARORA et al., 2020). No entanto, reconhecemos que existem dúvidas acerca das novas direções científicas e tecnológicas das ferramentas de biologia sintética empregadas para a produção de biocombustíveis e, portanto, orientadas à um mundo focado em uma bioeconomia sustentável usando matérias-primas-não alimentares (CHUBUKOV et al., 2018; JAGADEVAN et al., 2018). Assim é importante e urgente

criar um resumo do status atual das tendências e fronteiras científicas e tecnológicas em biologia sintética relacionadas ao desenvolvimento de biocombustíveis.

1.1.Problema de pesquisa

As abordagens de biologia sintética para biocombustíveis têm sido consideradas. Já se passaram treze anos desde que Kaznessis (2007) trouxe para o meio científico as inúmeras aplicações possíveis da biologia sintética dentre as quais estava a produção de biocombustíveis. Os recentes avanços em omics, análise e design de modelagem e montagem de DNA fornecem dados e ferramentas para identificar, projetar e montar novos módulos de síntese de produtos naturais (WEHRS et al., 2019; XU et al., 2020), colocando essa temática em um novo estágio com potencial de desenvolver a produção de biocombustíveis microbianos, também chamados de quarta geração. Além disso, seu desenvolvimento pode ser considerado para utilização de matérias-primas de baixo custo destinadas a produção de bens, desenvolvendo e ampliando a bioeconomia (LOKKO et al., 2018; PHILP, 2018; WURTZEL et al., 2019).

Assim questionamo-nos como está a dinâmica atual do desenvolvimento científico e tecnológico em biologia sintética aplicada na produção de biocombustíveis? Quais são as características geográficas, institucionais e as fronteiras de pesquisa em biologia sintética relacionada à produção de biocombustíveis. E qual será o papel da biologia sintética na formulação política e mercadológica para um mundo focado em uma bioeconomia mais sustentável?

1.2.Objetivo geral

Analisar a dinâmica do desenvolvimento científico e tecnológico em biologia sintética relacionada a biocombustíveis focados em uma bioeconomia sustentável.

2.3.1 Objetivos específicos

- Analisar o panorama geopolítico, institucional e intelectual dos avanços científicos da pesquisa em biologia sintética relacionados a biocombustíveis a partir de recursos sustentáveis;
- Analisar as aplicações das ferramentas de biologia sintética relacionadas a etanol celulósico mediante a análise de patentes.

Considerando o tema proposto e seu caráter contemporâneo, o estudo desenvolveu-se de forma exploratória buscando por publicações científicas e tecnológicas na tentativa de compreendermos a dinâmica atual do desenvolvimento das ferramentas de biologia sintética para a produção de biocombustíveis. Aliado a formulação de novas políticas e desenvolvimento mercadológico para um mundo focado em uma bioeconomia mais sustentável.

Portanto, esta tese está estruturada em seis capítulos. O primeiro capítulo refere-se à apresentação da proposta de tese sendo composto pela introdução e justificativa, problema de pesquisa, objetivo geral e objetivos específicos.

O capítulo dois apresenta uma contextualização teórica acerca das abordagens de biologia sintética, bioeconomia e as diferentes gerações de biocombustíveis.

O terceiro capítulo descreve a metodologia utilizada no decorrer das etapas da pesquisa. Essa seção foi dividida em duas partes. Um enfoque mais detalhado é dado aos procedimentos metodológicos utilizados para os artigos dos capítulos 5 e 6.

No capítulo 4 mapeamos a literatura científica em biologia sintética relacionada a biocombustíveis para avaliar como a dinâmica atual deste desenvolvimento científico pode impactar as formulações de políticas futuras para um mundo focado em uma bioeconomia sustentável. Por meio de uma análise cientométrica fornecemos uma perspectiva útil da bioeconomia nas novas fronteiras do campo da bioenergia, sem a competição com a produção de alimentos, tampouco o agravamento do uso da terra e da água e limitando o impacto ambiental das atividades humanas e industriais. Este manuscrito foi encaminhado para um periódico pertinente.

No capítulo 5 analisamos as aplicações das ferramentas de biologia sintética relacionadas a etanol celulósico, visualizando as tendências tecnológicas, distribuição regional, institucional e de mercado de P&D dos últimos vinte anos (1999-2019). As possibilidades tecnológicas emergentes foram identificadas servindo como Proxy para o desenvolvimento da biotecnologia sintética aplicada na produção de etanol celulósico. Este manuscrito será encaminhado para um periódico pertinente.

Por último, no capítulo 6 apresentamos as considerações finais do trabalho e possíveis direções futuras sobre o desenvolvimento científico e tecnológico das abordagens de biologia sintética para a produção de biocombustíveis e para a bioeconomia.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Este capítulo tem por finalidade fundamentar as discussões e análises propostas no decorrer dessa tese. Assim, abordagens e conceitos em biologia sintética e bioeconomia e suas aplicabilidades ao objeto de pesquisa, produção de biocombustíveis baseada em recursos da bioeconomia, são discutidos de forma inter-relacionada e apresentados em quatro seções: biologia sintética, bioeconomia e biocombustíveis.

2.1. Biologia sintética

Conceituar biologia sintética não é uma tarefa fácil, pois trata-se de um campo científico relativamente novo, que vem evoluindo e afetando positivamente a vida humana, configurando-se como um ramo amplamente reconhecido da pesquisa biológica (CAMERON; BASHOR; COLLINS, 2014). A biologia sintética baseia-se em uma ampla gama de campos e tem o potencial de influenciar ou rejuvenescer muitos outros (DELEBECQUE; PHILP, 2015). Logo, possibilita projetar e construir novas peças biológicas, dispositivos e sistemas não existentes e/ou redesenhar sistemas biológicos já existentes (BENNER; SISMOUR, 2005; KHALIL; COLLINS, 2010; REN; LEE; NA, 2020).

Desde seu surgimento vem evoluindo em escopo e objetivo, estendendo-se para estudar o comportamento dos organismos e projetá-los para executar novas tarefas destinadas a produção de biocombustíveis e produtos químicos úteis (NIELSEN; KEASLING, 2011; CHOWNK et al., 2019), destruição de tumores e doenças (KALOS; JUNE, 2013; BOBER; BEISEL; NAIR, 2018; PEDROLLI et al., 2019), produção de substâncias de alto valor (BREITLING; TAKANO, 2015; CHUBUKOV et al., 2018; DARVISHI et al., 2018), e construção de ambientes (moradias) mais sustentáveis (ARMSTRONG, 2010).

Os primeiros passos para o surgimento da biologia sintética foram dados nas décadas de 1950 e 1960 com a descoberta da estrutura da dupla hélice (Ácido Desoxirribonucleico - DNA) (WATSON; CRICK, 1953; JACOB; MONOD, 1961). Nas décadas de 70 e 80, em virtude do desenvolvimento da clonagem molecular (MANIATIS; FRITSCH; SAMBROOK, 1988) e do PCR (ERLICH, 1989) apesar da manipulação genética microbiana ter se tornado mais comum, ainda era restrita a clonagem e expressão de genes recombinantes. Já por volta de 1990 avanços foram verificados no sequenciamento automatizado de DNA (HUNKAPILLER et al., 1991) e da evolução das

ferramentas computacionais com a criação do campo da biologia de sistemas (KITANO, 2000), sendo possível assim, sequenciar genomas por completo (JEONG et al., 2000).

Mesmo havendo publicações que contemplavam o termo biologia sintética nos anos 1980 (KRIMSKY, 1982), foi somente após a virada do século que esta área científica fez sua estreia definitiva (RAWLS, 2000). Com a colaboração de pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento científico, os primeiros trabalhos focando na construção de circuitos reguladores genéticos artificiais (MCADAMS; ARKIN, 2000) (YOKOBAYASHI; WEISS; ARNOLD, 2002), interruptores de alternância genética (GARDNER; CANTOR; COLLINS, 2000), reguladores de transcrição (ELOWITZ; LEIBIER, 2000), foram surgindo, gerando pequenos módulos de prova com características específicas.

O próximo passo dos biólogos sintéticos foi utilizar a engenharia de circuitos para investigar a relação entre o design de rede e o comportamento celular (HASTY; MCMILLEN; COLLINS, 2002; ISAACS; DWYER; COLLINS, 2006), sendo possível expandir as pesquisas visando analisar a expressão genética (STEGE et al., 2002; ISAACS; DWYER; COLLINS, 2006), a função proteica (NG; HENIKOFF, 2003), o metabolismo (FUNG et al., 2005) e a comunicação célula-célula (BULTER et al., 2004; CHEN; WEISS, 2005).

Nessa mesma época as primeiras peças padronizadas chamados *Biobricks* também surgiram (KNIGHT, 2003). Essas peças ou tijolos biológicos com diferentes sequências de DNA foram desenvolvidas para facilitar a montagem metódica gradual de peças em circuitos maiores (KNIGHT, 2003), podem ser montados para formar dispositivos e sistemas para operar em células vivas (ROUILLY et al., 2007).

O maior sucesso prático da biologia sintética ocorreu no desenvolvimento e redirecionamento de vias metabólicas em *S. cerevisiae* para produção de ácido artemisínico (*Artemisia annua L*) (RO et al., 2006). Esta droga é utilizada no combate à malária e sua produção em larga escala foi alcançada no início de 2013, graças ao financiamento da Fundação Bill e Melinda Gates.

Outro passo importante para a consolidação da biologia sintética foi na área da engenharia de genoma inteiro. Crain Venter e colegas utilizaram técnicas de montagem de DNA para criação de uma célula bacteriana, controlada por um genoma totalmente sintético (GIBSON et al., 2009). Anos mais tarde, novamente Venter e demais colaboradores desenvolveram o genoma JCVI-syn 3.0, sendo o menor genoma que se

replica de forma autônoma, encontrado na natureza, com apenas 473 genes (HUTCHISON et al., 2016).

Outra área do conhecimento que apresentou desenvolvimento científico relevante neste período foi a edição de genomas. Os primeiros métodos para direcionar nucleases indutoras de dupla cadeia (DSB), em locais específicos do genoma baseavam-se em sistemas de proteínas com especificidades personalizáveis de ligação ao DNA via ZFNs (*zinc finger nucleases*) (KIM; CHA; CHANDRASEGARAN, 1996; RHEE et al., 1996) e TALENS (*transcription activator-like effector nucleases*) (CHRISTIAN et al., 2010; LI et al., 2011). Distinto das nucleases específicas do ZFNs e TALENS, o sistema CRISPR-Cas (*clustered regulatory interspaced short palindromic repeats*) surgiu como uma alternativa potencialmente fácil e eficiente para induzir alterações genéticas direcionadas em células vivas (MALI et al., 2013; CONG et al., 2013; DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; FU et al., 2014; ADIEGO-PÉREZ et al., 2019) utiliza nucleases de DNA que utiliza reconhecimento de DNA baseado em RNA (ácido ribonucleico). O sistema CRISPR-Cas oferece uma nova ferramenta para manipular sistemas celulares visando tornar microrganismos relevantes para os setores robustos da economia (KNOTT; DOUDNA, 2018; OTOUPAL; CHATTERJEE, 2018; CAI; GAO; ZHOU, 2019; JAVED et al., 2019; SHANMUGAM; NGO; WU, 2019).

É possível verificar que a biologia sintética está emergindo como uma importante disciplina com potencial de impactar em diferentes áreas do conhecimento e da indústria (BASSALO; LIU; GILL, 2016; BUSH; GIBBS; DEANS, 2019). A biotecnologia está se tornando uma parte importante da economia em países desenvolvidos, com crescimento de aproximadamente 24% ao ano (BERGIN, 2017). A biologia sintética está transformando a capacidade de fabricar produtos de base biológica cada vez mais necessários em resposta à crescente demanda do mercado. As mudanças graduais de uma economia dependente de recursos fósseis para um mundo cada vez mais necessitado de biomassa permitirá o desenvolvimento de novas áreas da economia, buscando a inovação para disponibilizar uma maior quantidade e variedade de produtos a um custo menor (CLARKE, 2019).

2.2. Bioeconomia

A bioeconomia é novo um paradigma emergente, no qual a criação, o desenvolvimento e a revitalização de sistemas econômicos baseados no uso de recursos biológicos sustentáveis estão se espalhando rapidamente em todo o mundo (AGUILAR;

TWARDOWSKI; WOHLGEMUTH, 2019). E deve ser entendida como uma economia onde os elementos básicos para materiais, produtos químicos e energia são derivados de fontes renováveis, de origem vegetal e animal, por exemplo (OECD, 2009).

Apesar das diferentes definições de bioeconomia, muitas semelhanças existem entre os conceitos. Para a Comissão Europeia, a bioeconomia é focada em biorecursos e sua conversão em alimentos, rações, produtos de base biológica e bioenergia, incluindo agricultura, silvicultura, pesca, alimentos, produção de celulose e papel, bem como partes das indústrias química, biotecnológica e energética (OECD, 2009; GEOGHEGAN-QUINN, 2012). Por sua vez, as definições focadas na bioindústria abordam os setores de energia renovável e industrial, com forte perspectiva agrícola. Já a bioeconomia orientada para a inovação está relacionada à nutrição, assistência médica e tecnologias convergentes (WESSELER; VON BRAUN, 2017). Os dois primeiros conceitos vão ao encontro das definições apresentadas por (BUGGE; HANSEN; KLITKOU, 2016), acerca da visão biotecnológica e de biorecursos, na qual enfatiza-se a importância da pesquisa em biotecnologia e sua aplicação e comercialização nos diferentes setores da economia por meio do desenvolvimento e processamento de matérias-primas biológicas, aliando o estabelecimento de novas cadeias de valor (BUGGE; HANSEN; KLITKOU, 2016). E serão essas as definições de bioeconomia que seguiremos para fins de análise e desenvolvimento deste trabalho.

Embora o conceito de bioeconomia ou economia de base biológica tenham sido utilizados no início dos anos 2000 (KAMM; KAMM, 2004), foi em meados dessa mesma década que essa temática adquiriu evidência nas discussões políticas da União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2012), e dos Estados Unidos (THE WHITE HOUSE, 2012).

Na maioria dos países, o desenvolvimento de estratégias de políticas de bioeconomia é motivado pelos desafios do século XXI, como mitigação das mudanças climáticas, segurança alimentar global e gerenciamento sustentável de recursos (WESSELER; VON BRAUN, 2017). Os USA em 2012 por meio da White House lançaram o *National Bioeconomy Blueprint*, reconhecendo os benefícios da bioeconomia para segurança energética e sustentabilidade ambiental, enquanto reduz a dependência social dos recursos fósseis (THE WHITE HOUSE, 2012). É reconhecido ainda a biotecnológica como impulsionadora para o crescimento da bioeconomia, aliado ao desenvolvimento de força de trabalho competente por meio do treinamento de estudantes como um imperativo estratégico para uma forte bioeconomia (THE WHITE

HOUSE, 2012). O foco americano na bioeconomia iniciou-se através do desenvolvimento de biocombustíveis de primeira geração (etanol, biodiesel etc.), e posteriormente se moveu ao longo dos anos em direção a uma abordagem mais ampla, como a geração de bioprodutos para uso industrial, alimentar e civil (GUO; SONG, 2019).

No caso da União Europeia, além do desenvolvimento de uma bioeconomia orientada para o futuro, em que os recursos renováveis substituem materiais e produtos químicos à base de petróleo, atendendo requisitos ambientais, sociais e econômicos para o desenvolvimento sustentável. Assim, os seus principais objetivos geoestratégicos referem-se a uma independência energética com a minimização da importação de petróleo e uma maior utilização dos recursos domésticos (THORENZ et al., 2018).

Apesar dos inúmeros benefícios, a bioeconomia atual está sob severas críticas. O uso indevido e indiscriminado da utilização industrial da biomassa agrícola vem sendo associado a preocupações ecológicas e éticas (WENG et al., 2019). O uso de terras agricultáveis para o cultivo de matérias-primas é limitado e, portanto, as aplicações industriais dessa biomassa podem competir com a produção de alimentos, elevando a pressão sobre os recursos ambientais e gerando efeitos negativos em seres humanos, animais e plantas (ASHWATH; KABIR, 2019; GHOSH; WESTHOFF; DEBNATH, 2019). Aliado a isso, as emissões reduzidas de CO₂ são superestimadas. Apesar do crescimento das importações de biomassa, a bioeconomia simplesmente se expandiu sem uma dependência decrescente paralela dos combustíveis fósseis (EUROPEAN COMMISSION, 2015).

Pensando em um desenvolvimento sustentável, as economias baseadas em recursos biológicos renováveis não devem impactar na produção de alimentos e nem causar degradação ambiental ou consequências socioeconômicas negativas às futuras gerações (BENNICH; BELYAZID, 2017). Dessa forma, é fundamental encontrar novas formas de produção de energia e de produtos necessários para a sociedade moderna.

2.3. Biocombustíveis

Os biocombustíveis dependem da conversão fotossintética da energia solar em energia química. Dependendo da origem e da tecnologia de produção, os biocombustíveis (Figura 1), são classificados em primeira, segunda, terceira e quarta geração (ACHEAMPONG et al., 2017).

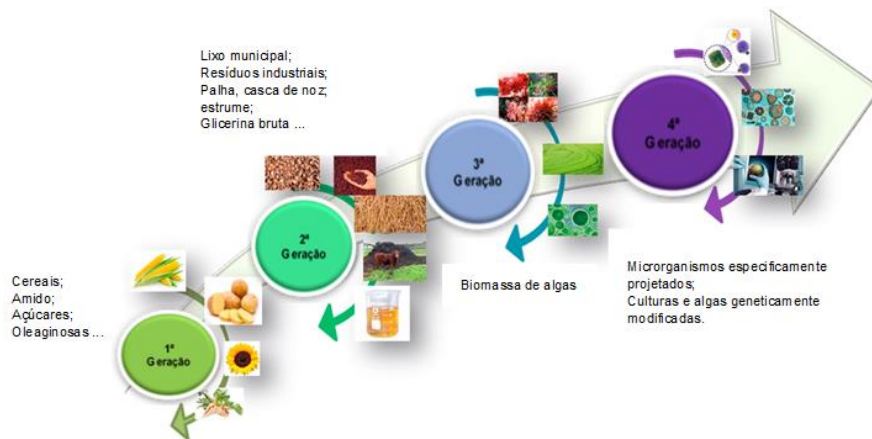


Figura 1- Gerações de produção de biocombustíveis
 Fonte: Adaptado de Acheampong et al., (2017).

2.3.1 Biocombustíveis de primeira geração

Os biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de culturas ricas em amido ou/e açúcar (Figura 2) (GÓMEZ et al., 2011). O etanol proveniente da cana-de-açúcar (RUDORFF et al. 2010) e milho (PIMENTEL; PATZEK, 2005) e o biodiesel derivado da soja (BERGMANN et al. 2013; SOUZA, SEABRA; NOGUEIRA, 2018) e de colza (AYRES 2014; SOUZA, SEABRA; NOGUEIRA 2018) são os principais produtos da cadeia global de combustíveis renováveis. No entanto, por serem oriundos de matérias-primas de dupla aptidão podem ser destinados direta ou indiretamente à alimentação humana, promovendo discussão sobre segurança alimentar (CARLSON et al., 2012a; CASSIDY et al., 2013; FITZHERBERT et al., 2008; RULLI et al., 2016b; TOMEI; HELLIWELL, 2016), uso da terra e ambiental (ASHWATH; KABIR, 2019).

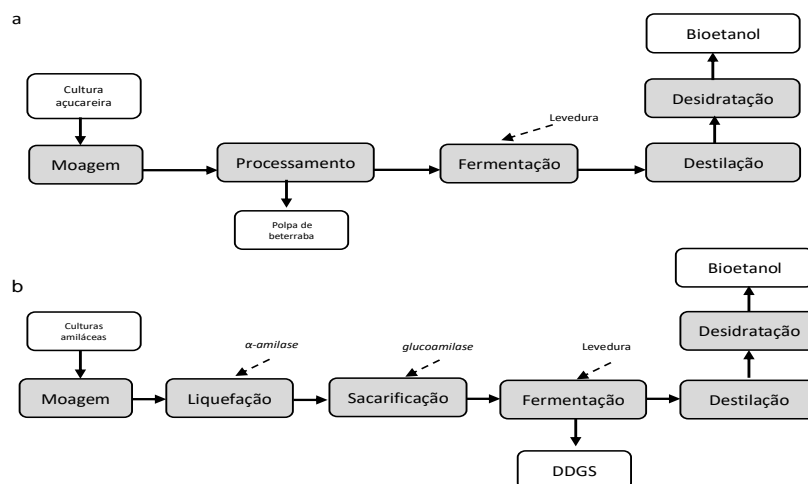


Figura 2- Processo de produção de etanol de primeira geração; (a) a partir açúcar; (b) a partir de amido.
 Fonte: Adaptado de Gómez et al., (2011).

2.3.2 Biocombustíveis de segunda geração

Os biocombustíveis de segunda geração são os combustíveis provenientes de biomassa lignocelulósica (Figura 3), tais como a palha, bagaço, resíduo florestal e culturas energéticas (NAKANISHI et al., 2017; FARIAS; MAUGERI FILHO, 2019). Essas matérias-primas requerem pré-tratamento, incluindo o uso de misturas enzimáticas complexas antes da fermentação para produzir etanol, hidrogênio e álcoois mistos (EGGERT; GREAKER, 2014).

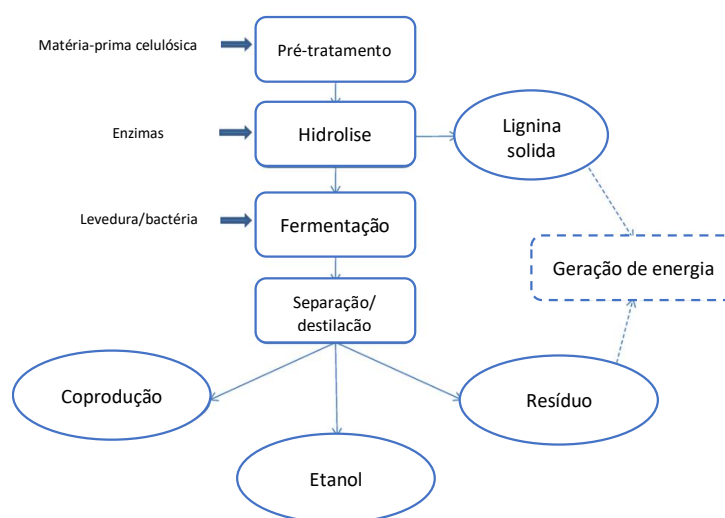


Figura 3- Processo de conversão bioquímica de etanol de segunda geração.
Fonte: Adaptado de Eggert e Greaker (2014).

Essa tecnologia de produção surgiu com o intuito de maximizar a produção de biocombustíveis frente às fontes fósseis, emissões de CO₂, menor demanda por área agricultável e menor concorrência com a produção de alimentos (CARRIQUIRY; DU; TIMILSINA, 2011). Entretanto, apesar dos inúmeros esforços para solucionar os problemas da geração anterior de biocombustíveis, estes objetivos não foram totalmente alcançados. Assim, de certa forma, ainda há concorrência com a produção de alimentos, pois as novas matérias-primas não alimentares continuam a ser cultivadas em terras férteis (KOIZUMI, 2014, 2015; STREBKOV, 2015). Ademais, essas tecnologias, incluindo biológicas e termoquímicas, não são competitivas em termos de custo com a produção de biocombustíveis de primeira geração (LALMAN et al., 2016)

2.3.3 Biocombustíveis de terceira geração

Biocombustíveis de terceira geração, assim chamados os combustíveis de algas e microalgas (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; DRAGONE et al., 2010), são radicalmente

novos e tidos como as opções mais sustentáveis para a produção de etanol, biodiesel, biogás e biohidrogênio (SCHNEIDER et al., 2012; CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015) (Figura 4). Portanto, são considerados como uma fonte atraente e promissora, podendo potencialmente preencher o *gap* energético de maneira sustentável (SARSEKEYEVA et al., 2015).

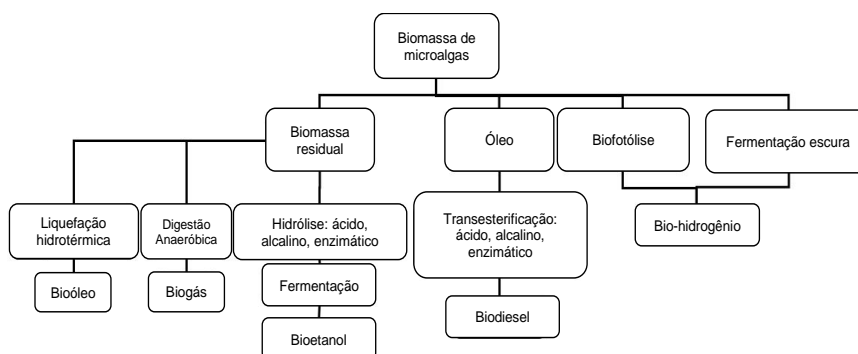


Figura 4- Diagrama dos principais processos de transformação de biomassa de microalgas para produção de biocombustíveis.

Fonte: adaptada de Schneider et al., (2012).

A produção de biocombustíveis de terceira geração baseia-se sobretudo na capacidade de microalgas produzirem elevadas quantidades de ácidos graxos utilizando apenas a luz solar, o dióxido de carbono e a água (CHISTI, 2007, 2008; CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015; GOUVEIA et al., 2017; MILANO et al., 2016; CHOWDHURY; LOGANATHAN, 2019). Apresentam vantagens relevantes em comparação às gerações anteriores, podendo ser cultivadas em terras marginais, todo ano e apresentam maior rendimento de óleo em comparação a plantas oleaginosas (DEMIRBAS, 2011; DUTTA; DAVEREY; LIN, 2014). Entretanto, apresentam limitações na colheita, processos de extração de óleo e fornecimento de CO₂ para uma alta eficiência na produção de microalgas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; ENAMALA et al., 2018; JAGADEVAN et al., 2018).

2.3.4 Biocombustíveis de quarta geração ou microbianos

O desenvolvimento de ferramentas de biologia sintética faz surgir à quarta geração de biocombustíveis (ATSUMI; CONNOR, 2010; GHIM et al., 2010; LEE et al., 2008a; LÜ; SHEAHAN; FU, 2011). Para alguns autores, os biocombustíveis de quarta geração com base na biologia sintética utilizam-se apenas de microrganismos fotossintetizantes, como microalgas e cianobactérias (Figura 5), por exemplo (SCAIFE et al., 2015; ARO, 2016; LALMAN et al., 2016) .

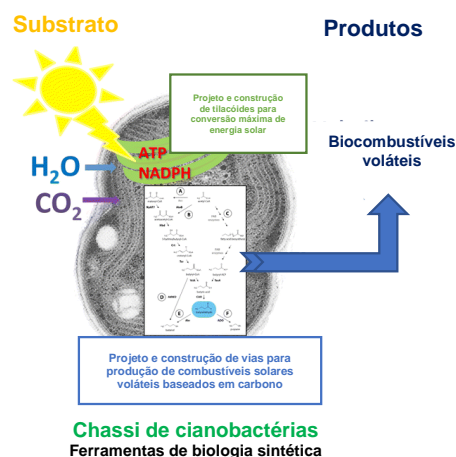


Figura 5- Microrganismos fotossintéticos projetados para secretar o biocombustível.
Fonte: Adaptado de Aro (2016).

Neste trabalho consideramos biocombustíveis de quarta geração produzidos além de microalgas (LACKNER, 2016; ARORA et al., 2019; ZABED et al., 2019) e cianobactérias (GOMAA; AL-HAJ; ABED, 2016; BABELE; SANTOS-MERINO; SINGH; DUCAT, 2019; YOUNG, 2019; NG; KESKIN; TAN, 2020), usando leveduras (LI; BORODINA, 2015; DARVISHI et al., 2017, 2018; LAZAR; LIU; LIU et al., 2016; CHUBUKOV et al., 2018; MADHAVAN et al., 2017a; STEPHANOPOULOS, 2018; HU et al., 2019;), bactérias (MCLEOD; NERLICH; MOHR, 2017; PHELAN et al., 2017; TIAN et al., 2019; LOUHASAKUL et al., 2020) e fungos (AMORES et al., 2015; HILLMAN; READNOUR; SOLOMON, 2017; MARTINS-SANTANA et al., 2018; ZHAO et al., 2018; SHARMA; XU; QIN, 2019) que de alguma forma foram projetados ou modificados usando abordagens de biologia sintética para produção de biocombustíveis.

O desenvolvimento e construção de fábricas vivas de potencial industrial empregando abordagens de biologia sintética visa superar esses desafios das gerações de biocombustíveis anteriores e aumentar a concentração e a produtividade de biomoléculas precursoras de biocombustíveis nesses alvos (LAMSEN; ATSUMI, 2012; MADHAVAN et al., 2017b; JAGADEVAN et al., 2018; ARORA et al., 2019).

2.3.1.1. Biocombustíveis microbianos derivados do álcool

Dentre os biocombustíveis derivados de álcool, o etanol (CH₃CH₂OH) é o combustível líquido mais utilizado no mundo. Também é conhecido como álcool etílico produzido a partir da fermentação microbiana de milho, batata, grão (trigo, cevada e centeio), beterraba sacarina, cana de açúcar, biomassa lignocelulósica e resíduos

agrícolas. A levedura *S. cerevisiae* domina a fermentação do etanol a partir de matérias-primas à base de açúcar, contudo não são degradadores naturais de arabinose (BUSCHKE et al., 2013) e xilose (BANERJEE et al., 2010; MOYSÉS et al., 2016), sendo necessário uso de engenharia de vias para tornar esse açúcar acessível em processo de fermentação (LEE; JIN, 2017; BRACHER et al., 2018).

Além disso, a levedura *S. cerevisiae* sofre com a recalcitrância da biomassa (HIMMEL et al., 2007; SOMERVILLE et al., 2010), diminuindo o rendimento e elevando os custos de fermentação microbiana (YANG; WYMAN, 2007). Para superar esses problemas, avanços das ferramentas em metagenômica (CHEN et al., 2018a), sistemas de comunicação ortogonais (BERVOETS et al., 2018) e engenharia metabólica (HOLLINSHEAD; HE; TANG, 2014; LI; LIAO, 2015; DU et al., 2019) vem sendo desenvolvidos na tentativa de resolver os estágios críticos do processo de fermentação microbiana e maximizar os rendimentos na produção de etanol celulósico. Recentemente (YE et al., 2019) integraram uma via heteróloga da arabinose fúngica em *S. cerevisiae* com a exclusão do gene da fosfatase PHO13, aumentando a taxa de consumo de arabinose e a produtividade específica de etanol em condições aeróbicas. Em (CUNHA et al., 2019), duas vias (XR/XDH or XI) de assimilação da xilose por *S. cerevisiae*, foram comparadas na produção de etanol em diferentes condições de fermentação, demonstrando resultados satisfatórios para a produção desse combustível a partir de hidrolisados hemicelulósicos não desintoxicados. Por sua vez Mitsui et al., (2019) desenvolvemos um novo método de embaralhamento de genoma usando CRISPR-Cas para melhorar a tolerância ao estresse em leveduras *S. cerevisiae*.

Outra rota alternativa para a produção de álcoois é por meio da bactéria *E. coli* devido à sua capacidade de usar pentose e hexose (KOPPOLU; VASIGALA, 2016). Em sua pesquisa Sun et al., (2018a) desenvolveram com sucesso um bioprocesso eficiente utilizando uma cepa de *E. coli* para produção de etanol e recuperação de xilose a partir do hidrolisado de espiga de milho. A utilização regulada de glicose apresentou metabolismo eficiente para açúcares mistos em hidrolisados lignocelulósica e, portanto, maior produtividade da produção de etanol (SUN et al., 2018b). Na mesma perspectiva, a engenharia metabólica vem sendo estudada para proporcionar a utilização simultânea de glicose e xilose nessa bactéria (KIM et al., 2019) para produção de etanol. Outra bactéria gram-negativa com potencial biotecnológico é a *Klebsiella pneumoniae*, amplamente utilizada em consórcios microbianos, na tentativa de melhorar a tolerância à xilose para a produção de etanol (GUO et al., 2018). As análises proteômicas (ALLEN et al., 2017)

e metabolômica diferencial (WANG et al., 2017b) oferecem novas rotas e perspectivas para a produção de n-butanol em *K. pneumoniae* (PARK; RATHNASINGH; SONG, 2017).

Uma rota alternativa para a produção de álcoois consiste no uso de microrganismos fotossintetizantes como microalgas e cianobactérias. Esses organismos microbianos representam uma opção sustentável e renovável para a produção de substitutos aos combustíveis fósseis. Também, ao usar o CO₂ atmosférico como fonte de carbono, a produção de combustível poderia potencialmente reduzir ou retardar o acúmulo desse gás na atmosfera (KITCHENER; GRUNDEN, 2018). Para alcançarmos a produção de álcoois a partir de tais microrganismos três rotas podem ser usadas, a tradicional envolvendo hidrólise e fermentação de biomassa com bactérias ou leveduras, a via escura de fermentação e o uso de cianobactérias modificadas (DE FARIAS SILVA; BERTUCCO, 2016). Em método tradicional, (EL-DALATONY et al., 2016) usando fermentação simultânea por sacarificação (SSF), alcançaram a produção de 10,5 g/L de etanol a partir da biomassa de microalgas empregando *S. cerevisiae*. Recentemente, Sivaramakrishnan e Incharoensakdi, (2018) alcançaram um rendimento de 93% em etanol após a fermentação de hidrolisado de microalga com *S. cerevisiae*.

Embora ainda existam desafios na utilização desses microrganismos em cianobactérias, estas são consideradas as fábricas vivas mais promissoras para a árdua tarefa de substituir os compostos fósseis (NOZZI; OLIVER; ATSUMI, 2013). A maioria dos trabalhos nesses microrganismos fotossintetizantes pautam-se em aumentar a fixação de carbono, expandindo a quantidade desse elemento disponível nas células para a formação dos produtos desejados (OLIVER et al., 2016) (GAO et al., 2016). A maioria dos trabalhos nesses microrganismos fotossintetizantes pautam-se em aumentar a fixação de carbono, aumentando assim a quantidade de carbono disponível nas células para a formação dos produtos desejados (LIANG et al., 2018). Um significativo número de compostos à base de carbono já foi produzido com sucesso a partir do CO₂ usando a luz solar como recurso energético em cepas de cianobactérias em função dos avanços genéticos (KARATAY; DÖNMEZ, 2011). Um exemplo é o isobutanol, candidato promissor para substituir o uso da gasolina em motores de ciclo Otto, que pode ser obtido diretamente a partir da *S. elongatus* com a adição da enzima desidrogenase alcoólica, atingindo 450 mg/L em 6 dias (ATSUMI; HIGASHIDE; LIAO, 2009a). O uso de enzimas heterólogas em *S. elongatus* possibilitou o desvio do fluxo de carbono de piruvato para a produção de 2,3-butanodiol, com produção de 2,4 g/L em 21 dias

(OLIVER et al., 2013). A otimização metabólica por meio da eliminação de vias concorrentes, maximização do fluxo de vias e melhoria da tolerância são necessárias. Em um trabalho recente, a identificação e caracterização funcional de um novo RNA CoaR (CoA Biosynthesis Regulatory sRNA) que regula a biossíntese da coenzima A e a tolerância a 1-butanol em *Synechocystis sp. PCC 6803* forneceu novas dimensões em relação aos mecanismos de regulação de vias essenciais e também acerca da tolerância à biocombustíveis (SUN et al., 2017), promovendo avanços na análise de tolerância em microrganismos fotossintéticos.

Tendo o etanol como principal biocombustíveis, o Syngas ou gás de síntese emergiu como um produto secundário promissor gerado pela fermentação de biomassa (ASIMAKOPOULOS; GAVALA; SKIADAS, 2018). Esse biocombustível é uma mistura de gases (CO, CO₂ e H₂) que podem ser produzidos a partir da gaseificação de biomassa. A proporção de cada gás irá depender da biomassa usada, do gaseificador e dos parâmetros operacionais do processo de gaseificação (MOLINO; CHIANESE; MUSMARRA, 2016; SUSASTRIAWAN; SAPTOADI; PURNOMO, 2017; YAGHOUBI et al., 2018). O processo de fermentação de Syngas apresenta vantagens significativas quando comparada a processos termoquímicos (BENALCÁZAR et al., 2017)

2.3.1.2. *Biocombustíveis microbianos derivados do ácido graxo*

A produção microbiana de derivados de ácidos graxos proporciona uma oportunidade para fornecer de forma sustentável biocombustíveis e oleoquímicos. Não é novidade que o uso de microalgas tem um enorme potencial energético em condições fisiológicas adversas (ARORA et al., 2019), sem competir com a produção de alimentos, sendo reconhecido como uma fonte propícia para a produção sustentável de combustíveis de base biológica. Podem ser cultivadas em terras marginais (CHISTI, 2008) e águas residuais (DAVIS et al., 2015; POPKO et al., 2016) que reduzem a necessidade de nutrientes para as células. Os avanços ferramentais de biologia sintética e engenharia reversa abriram o caminho para desvendar novas vias metabólicas que ocorrem dentro das células ou para projetar e sintetizar novos sistemas biológicos para a produção de biocombustíveis em microalgas (GIMPEL et al., 2013; JAGADEVAN et al., 2018).

Nesse contexto, a pesquisa se concentra na genômica dos metabolismos lipídicos das microalgas (WANG et al., 2018a), esclarecendo a origem, a função e as propriedades celulares reduzidas na formação e acúmulo de lipídios. O desempenho de novos

promotores sob condições de falta de nitrogênio também é estudado neste microrganismo fotossintético (ADLER-AGNON et al., 2018). Outra técnica essencial para melhorar o conteúdo lipídico em microalgas concerne ao desenvolvimento de estratégias de engenharia do genoma. O sistema CRISPR-Cas9 vem sendo utilizado com sucesso em *Chlamydomonas*, *diatomáceas* e *Nannocloropsia* (KONG et al., 2019a). Um número considerável de modificações genética induzidas por CRISPR/Cas9 nos locais MAA7, CpSRP43 e ChIM (SHIN et al., 2016) e nos genes CpFTSY e ZEP (BAEK et al., 2016) em *Chlamydomonas* foram desenvolvidas para aumentar a produtividade fotossintética e a geração de biomassa e bioprodutos de alto valor. A abstração desses produtos de alto valor facilitará que energia renovável baseada em microalgas se torne uma opção economicamente viável (JAGADEVAN et al. 2018).

As espécies *Synechocystis sp.*, PCC 6803 (BELLEFLEUR; WANDA; CURTISS, 2019a) e *Synechococcus elongatus*, PCC 7942 são exemplos de cianobactérias largamente utilizadas para na produção de ácidos graxos (KAWAHARA et al., 2016). Recentemente cepas *Synechocystis sp.* PCC 6803 sofreram inativação de fator de transcrição *cyAbrB2* (KAWAHARA et al., 2016; KODAMA et al., 2018) e LexA (KIZAWA et al., 2017) presente no conjunto de genes necessários para o metabolismo dos ácidos graxos, conferindo maior produtividade dessa biomolécula. Nesse sentido Bellefleur et al., (2019b) realizaram a caracterização de mecanismos de transporte de ácidos graxos livres e antibióticos em *Synechocystis sp.* PCC 6803 na tentativa de uma maior eficiência da produção química dentro da célula cianobacteriana. Para os autores, as proteínas codificadas por *slr2131* e *slr0180* em efluxo químico são responsáveis pela maximização da tolerância aos antibióticos nesses microrganismos fotossintéticos (BELLEFLEUR; WANDA; CURTISS, 2019b).

Tentativas de redirecionar o fluxo de carbono do metabolismo central de carboidratos para a síntese de bioprodutos também vem sendo desenvolvido nesses microrganismos (SUN et al., 2018c). Os autores introduziram estratégias reguladoras metabólicas eficientes e valiosas para cianobactérias fotossintéticas usando pequenos RNAs artificiais em cepas de *Synechocystis sp.* O modelo de cianobactéria, *Synechococcus elongatus* PCC 7942 foi projetado para produzir ácidos graxos livres (AGL), potenciais precursores de biodiesel, por nocaute genético da acil-ACP sintetase de reciclagem de AGL e expressão de uma tioesterase para liberação do AGL (RUFFING; JONES, 2012). Para (SANTOS-MERINO; GARCILLÁN-BARCIA; DE LA CRUZ, 2018) a composição de ácidos graxos em cepas de *S. elongatus* PCC 7942 pode ser

significativamente modificada por engenharia de expressão de genes que codificam as enzimas envolvidas nas primeiras reações da via de síntese de ácidos graxos.

Bactérias e Leveduras também apresentam potencial para a produção de precursores de biocombustíveis a partir de ácidos graxos. Contudo, a biossíntese de ácidos graxos em *S. cerevisiae* difere da bactéria *E. coli*, pois nessa o processo é realizado por ácidos graxos é realizada por ácidos graxos sintase do tipo II (SAF) que consistem em enzimas monofuncionais discretas (KOCH; SCHMIDT; DAUM, 2014; ZHOU et al., 2014) que projetaram *E. coli* com um fator de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos na produção de biodiesel, levando a um aumento do título em 28% do máximo teórico. Na mesma perspectiva (SHERKHANOV et al., 2016) demonstraram uma estratégia para produzir FAMEs em *E. coli* e relataram um título de FAME de 0,56 g/L, um aumento de 35 vezes em relação aos títulos nesse microrganismo. Na *S. cerevisiae* a síntese de ácidos graxos ocorre no citoplasma e nas mitocôndrias. A maioria dos lipídios funcionais e de armazenamento é sintetizada pelo citosol tipo I FAS, que é consiste em complexo dimérico multifuncional responsável pela síntese de ácidos graxos a partir de malonil-CoA e acetil-CoA (GUARAGNELLA et al., 2018; KASTANIOTIS et al., 2017). Usando expressão endógena e heteróloga em uma β -cetoacil-CoA sintase em *S. cerevisiae* demonstraram um aumento significativo em ácidos graxos monoinsaturados (C20:1, C22:1 e C24:1) (WENNING et al., 2019). Nessa levedura alguns estudos focam na superexpressão de fatores de transcrição-STB5 na biossíntese, fisiologia e transcriptoma de ácidos graxos (BERGMAN et al., 2019). Os autores sugerem uma superexpressão leve a moderada de STB5 em cepas de *S. cerevisiae* com excelente capacidade de consumir o NADPH durante a formação do produto para assim obter um desempenho adequado de ácidos graxos (BERGMAN et al., 2019).

As leveduras não nativas da espécie *Y. lipolítica* e apresentam potencial industrial para futuras plataformas produtoras de ácidos graxos a partir de rotas baratas e renováveis (MARKHAM; ALPER 2018) devido à sua capacidade de produção de lipídios. Rendimentos de biomassa e de lipídios em *Y. lipolítica* foram atualizados para produzir 98,9 g/L de éster metílico de ácidos graxos (FAME) a partir de glicose, com um rendimento de 0,269 g/ge e uma produtividade de 1,3 g/L/h (QIAO et al., 2017). Recentemente, a ferramenta CRISPR-Cas9 foi aplicada com sucesso em *Y. lipolytica* para manipulação orientada à genômica (ADLER-AGNON et al., 2018) (GAO et al., 2018).

3. Metodologia

Este capítulo tem por finalidade fundamentar os leitores sobre a proposta metodológica desta tese. A partir da leitura científica mundial ocorreu o primeiro contato com a temática da biologia sintética. O tema surgiu no contexto científico e tecnológico como uma nova disciplina amplamente utilizada para projetar e construir novas peças biológicas, dispositivos e sistemas não existentes e/ou redesenhar sistemas biológicos já existentes para usos úteis (BENNER; SISMOUR, 2005; KHALIL; COLLINS, 2010; CAMERON; BASHOR; COLLINS, 2014).

Como comentado na definição da problemática deste trabalho, o uso de abordagens e ferramentas de biologia sintética para a produção de biocombustíveis não são inéditas (KAZNESSIS, 2007). Entretanto, em virtude dos avanços ferramentais nos últimos anos, essa temática evoluiu para um novo estágio de desenvolvimento científico e tecnológico, com potencial de desenvolver a produção de biocombustíveis microbianos e proporcionar uma mudança nos sistemas de produção usando cada vez mais matérias-primas de baixo custo para produção de bens necessários para a sociedade moderna, desenvolvendo e ampliando a bioeconomia sustentável no futuro próximo (LOKKO et al., 2018; PHILP, 2018; WURTZEL et al., 2019; KITNEY et al., 2019; CHEN et al., 2020).

Na tentativa de responder as inquietações científicas descritas até esse momento, o presente estudo foi estruturado em dois artigos científicos interrelacionados, convergindo para a temática central do uso de ferramentas de biologia sintética para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa não alimentar, respondendo assim aos problemas de pesquisa. Cada artigo científico possui uma abordagem metodológica específica.

3.1. Synthetic Biology in the Bioeconomy of Non-Food-Competing Biofuels

No primeiro artigo (capítulo 4), intitulado, “Synthetic Biology in the Bioeconomy of Non-Food-Competing Biofuels” examinamos países, instituições e autores mais ativos e monitoramos a trajetória e a evolução da pesquisa em biologia sintética relacionada aos biocombustíveis ao longo do tempo, identificando possíveis direções científicas e formulações políticas para um mundo focado em uma bioeconomia sustentável. Neste estudo cientométrico, artigos e revisões sobre biologia sintética relacionados à

biocombustíveis foram analisadas por meio do Software CiteSpace (SYNNESTVEDT, CHEN; HOLMES 2005; CHEN 2006).

A cientometria é definida como o estudo quantitativo da ciência (WILKEN et al., 1979), ou o "estudo quantitativo da ciência, comunicação na ciência e política científica" (HESS, 1997, p. 75). Os principais interesses desse campo referem-se ao desenvolvimento e aplicação de técnicas, métodos, ferramentas e indicadores quantitativos destinados a analisar a interação entre os domínios científicos e tecnológicos. Aliado aos processos de melhoria concernentes a fatores sociais, estruturas cognitivas e sócio-organizacionais na área científica e política (VAN RAAN, 1997).

Na prática a cientometria está ligada a noção central da citação, difundida por (GARFIELD, 1955) para recuperação de informações científicas. Diferentes técnicas usam a noção central de citação, como a cocitação de autoria (CHEN et al., 2012; ERFANMANESH; ROHANI; ABRIZAH, 2012; ZHANG; LYU; YAN, 2015; ZHAO, 2017; HOU; YANG; CHEN, 2018), acoplamento bibliográfico (HUANG; CHIANG; CHEN, 2003; BOYACK; KLAVANS, 2010), co-citação de cluster (FANG, 2015; XIANG; WANG; LIU, 2017; LIU et al., 2018), co-citação de documentos (HU et al., 2011; HOU; YANG; CHEN, 2018) e co-word (RAVIKUMAR; AGRAHARI; SINGH, 2015) vem sendo desenvolvidas, permitindo uma captura e mapeamento mais amplo e conciso de uma área de conhecimento específico, identificando padrões estruturais e traçando fronteiras importantes da pesquisa através de fórmulas matemáticas e representações gráficas (OLAWUMI; CHAN, 2018).

Um avanço na análise foi a introdução do conceito de redes, promovendo uma melhoria na visualização de dados matemáticos. A representação de uma grande quantidade de dados e informações nas frentes de pesquisa permite que o espectador visualize todo o corpus e desenvolva insights substanciais com base em sua interpretação (CHEN; PAUL; O'KEEFE, 2001). Alguns dos estudos recentes nessa direção incluem a visualização do domínio científico (CHEN; HOLMES, 2005; NIAZI; HUSSAIN, 2011; POLLACK; ADLER, 2015; SYNNESTVEDT; HE et al., 2017; JIN; LI, 2019) e tecnológico (YOON; KIM, 2012; ÉRDI et al., 2013; YOON; PARK; KIM, 2013; KO et al., 2014; ALSTOTT et al., 2017).

A cientometria baseia-se na análise quantitativa dos avanços científicos e tecnológicos, principalmente nos resultados da pesquisa para os quais intuimos medir o impacto, servindo como proxy para novos desenvolvimentos científicos e políticos. Além

de medir o impacto no meio acadêmico, a análise pode ser usada para avaliar as relações de colaboração geográfica nas atividades inventivas e desenvolvimento tecnológico.

2.3.5 *Coleta dos dados*

Os dados científicos deste trabalho foram coletados na plataforma Web of Science - Clarivate Analytics (<https://apps.webofknowledge.com>) usando palavras-chaves selecionadas (Apêndice A). Para uma cobertura abrangente do campo da biologia sintética, diferentes termos foram usados na análise (JARBOE et al. 2010). Também incluímos termos relacionados à engenharia metabólica, entendida como abordagem técnica para o funcionamento adequado das fábricas vivas projetadas (NIELSEN; KEASLING 2011; JULLESSON, DAVID, PFLEGER; NIELSEN, 2015).

2.3.6 *Análise dos dados*

O conjunto dos dados (publicações) foi importado para o software CiteSpace, cujo período de busca compreendeu os anos de 1999 a 2018. O CiteSpace fornece análises de co-instituição, co-país, co-citação e co-ocorrência (CHEN, 2006). O software combina métodos de visualização de informações, bibliometria e algoritmos de mineração de dados em uma ferramenta de visualização interativa para a extração de padrões em dados de citações (SYNNESTVEDT; CHEN; HOLMES, 2005; Chen 2006). O mapeamento de rede é obtido pela visualização de cluster, linha de tempo e exibição de fuso horário. A visão da linha do tempo atenta-se ao relacionamento entre os agrupamentos, enquanto a visão do fuso horário se concentra na explicação da evolução do conhecimento. O mapeamento de rede é interpretado pela seleção de “nós” especiais com alta frequência, centralidade de intermediação e análise de rajadas (CHEN, 2006).

As 50 referências mais citadas para cada ano no período escolhido foram selecionadas para mapear as redes de co-citação. O dimensionamento da rede Pathfinder foi adotado para remover cada rede e remover os links redundantes entre os nós (CHEN, IBEKWE-SANJUAN; HOU, 2010).

As variáveis analisadas corresponderam a países, instituições e autores com base na rede de co-citação. Esta, por sua vez, foi empregada para visualizar os grupos de pesquisa e detectar desenvolvimentos notáveis no campo científico por meio de agrupamentos. O método enfatiza as inter-relações entre os membros de um cluster de co-citação e seus citadores (CHEN et al. 2010). Os artigos e palavras-chave foram analisados usando o algoritmo de detecção de burst de Kleinberg (2003).

As análises de co-citação são características da análise do domínio do conhecimento, entendida como uma área interdisciplinar de pesquisa voltada para o mapeamento, mineração de conteúdo, classificação e análise do conhecimento, com ferramentas que possibilitam sua apresentação e navegação (SHIFFRIN; BÖRNER, 2004; OLMEDA-GÓMEZ et al., 2017).

Além disso, utilizamos o instrumento de sobreposição de mapa duplo para analisar a evolução da literatura científica em biocombustíveis relacionados à biologia sintética. A sobreposição de periódicos de mapa duplo fornece um mapa global do crescimento da literatura no nível acadêmico (CHEN; LEYDESDORFF, 2014), mostrando a relação entre as distribuições dos periódicos citados e os citados na literatura e revela a evolução da distribuição com o tempo (HOU; YANG; CHEN, 2018).

2.3.7 Métricas

As propriedades das redes foram mensuradas através de métricas estruturais e temporais. As métricas estruturais incluem a modularidade, silhueta, densidade de rede e centralidade de intermediação, ao passo que as métricas de densidade de rede expressam o grau de proximidade nas relações entre cada nó, ou seja, a proporção entre o número de arestas reais na rede e o número total possível de arestas (HU; LIN; WILLET, 2019). Assim, baixa densidade denota que os vínculos entre os diferentes nós não são muito próximos, portanto, há pouca cooperação entre eles (MA; YU; CHEN, 2019; LIU; WANG, 2020). A densidade da rede é expressa pela seguinte Equação (1):

$$d = \frac{l}{n(n-1)/2} \quad (1)$$

Onde: l representa o número real de linhas existentes entre os pontos e o valor máximo da densidade é 1, mostrando o quanto uma rede é estruturada (SCOTT 2007; GUANGFEN; DONGKE, 2017).

A modularidade Q mede até que ponto uma rede pode ser dividida em blocos independentes, variando de 0 a 1. Quanto mais próxima de 1, mais estruturada será a rede (CHEN; IBEKWE-SANJUAN; HOU, 2010). O algoritmo de modularidade foi proposto por (NEWMAN; GIRVAN, 2004) e é expresso pela seguinte Equação (2):

$$Q = \sum_i (e_{ii} - a_i^2) \quad (2)$$

Onde: i denota o número de comunidades que foram divididas, e ii representa a proporção de linhas internas da comunidade e todo o mapeamento. Se o resultado de agrupamento é mais eficaz, as linhas internas de comunidade são mais, o que corresponde aos valores maiores de e_{ii} , teremos maiores valores Q . E $0 \leq Q < 1$, valores que se aproximam de $Q=1$, que é o máximo, indica uma rede com forte estrutura

de comunidade. Na prática, os valores para redes geralmente caem na faixa de cerca de 0,3 a 0,7. Uma vez que valores $Q > 0,3$, o resultado do agrupamento é eficaz e a estrutura da comunidade é significativa.

A métrica da silhueta desenvolvida por Rousseeuw (1987) é útil para estimar a incerteza envolvida na identificação da natureza de um cluster (CHEN et al. 2010). O valor da silhueta de um cluster varia de -1 a 1. O valor de 1 representa uma separação perfeita de outros clusters (CHEN, IBEKWE-SANJUAN; HOU, 2010), o nível mais alto de homogeneidade (CHEN 2017). Para uma única amostra, o coeficiente médio da silhueta é expresso de acordo com a Equação. (3):

$$Silhouette = \frac{b-a}{\max(a,b)} \quad (3)$$

Onde: "a" é a distância média entre essa amostra única e outras amostras da mesma classe, "b" é a distância média entre essa amostra única e amostras nas diferentes categorias mais próximas e $\max(a, b)$ é o maior de a e b.

A métrica de centralidade de intermediação de Freeman é usada para destacar possíveis pontos centrais da mudança de paradigma ao longo do tempo (FREEMAN, 1978). Ele mede o grau em que o nó faz parte dos caminhos que conectam um par arbitrário de nós na rede, com um valor $\geq 0,1$ (FREEMAN 1978; CHEN 2006, 2005). Os altos valores de centralidade de intermediação são identificadores de publicações científicas potencialmente revolucionárias (CHEN, 2005; CHEN; IBEKWE-SANJUAN; HOU, 2010). A centralidade de intermediação é expressa de acordo com a Equação (4):

$$C_B^{w\alpha}(i) = \frac{g_{jk}^{w\alpha}(i)}{g_{jk}^{w\alpha}} \quad \text{Equação (4)}$$

Onde: $g_{jk}^{w\alpha}$ é a soma de todos os caminhos mais curtos entre o nó j e k, e $g_{jk}^{w\alpha}(i)$ é o número desses caminhos mais curtos que passam pelo nó i.

Como métrica temporal, usamos o algoritmo de detecção de burst de Kleinberg. Essa ferramenta analisa se uma função de frequência específica teve flutuações estatisticamente significativas ao longo de um determinado período. Assim, o algoritmo de detecção burst é adaptado para identificar novos conceitos de frente de pesquisa (KLEINBERG 2003; CHEN 2006; CHEN ET AL. 2010).

3.2. Explorando oportunidades tecnológicas em biologia sintética para etanol celulósico: Será o futuro da bioeconomia sustentável

O segundo artigo (capítulo 5), intitulado “Explorando oportunidades tecnológicas em biologia sintética para etanol celulósico: Será o futuro da bioeconomia sustentável?”,

teve por objetivo fornecer uma visão geral dos caminhos, aplicações e tendências em biologia sintética relacionadas a etanol celulósico mediante a análise de patentes.

Os dados de patentes vêm sendo amplamente utilizados na avaliação e previsão de tecnologia (GUSTAFSSON et al., 2015) (KESSLER; SPERLING, 2016) (KARVONEN; KLEMOLA, 2019) (TOIVANEN; NOVOTNY, 2017) (VAN DOREN et al., 2013) (CARBONELL et al., 2016) (RIBEIRO; SHAPIRA, 2020). As patentes são benéficas na determinação da novidade para as empresas, bem como na identificação de propriedade intelectual e competitividade tecnológica dos concorrentes (ABRAHAM; MOITRA, 2001).

Diferentes informações estão contidas em uma patente. Essas informações podem ser obtidas usando diferentes técnicas de análise, capazes de gerar mapas e redes de patentes (CHANG et al., 2010; YOON et al., 2013), nas quais são aplicadas para descobrir implicações significativas nos dados e para visualizar e auxiliar posteriormente na tomada de decisões técnicas, tanto de inventores, quanto de empresas que realizam P&D (ERNST, 2003) e para formulação de políticas econômicas (ARCHIBUGI; Daniele; PIANTA, 1996; KARKI, et al. 1997).

Dentre as técnicas de análise, a mineração de texto desempenha um papel significativo no processo inovador, fornecendo informações valiosas para apoiar a pesquisa e o desenvolvimento do campo analisado (SHAPIRA; YOUTIE, 2006; JU; SOHN, 2015). A mineração de texto pode ajudar e avaliar um grande conjunto de dados sobre os vários segmentos de um domínio tecnológico e também auxiliam na tomada de decisões sobre os principais responsáveis, inventores, empresas e países no respectivo domínio tecnológico (KIM et al., 2008; MUELLER; NYFELER, 2011; SINGH et al. 2016; FANTINEL et al., 2017).

O volume de patentes disponíveis em bancos de dados digitais aumentou rapidamente nos últimos anos. Orbit Intelligence faz parte do portal Questel-Orbit, uma base privada de pesquisa de patentes que abrange mais de 100 autoridades mundiais. As publicações são agrupadas em famílias de patentes (AXONAL, 2015).

2.3.8 Coleta dos dados

A estratégia de busca para recuperar documentos de patentes em biologia sintética relacionados a etanol celulósico consistiu na submissão de palavras-chave criteriosamente selecionadas usando a plataforma Questel-Orbit. A consulta utilizada nesta pesquisa contém três estratégias de busca combinadas nos campos de conceitos,

título e resumo dos documentos de patentes. A primeira estratégia acerca-se das diferentes abordagens e ferramentas relacionadas à biotecnologia utilizadas para projetar e construir novos microorganismos ou plantas. A segunda estratégia de pesquisa contempla os tipos de biocombustíveis relacionados ao etanol. A terceira estratégia investiga fontes de matérias-primas empregadas para a produção desse biocombustível. (Apêndice B).

2.3.9 *Análise das patentes*

Para análise das patentes em biologia sintética relacionadas a etanol celulósico utilizamos diferentes métodos analíticos e visuais disponíveis no Orbit Intelligence, como a ferramenta *analyze* que permite verificar sua distribuição temporal, tendências tecnológicas, principais países e detentores responsáveis.

O Orbit Intelligence agrupa as patentes em famílias, definidas como o conjunto de patentes que abrange a mesma invenção em um ou mais países. Formalmente, contempla o conjunto de patentes depositadas em vários países que são relacionadas entre si por um ou diversos pedidos prioritários comuns (OCDE 2009).

A contagem do número de famílias de patentes evita a dupla contagem de patentes registradas em vários países. Portanto, fornece uma contagem de invenções de patentes, configurando-se como um procedimento capaz de atenuar essas deficiências metodológicas (DE RASSENFOSSE et al., 2013).

A distribuição de depósitos das famílias de patentes em biologia sintética relacionados a etanol celulósico foi realizada para verificarmos o perfil de depósitos dessa tecnologia. Os valores correspondem às quantidades totais de famílias de patentes para o período de 1999 a 2019, acrescidos de uma análise de tendência.

As patentes foram analisadas usando a análise semântica do Orbit Intelligence, que consiste no agrupamento das famílias de patentes de acordo com sua proximidade semântica, auxiliando na identificação dos possíveis clusters tecnológicos.

Para elucidar os principais domínios tecnológicos e aplicações das famílias de patentes analisamos os códigos predominantemente utilizados para classificar as patentes, seguindo a lógica da Classificação Internacional de Patentes (WIPO, 2019). O IPC foi criado na década de 1970 e, atualmente, é administrado pela Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO) e tornou-se um padrão como autoridade de patente em mais de 100 países. Trata-se de um sistema hierárquico de classificação dividido em oito seções e aproximadamente 70.000 subdivisões, sendo que cada uma delas possui um

símbolo que consiste expresso por meio de algarismos arábicos e letras do alfabeto latino. Por sua vez, as seções são subdivididas em 'classes' (por exemplo, 120 na última edição do IPC) e estas são subdivididas em mais de 640 subclasses, que conseguinte são divididas em grupos principais e subgrupos (WIPO, 2019). Além disso, como o código IPC pode ser demasiadamente detalhado para permitir o exame das atividades gerais de patente, classificações mais agregadas podem ser úteis.

Analizamos países prioritários e distribuição de patentes vivas, isto é, o mercado alvo dessas tecnologias de acordo com a distribuição global e a evolução do destino dos pedidos de patente nos últimos 20 anos. A distribuição geográfica de pedidos de patentes foi rastreada a partir do ano da primeira publicação ao invés de sua concessão.

A distribuição de patentes vivas fornece informações relevantes sobre as estratégias de patentes dos atores do setor estudado, pois os registros nacionais configuraram-se como eficientes indicadores dos mercados que precisam ser protegidos.

A análise dos principais censitários é importante para analisar a distribuição dos solicitantes de patentes ativos em um campo de pesquisa. Os requerentes foram analisados pelo seu número de patentes vivas, tamanho médio dessas famílias, índice de generalidade e originalidade. O tamanho e a média de patentes referem-se às patentes ativas e sua amplitude, respectivamente.

O índice de generalidade de uma patente mede até que ponto os avanços técnicos de acompanhamento estão espalhados por diferentes campos tecnológicos. Simplificando, é a largura do impacto de uma patente e pode ser entendido também como a variedade de campos das citações futuras de uma referida patente. Essas futuras citações potencialmente são empregadas para avaliar as gerações posteriores de uma invenção que se beneficiaram de uma determinada patente por meio da mensuração do intervalo de campos de tecnologia e, conseqüentemente, de indústrias que citam essa patente (BRESNAHAN; TRAJTENBERG, 1995; HALL ET AL. 2001; OECD, 2015). A generalidade das patentes pode ser medida pelo índice baseado em citações sugerido por Trajtenberg et al., (1997). Equação (5):

$$\text{generality of patent } i = 1 - \sum_{t=1}^T \left(\frac{NCITED_{it}}{NCITED_i} \right)^2 \quad (5)$$

Onde: $NCITED_i$ denota o total de citações recebidas da patente i ; $NCITED_{it}$ denota a patente i é citações recebidas pelas patentes no campo tecnológico t ; e T é o número de campos tecnológicos.

O índice de originalidade de uma patente indica até que ponto a patente se baseia em amplas raízes tecnológicas, porque é mais provável que esta sintetize conhecimento em uma diversidade de disciplinas. Ou seja, a originalidade mede a amplitude dos campos

tecnológicos nos quais uma patente está pautada (TRAJTENBERG et al., 1997; OECD, 2015). A originalidade das patentes pode ser medida pelo índice baseado em citações sugerido por Trajtenberg et al (1997). Equação (6):

$$\text{originality of patent } i = 1 - \sum_{t=1}^T \left(\frac{NCITING_{it}}{NCITING_i} \right)^2 \quad (6)$$

Onde $NCITING_i$ indica o total de citações feitas pela patente i e $NCITING_{it}$ indica a patente de i citações dirigidas para as patentes no campo tecnológico t .

O cruzamento dos dados geopolíticos e empresariais permite averiguar os principais detentores dessa tecnologia e mercados alvos. ‘Por fim analisamos os gastos econômicos pertinentes as tecnologias, tendo como variáveis os países e seus requerentes.

4. SYNTHETIC BIOLOGY IN THE BIOECONOMY OF NON-FOOD-COMPETING BIOFUELS

Abstract

Environmental, food, and energy security concerns call for new sustainable sources of biobased-products and bioenergy. Recent synthetic biology developments aimed at making biofuels by the design of non-natural biological systems, and the optimization of existent microorganisms. These new bio-factories should supersede the first generation of biofuels, which derive from food-related feedstocks. In this scientometric study, we mapped the scientific literature on synthetic biology related to biofuels to assess the progress of this research field and its relevance for a sustainable bioeconomy. We analyzed the corresponding articles deposited in the Web of Science database, published in a twenty-years interval (from 1999 to 2018). We captured the patterns of co-citation and collaboration between countries, institutions, and authors. With a dual-map overlay tool, we analyzed the relationships of the scientific disciplines in the field in two-time intervals (1999-2008, and 2009-2018). We identified article-bursts and hot-topics using keyword-bursts which represent research landmarks. The most productive and influential research groups were in the United States, and the worldwide leading research institutions were the Chinese Academy of Sciences and the University of California Berkeley. The emergent technological roads focus on the production of non-food-related biofuels, as derived from biomass and atmospheric CO₂, and synthesized by entirely pre-designed biosynthetic systems, using yeast, bacteria, microalgae, and cyanobacteria. The present study shows that synthetic biology is a dynamic interdisciplinary research field that supports innovative technologies for bioenergy production from alternative feedstocks, without competing with food production.

Keywords microbial production; data mining; bibliometric analysis; information science; bioethanol; biodiesel

1. Introduction

Increasing concerns regarding the over-dependence on fossil fuels have spurred demand for agrofuel production, leading to a competition for agricultural land and changes in land use [1,2,3,4]. Ethanol produced from sugarcane in Brazil [5] and corn from the US [6], are the leading commodities within the global renewable fuel supply chain, followed by the production of soybean-derived biodiesel in Brazil [7] [8], and rapeseed-derived biodiesel in Germany [9]. Growth in biofuel production supported by

food-related agriculture has caused the biobased economy to face severe criticism in the global economy discussion [10].

One way to minimize these negative impacts is the use of sources of non-food biomass or wastes. Among the various biomasses with potential for production of bioenergy, lignocellulosic biomass (agricultural and forest residues), algae, municipal waste, industrial effluents, and animal waste are gaining attention as possible feedstocks [11,12,13] due to low cost [14] and high production [15]. However, the high cost and the relatively low efficiency of available enzymes and microorganisms for the transformation of raw residual biomass into biofuels are relevant challenges currently faced by industries [16]. To assist in the transformation of this biomass into biofuels, new biotechnological possibilities, including those emerging from the field of synthetic biology are being used. This includes the design and construction of new live factories, the accurate design of new metabolic pathways, and the generation of effective enzymes [17]. Synthetic biology is an emerging field [18, 19], harmoniously combining science and engineering to design and build new biological parts, non-natural devices or systems, and to redesign existing biological systems for the generation of useful products [20]. This new area of knowledge has become a putative, sustainable alternative for the generation of bioenergy using low-cost bioeconomy substrates [21,22]. The use of synthetic biology tools and approaches provides the opportunity for fermentation and the manufacture of products not naturally generated in large quantities in native microorganisms [23,24].

In the currently used biofuel production processes, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* dominates the fermentation of ethanol from sugar-based feedstocks. However, they are not natural degraders of arabinose [25] and xylose [26], requiring the use of engineering ways to make these sugars accessible in the fermentation process [27,28]. Another alternative route for the production of alcohol is through the bacterium *Escherichia coli* due to its ability to use pentoses and hexoses [29]. Several bacteria [30], yeasts [31, 32], algae [33, 34], and cyanobacteria [35] have the potential for the production of fatty acids precursors for biofuels. Non-native *Yarrowia lipolytica* yeast presents an industrial potential for fatty acid-producing platforms from cheap and renewable routes [36]. Microalgae have enormous potential for the production of biofuels because they have a high cell growth rate and can be grown on marginal lands [37] and wastewater [38,39] thus reducing the need for nutrients for the growth of photosynthetic cells.

Other microorganisms are the object of studies to overcome the difficulties of those model cell factories. Examples are photosynthetic organisms [40], that use CO₂ directly, and the methanotrophic bacteria [41], which make possible the use of natural gas as a source of carbon. Synthetic biology contributes significantly to rationally achieving the production of non-food-related biofuels using these new biological systems [42,43,44] and also offering the possibility to make controlled biological processes competitive and valuable for human and animal well-being [45].

These new advances may cause significant changes in the socio-economic, agricultural, and technological framing of bioenergy [46,47,48,49]. Furthermore, there is worldwide concern regarding the development of a globally integrated framework for bioenergy, its environmental impact, and its relevance in the bioeconomy [50,51,52]. Alternative sources of feedstock for bioenergy not competing with the production of food are increasingly necessary, as they relate to concerns regarding climate change, food, and energy security in different nations. The use of alternative feedstocks requires new technological processes that pose new industrial challenges, research investments, and its consequences in terms of intellectual property, production, and market access. In this context, we want to assess the geopolitical, institutional, and intellectual panorama of the progress of the research in synthetic biology related to biofuels [53,54] in the search of strategic fundamentals for local and globally integrated bioenergy policies.

Synthetic biology is a key, innovative technological road in the production of biofuels from alternative feedstocks [55]. Because the production of biofuels is in the center of the contemporary discussions on bioeconomy, we carried out a scientometric search to ask how the current dynamics of the related scientific development is, and what could be its role in strategy and policy formulations towards a world focused on renewable energy sources.

2. Method

A scientometric analysis was applied in this work to evaluate the geopolitical, institutional, and intellectual panorama of the scientific advances of research in synthetic biology-related biofuels from sustainable, non-land use, and non-food competing resources using the software CiteSpace. The software combines information visualization methods, bibliometrics, and data mining algorithms in an interactive visualization tool for the extraction of patterns in citation data [56,57].

2.1. Research data

Articles and reviews on synthetic biology-related biofuels were collected using the Web of Science (WOS) - Clarivate Analytics (<https://apps.webofknowledge.com>). To reach practically the whole set of publications related to the focus themes, a lexical expansion [58] was applied, for rescuing as many relevant publications as possible. For comprehensive coverage of the field of synthetic biology, different terms were used in the analysis [59]. We also included terms related to metabolic engineering, the technical approach for the proper functioning of the projected living factories [60,61].

Unlike previous research that aimed to analyze the literature probed by single-core terms such as "synthetic biology" [62] or "biotechnology" [63], this study uses combined keywords for retrieving the synergy of different research fields for the production of non-food biofuels. In this way, we expanded substantially the retrieved knowledge and gained a more comprehensive scientific categorization of the subject. Thus, the query used in this research contains two main search strategies combined using Boolean operators. The first strategy directly addresses the concepts and types of non-food-biofuels. The second research strategy addresses the concepts and approaches related to synthetic biology, metabolic engineering, and conceptual variations. Thus, the strategy for retrieving publications in the WOS-database by the terms selected was as follows: TOPIC: (biofuel* OR ethanol OR biogas OR "alcohol fuel" OR bioenergy OR "microbial oil" OR "microbial biofuel" OR biodiesel OR biobutanol OR butanol OR bioethanol OR biohydrogen OR methanol OR bioalcohol OR "fatty acid esters" OR farnesene OR "biodiesel" OR "bio diesel" OR bioóleo OR "bio-oil") AND TOPIC: ("synthetic biology" OR "synthetic pathways" OR "metabolic engineering" OR "metabolic pathways" OR "synthetic circuits" OR "synthetic systems" OR "synthetic genomics" OR "synthetic genome" OR "synthetic genes" OR "synthetic nets").

The language of recovery was restricted to "English". The search period was defined as from 1999 up to 2018. The search resulted in 2,863 publications (articles and reviews). From those, 145 documents not related to the research topic were excluded, resulting in 2,718 original publications, being 2,057 articles, and 661 reviews.

2.2. Data analysis

We imported the full dataset of 2,718 publications into CiteSpace and set the time-slicing as "1999–2018". We selected the 50 most cited references for each year in the chosen period to map the co-citation networks. The Pathfinder network scaling was

adopted to prune each network and remove the redundant links between nodes [57, 64]. We then analyze countries, institutions, funding agencies, and authors based on the co-citation network. The co-citation network of the authors was used to visualize the research groups and detect notable developments in the scientific field through clusters. The method focuses on the interrelations between a co-citation cluster's members and their citers [64]. The articles and keywords were analyzed using Kleinberg's burst detection algorithm [65]. Besides, we used the dual-map overlay tool to analyze the evolution of the scientific literature in biofuels related to synthetic biology. Dual-map overlay of journals provides a global map of the growth of literature at the academic level [66], shows the relationship between the distributions of cited journals and citing journals in the literature, and reveals the evolution of the distribution with the time [67].

2.3. Properties of the networks

The properties of the networks were measured using structural and temporal metrics. Structural metrics include network density, modularity, silhouette, and centrality of intermediation. The density of the network d was used to express the degree of proximity in the relationships between each node. Low density denotes that the links between the different nodes are not very close, so there is little cooperation between them [68,69]. The modularity Q was used to measure the extent to which a network can be divided into independent blocks, ranging from 0 to 1. The closer to 1, the more structured the network will be [64]. The silhouette metric developed by Rousseeuw [70] was used to estimate the uncertainty involved in identifying the nature of a cluster. The value of the silhouette of a cluster range from -1 to 1. The value of 1 represents a perfect separation from other clusters the highest level of homogeneity [57,64,71]. Freeman's centrality of intermediation was used to highlight possible central points of the paradigm shift over time [72]. It measures the degree to which the node is part of the paths that connect an arbitrary pair of nodes in the network, with a value ≥ 0.1 . The high values of the centrality of intermediation are identifiers of potentially revolutionary scientific publications, as well as gatekeepers on social networks [57,64,72].

As a temporal metric, we use Kleinberg's burst detection algorithm [65]. This tool analyzes whether a specific frequency function has had statistically significant fluctuations over a given period. Thus, this rupture detection algorithm is adapted to identify new research front concepts [57,65].

3. Results

3.1. Articles, reviews, and citations on synthetic biology-related biofuels

The publications on biofuels, synthetic biology, and metabolic engineering between 1999 and 2018 are shown in Fig. 1. The 2,718 scientific publications in biofuel-related to synthetic biology (black bars), can be divided into two phases. The first stage (1999-2014) is characterized by rapid scientific development. The second stage (years 2015-2018) indicates that research in this area has entered a stable stage. In 2018, the last year of review, we retrieved 349 publications. The scientific production was accompanied by a substantial increase in the number of citations (black line), around 87,855 citations in the accumulated period, expressing the continued importance of the subject within the scientific context. The 2,718 scientific publications in synthetic biology-related biofuels represent 9% of all publications on synthetic biology and metabolic engineering in that period (white bars) (Fig. 1).

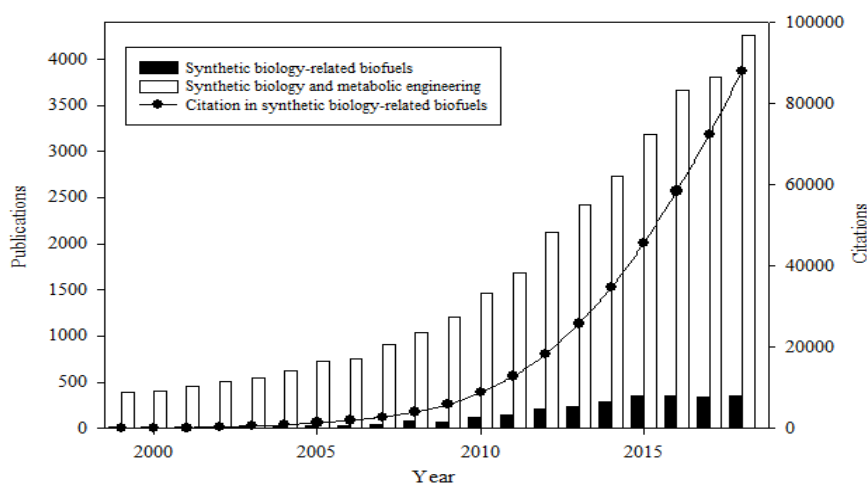


Figure 1- Synthetic biology, metabolic engineering, and biofuel-related articles, and reviews, according to Web of Science (1999-2018). Synthetic biology, metabolic engineering, and biofuel-related articles, and reviews, according to Web of Science (1999-2018). Numbers of publications in synthetic biology-related biofuels (Black Bars), were accompanied by an increase in the number of respective citations (Black Line). Publications on biofuels represent 9% of the total of publications on synthetic biology and metabolic engineering (White Bars).

2.3.10 Changes in the knowledge on synthetic biology-related biofuels

Fig. 2 presents two Dual-Map Overlays on synthetic biology-related biofuels. The Dual-Map Overlays function in this research was used to reveal the scientific standard disciplines and the evolution of publications on synthetic biology-related biofuels in the global map of the scientific literature. The articles in the network of journals on the researched topic are located on the left side of the base map. The references cited by the articles are located in the network of journal citations on the right side of the base map, grouped using the z-score function. The z-score is the distance from the mean of a given data point, expressed as the number of standard deviations [73]. Fig. 2a shows the first ten years of analysis (1999-2008). Line thickness is proportional to the z-score value. Publications on synthetic biology-related biofuels appear mainly in the interdisciplinary field (citing map) of “molecular/biology/immunology” (orange citation links). The knowledge base of this disciplinary field (cited map) is mainly related to the disciplines of “molecular/biology/genetics”, and “environment/toxicology/nutrition”. As shown in Fig. 2b, a new interdisciplinary field (citing map) emerged from 2009 to 2018, entitled “veterinary/animal/science” (yellow citation links). As well as for “molecular/biology/immunology” (orange citation links), the knowledge (base map cited) comes from the disciplines of “molecular/biology/genetics”, and “environment/toxicology/nutrition”.

The journals Applied and Environmental Microbiology, Applied Microbiology, and Biotechnology, Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), Metabolic Engineering, and Biotechnology and Bioengineering are the most influential sources of knowledge in research on synthetic biology-related biofuels (Fig. 2).

highlight emerging specialties [57]. By burst detection in country-analysis, we found that Germany (6.15), Canada (5.76), and Switzerland (3.62) have shown strong citation bursts.

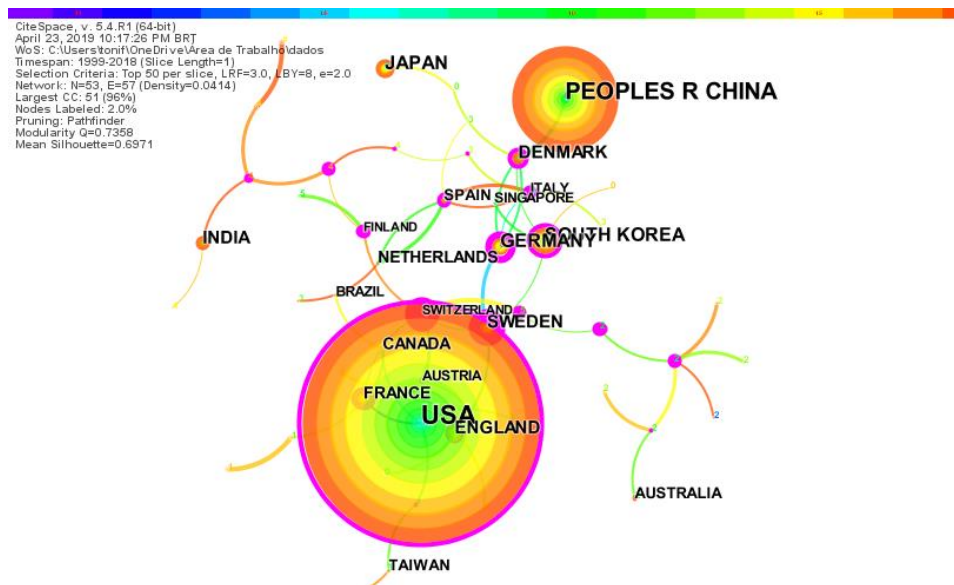


Figure 3 Countries co-citation map in research on synthetic biology-related biofuels. The generated map comprises 51 nodes and 57 links. The nodes denote co-cited Countries. Only the most relevant countries are shown. Nodes with purple borders are points of high betweenness centrality. The nodes marked with red rings represent countries with citation-burst. The links indicate the connections between the nodes. The time bar is at the top of the map (1999-2018).

2.3.12 Institutions co-citation network

The institutions' co-citation map in research on synthetic biology-related biofuels shows 279 nodes and 260 links (Fig. 4). Each node represents a research institution. This network of institutions has modularity of 0.9638, an average silhouette value of 0.6688, and a density of 0.0067, which indicates that there is little cooperation between them. The key research institutions identified based on the frequency of publications, centrality, and bursts of citations are the Chinese Academy of Sciences with 123 publications and the University of California Berkeley-US with 105 publications.

In Fig. 4, purple circles mark nodes with high betweenness centrality [72], showing the importance of a node position in a network [74]. The Technical University of Denmark has the highest centrality (0.39), with strong cooperation ties with other institutions, namely Chalmers University of Technology, UC-San Diego, and UC-Berkeley. The second most collaborative institution is Tsinghua University (0.24), with strong ties of cooperation with the Chinese Academy of Sciences, Tianjin University, and

The searched authors formed eleven knowledge clusters (Fig. 5). Clusters with green areas are the oldest. The yellow areas represent the most recent ones. **Erro! Fonte de referência não encontrada.** shows the six largest groups in terms of size (number of references included), labels extracted from titles, abstracts, the average year of articles cited, and coverage of citations. Each cluster is summarized with a list of phrases selected from the abstracts of the articles that mention at least one member of the cluster and are weighted by the algorithm log-likelihood ratio (LLR) [57,64].

The largest cluster (# 0), which is labeled as “versatile sugar dehydrogenase” contains 41 references (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), with a silhouette value of 1, indicating to be a cluster highly consistent or similar in terms of content searched [64]. The references were published mainly around the year 2014. This knowledge cluster contains studies on l-arabonate and d-galactonate production by expressing a versatile sugar dehydrogenase in metabolically engineered *E. coli* [75], direct bioconversion of d-xylose to 1,2,4-butanetriol in an engineered *E. coli* [76], engineered *Rhodospiridium toruloides* for increased lipid production [77], and gene amplification for accelerating cellobiose utilization in engineered *S. cerevisiae* [78]. Each of these articles covered not less than 5% of the 41 references.

The second-largest cluster (#1), labeled as “redox balance principle” contains 34 references (Table 1), with a silhouette value is 0.911. The references were published mainly around the year 2014. This knowledge cluster contains studies on high-throughput, *in vivo* selection platform for NADPH-dependent reactions based on redox balance principles [79], engineering a Coenzyme A (CoA) [80, 81], ethanol production in *Clostridium thermocellum* via deregulated nitrogen metabolism [82], and perturbed sulfur metabolism [83]. Each of these articles covered not less than 3% of the 34 references.

The third-largest cluster (#2), labeled “sesquiterpene production” contains 29 references (Table 1), with a silhouette value is 0.946. The references were published around the year 2014. This knowledge cluster contains studies on the analysis of proteomics as a tool to direct metabolic engineering [84], sesquiterpene production in *S. cerevisiae* [85,86], and characterization of *E. coli* using a Multi-Omics base [87]. Each of these articles covered not less than 4% of the 29 references.

The fourth-largest cluster (#3), labeled “redox balance principle” contains 25 references (Table 1), with a silhouette value is 0.977. The references were published

around the year 2014. This knowledge cluster contains studies on cell factories for α -santalene production [88], lactate production by cyanobacteria [89], and reconstruction and evaluation of the synthetic bacterial MEP pathway in *S. cerevisiae* [90]. Each of these articles covered not less than 3% of the 25 references.

The fifth-largest cluster (#4), labeled “redox balance principle” contains 24 references (Table 1), with a silhouette value is 0.984. The references were published around the year 2014. This knowledge cluster contains studies on d-lactic acid production by *S. cerevisiae* [91], metabolomics approach [92], yeast strain metabolically engineered for tolerance to fermentation inhibitors [93], and 2,3-Butanediol (BDO) production by *S. cerevisiae* [94]. Each of these articles covered not less than 3% of the 24 references.

The sixth-largest cluster (#7) is the most recent one among all clusters shown in Fig. 5. It is labeled “*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4”. It contains 16 references, with a silhouette value of 0.984. The references were published around the year 2015 (Table 1). This knowledge cluster contains studies on plastidial triacylglycerol synthesis, the potential regulatory role of AGPAT in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* [95], glycerol and neutral lipid production in the oleaginous marine diatom *P. tricornutum* [96], antisense knockdown of pyruvate dehydrogenase kinase for neutral lipid accumulation in *P. tricornutum* [97], and genome editing in *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 with the CRISPR-Cas9 system [98]. Each of these articles covered not less than 3% of the 16 references.

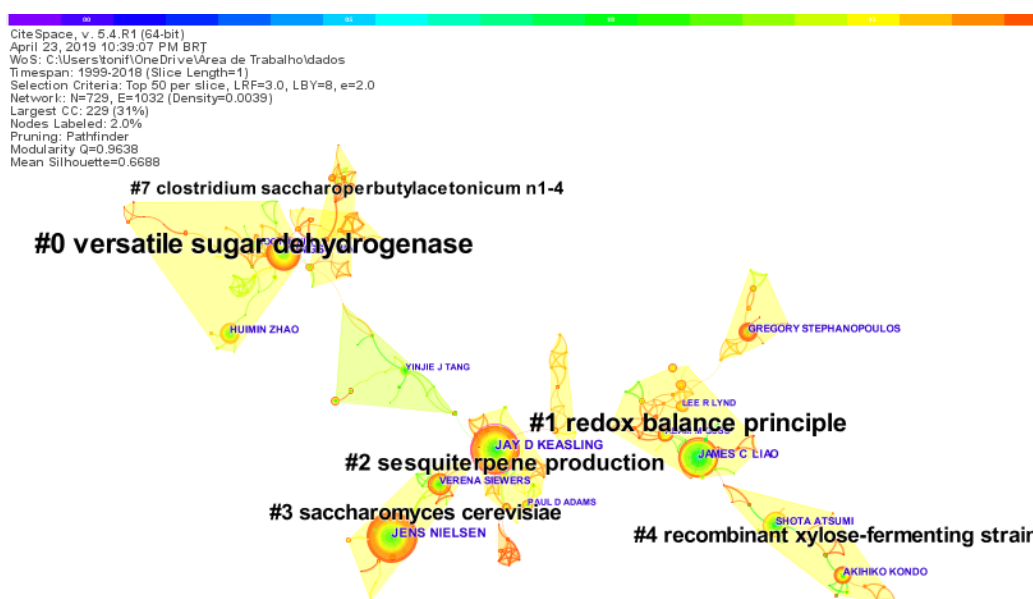


Figure 5 Network of the dominant research topics and the leading authors on synthetic biology-related biofuels. The generated map comprises 729 nodes and 1,032 links. The nodes denote co-

cited authors. Only the most relevant authors are shown. The nodes marked with red rings represent authors with citation-burst. The links indicate the connections between the nodes. The time bar is at the top of the map (1999-2018)

Table 1- Summary of emerging clusters on synthetic biology-related biofuels

Cluster	Size	Silhouette	Label (LLR)	Citee Year	Citation Coverage
#0	41	1	Versatile Sugar Dehydrogenase (219.06, 1.0E-4); D-Galactonate Production (219.06, 1.0E-4); Engineered <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (204.24, 1.0E-4)	2014	[75,76,77,78]
#1	34	0.911	Redox Balance Principle (197.02, 1.0E-4); Nadph-Dependent Reaction (197.02, 1.0E-4); Vivo Selection Platform (197.02, 1.0E-4)	2014	[79,80,81,82,83]
#2	29	0.946	Sesquiterpene Production (313.39, 1.0E-4); Principal Component Analysis (209.89, 1.0E-4); Characterizing Strain Variation (189.08, 1.0E-4);	2014	[84,85,86,87]
#3	25	0.977	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (360.26, 1.0E-4); Co-Factor Supply (207.54, 1.0E-4); Alpha-Santalene Production (207.54, 1.0E-4)	2014	[88, 89,90]
#4	24	0.984	Recombinant xylose-fermenting strain (191.79, 1.0E-4); Metabolic Pathway Engineering (191.79, 1.0E-4); Formic Acid Tolerance (191.79, 1.0E-4)	2014	[91,92,93,94]
#7	16	0.984	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum n1-4</i> (275.82, 1.0E-4); Model Diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (197.67, 1.0E-4); Potential Regulatory Role (197.67, 1.0E-4)	2015	[95,96,97,98]

2.3.14 Papers with the strongest citation bursts on synthetic biology-related biofuels

The key papers with the citation bursts of the research on synthetic biology-related biofuels are shown in Table 2. The citation bursts function was used to highlight documents with the strongest bursts. The blue lines represent the periods analyzed (1999 to 2018), and the red lines indicate the start and the final years of the respective document's citation burst [57,65]. They are articles that have influenced considerably the scientific development of the field. The first two articles with more citation bursts address metabolic engineering and its tools [99]. They present a review of the metabolic pathways used to produce advanced biofuels regardless of feedstock and host, together with data-











based approaches and synthetic biology for host and path optimization. They project the future of biofuel production. Atsumi, Hanai, and Liao [100] make use of these metabolic engineering tools in *E. coli* to produce higher alcohols from glucose. The third article, by Gibson et al. [101], presents an isothermal, single-reaction method for assembling multiple overlapping DNA molecules by the concerted action of a 5' exonuclease, a DNA polymerase, and a DNA ligase.

The fourth and fifth article with more citation bursts presents the potential of *E. coli* bacteria in the production of butanol. Atsumi et al. [102], designed a synthetic pathway in *E. coli* to produce 1-butanol. For the authors, the success in the production of 1-butanol from the engineering of *E. coli* opens the possibility of using non-native organisms, easily manipulated for the production of 1-butanol. Shen et al. [103], constructed a modified clostridial 1-butanol pathway in *E. coli* to provide an irreversible reaction catalyzed by trans-enoyl-coenzyme A (CoA) reductase (Ter), and created NADH and acetyl-CoA driving forces to direct the flux.

The sixth article presents the potential of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. Atsumi et al., [104], genetically engineered the strain *S. elongatus* PCC7942 to produce isobutyraldehyde and isobutanol directly from CO₂, and increased productivity by overexpression of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco). The combined use of genetic engineering in *Y. lipolytica* aiming to significantly increase the production of lipids, from Tai and Stephanopoulos [105], is the seventh article with the highest burst strength. The authors demonstrated the ability of *Y. lipolytica* to produce lipids, and the metabolic engineering effects of two important steps in the lipid synthesis pathway, which acts on the flow deviation for lipid synthesis, and creates the driving force for the synthesis of triglyceride (TAG). In the eighth position is the article by Dellomonaco et al. [106]. The authors demonstrated that a functional reversal of the β -oxidation cycle can be used as a metabolic platform for the synthesis of alcohols and carboxylic acids with various chain lengths and functionalities.

In the ninth position, Zhang et al. [107] presented a dynamic sensor-regulator (DSRS) to produce products based on fatty acid in *E. coli*, with the potential for biodiesel production. In the tenth position is the article by Runguphan and Keasling [108]. The authors designed the yeast *S. cerevisiae* to produce biofuels derived from fatty acids, and chemicals from simple sugars [108].

Table 2 Top scientific articles with the strongest citation bursts in the research on synthetic biology-related biofuels

Articles	Year	Strength	Begin	End	1999 - 2018
<i>Peralta-Yahya et al.</i> [99]	2012	371.738	2013	2018	
<i>Atsumi, Hanai and Liao</i> [100]	2008	367.477	2010	2016	
<i>Gibson et al.</i> [101]	2009	270.418	2013	2018	
Atsumi et al. [102]	2008	269.481	2010	2014	
<i>Shen et al.</i> [103]	2011	264.006	2012	2018	
<i>Atsumi et al.</i> [104]	2009	256.165	2011	2016	
<i>Tai and Stephanopoulos</i> [105]	2013	216.846	2014	2018	
<i>Dellomonaco et al.</i> [106]	2011	214.931	2012	2018	
<i>Zhang et al.</i> [107]	2012	212.798	2013	2018	
<i>Rungtaphan and Keasling</i> [108]	2014	210.905	2015	2018	

2.3.15 Emerging trends and new developments in the research on synthetic biology-related biofuels

Using keyword-bursts, we analyzed the new trends in the field. The burst of a keyword means that it has received or receives special attention from academic circles in a specific period [57,65]. Table 3 presents the length and intensity of the top twenty keyword-bursts. These high burst values indicate that the aspects these words referred to are hot topics and research boundaries in synthetic biology-related biofuels.

The most intense word is *Y. lipolytica* due to its enormous industrial potential for the future bio-refinery platform [36]. Research on *Y. lipolytica* and oleaginous yeast aim to increase the production of fatty acids from cheap and renewable routes [36] in a context more adaptable to industrial applications. With the advent of synthetic biology, new approaches such as proteomic analysis [109,110], gene overexpression [111], are being applied to this yeast. Recently the CRISPR-Cas9 tool was successfully applied in *Y. lipolytica* for genomic-oriented manipulation [112].

The anaerobic digestion processes in microbial communities have ample potential for bioenergy, as they allow the use of low-cost feedstocks, such as wastewater and biomass, to produce biofuels. Thus, different omics-tools have been applied in *Coprothermobacter proteolyticus* [113] and *Pseudomonas putida* [114].

The production process of bioethanol is the one with the best technical development among microbial biofuels. This technology is expected to be mature in the coming years. Tooling advances in metagenomics [115], orthogonal communication systems [116], metaproteomics [117], metabolomics [118], and metabolic engineering [119] have been

developed in an attempt to solve the critical stages of the microbial fermentation process, and to increase yields in the production of cellulosic bioethanol.

Most industrial applications using microorganisms as living factories make use of lignocellulosic biomass or agricultural waste [120], relating this word to a research hot topic. The co-fermentation of different sugars from lignocellulosic biomass and residues from it allows the ethanol production processes to become economically viable [121]. However, microorganisms potentially usable in these fermentative processes are not naturally adaptable to extreme industrial conditions [122], given the low productivity, low resistance to stress, and accumulation of by-products due to the recalcitrance of biomass [123,124]. To overcome these limitations, several genetic engineering strategies in microorganisms have incorporated the use of synthetic promoters in the study of gene function [125] and transcription factors (TF) as regulators of metabolic pathways to increase the production of biofuel molecules from lignocellulosic biomass [126,127,128].

E. coli is a gram-negative bacterium considered to be the most popular workhorse for industrial production due to complete knowledge of its genomics. Also, *E. coli* is widely used as a gene donor [115] for new functions in the metabolic pathway in a series of other microorganisms [129]. However, the main disadvantages of this bacterial culture are the narrow pH growth range (6.0-8.0), in addition to the fact that ethanol is not a central product of this bacterium. Thus, research is focused on the development of synthetic promoters [130] for targeting new mevalonate pathways for multiple cellular processes [131,132] among other synthetic biology approaches.

Another gram-negative bacterium with biotechnological potential is *Klebsiella pneumoniae*, widely used in microbial consortia in an attempt to improve tolerance to xylose [133]. *K. pneumoniae* is nutritionally versatile, with numerous native pathways for the production of biofuels, and a well-known and industrially important platform for chemicals derived from various sugars [134]. Proteomic [135] and differential metabolomics [98] analysis provide new routes and perspectives for the production of industrial metabolites such as n-butanol [136].

It is not new that microalgae have enormous biosynthetic potential under adverse physiological conditions [33], being recognized as a propitious source for the sustainable production of bio-based fuels. *P. tricornutum* is a microalga model with significant biotechnological potential for future biorefineries [38]. Microalgae are photosynthetic microorganisms with a capacity for lipid accumulation, given the possibility of transforming CO₂ and heat into chemical energy at scales larger than those produced by

terrestrial plants [137,138]. Besides, they can use wastewater [38,39] which reduces the need for other valuable nutrients. Therefore, the research focuses on the genomics of the metabolism related to the formation and accumulation of lipids [139,140]. The performance of new promoters under nitrogen starvation conditions are also studied in this photosynthetic microorganism [141].

Table 3 The top 20 keywords with the strongest bursts of citation in the research on synthetic biology-related biofuels, as published in the most recent years of the period of analysis.

Classes	Keywords	Strength	Year	Begin	End	1999 - 2018
Organisms	<i>Yarrowia lipolytica</i>	160.346	1999	2016	2018	
	<i>oleaginous yeast</i>	82.659	1999	2016	2018	
	<i>E. coli</i>	54.287	1999	2014	2018	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	54.065	1999	2016	2018	
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	51.463	1999	2016	2018	
	<i>Microalgae</i>	45.048	1999	2016	2018	
Processes and products	<i>anaerobic digestion</i>	83.171	1999	2016	2018	
	<i>advanced biofuel</i>	82.808	1999	2014	2018	
	<i>bioethanol production</i>	82.265	1999	2015	2018	
	<i>lignocellulosic biomass</i>	62.484	1999	2015	2018	
	<i>Promoters</i>	58.377	1999	2015	2018	
	<i>Biorefinery</i>	43.827	1999	2016	2018	
	<i>Sequence</i>	43.701	1999	2016	2018	
	<i>nitrogen starvation</i>	39.342	1999	2015	2018	
	<i>Wastewater</i>	38.613	1999	2016	2018	
	<i>mevalonate pathways</i>	38.257	1999	2016	2018	
	<i>Accumulation</i>	33.134	1999	2016	2018	
	<i>Biotechnology</i>	31.641	1999	2016	2018	
	<i>n butanol</i>	5.198	1999	2016	2018	
	<i>transcription factor</i>	4.045	1999	2015	2018	

The keyword-bursts analyzed and discussed here provide an overview of the main trends and important topics in the field of research focused on synthetic biology-related to non-food biofuels.

4.1. Discussion and future perspectives

We analyzed the geopolitical and institutional scenario and examined the contemporary content of the scientific literature in the field of synthetic biology related to biofuels. Our results highlight the evolution of concepts, and emergencies that may assist in assessing scientific development and in suggesting future policy formulations for a world focused on a sustainable bioeconomy.

The scientific evolution observed in recent years is mainly due to advances in the metabolic manipulation of microorganisms [142,143,144,145,146] and by the reduction of cost of DNA sequencing and synthesis [147,148]. Scientific publications have undergone significant changes in their theoretical and methodological background in

recent years. These changes in disciplinary foundations have evolved to respond to the new needs of world society, becoming increasingly multidisciplinary.

In this study, we showed that the geopolitical distribution of publications originates mainly from high-income countries, such as the US. The US achieved great advantage and influence in the field of synthetic biology related to biofuels, as noticed not only by the number of publications but also by the collaboration with countries of high centrality and by government investments in synthetic biology [149, 150]. This technology offers notable benefits not only for the production of biofuels but also for other applications. In the US synthetic biology is seen as a technological path for providing a healthier life, less dependence on fossil resources, new manufacturing processes, increased productivity in the agricultural sector, and for the creation of new jobs through the development of bio-based markets [151]. Institutions in the US are at the top of the ranking in terms of absolute contribution and influence.

We looked at the development and the academic influence of the authors according to the number of publications and centrality of their respective work. Each author presented in Table 4 is responsible for at least 20 articles. It indicates the researchers who actively investigate the application of synthetic biology in the production of biofuels, or related fields.

In the analysis of the authors' co-citations (Table 1) some characteristics of the network of the research in synthetic biology-related to biofuels were pointed out. The intellectual base presents topics with interdisciplinary characteristics. It can be seen that their link is in the use of metabolic and genetic tools for expression and modification of cellular microorganisms for the production of bioethanol and fatty acids from biomass and low-cost waste.

Analysing the articles-bursts and keywords-bursts, we identified the evolution of the conceptual base in the field [57], helping scholars to better understand the trends at critical research points. The domains of knowledge verified in the analysis of articles-burst went from complex analysis to methodologies aimed at low-cost gene synthesis and assembly of synthetic paths. The design and the construction or modification of new molecular and cellular matrices for synthetic paths/modules, including promoters, RNAs, and scaffolding [152] lead to new industrial processes for the production of metabolites such as bioethanol and fatty acids [153].

Similarly, keyword-bursts analysis was used to determine the new frontiers and scientific trends. In our study, the emerging trends were mainly focused on the research

and development of oilseed yeasts with *Y. lipolytica*, gram-negative bacteria like *E. coli* and *K. pneumoniae*, microalgae, and *P. tricornutum* for the production of advanced biofuels, with emphasis on bioethanol and n-butanol from lignocellulosic biomass and wastewater. Promoters, transcription factors, and genetic sequencing tools are used for the regulation of metabolic pathways to increase lipid accumulation and for the production of biofuel molecules in these microorganisms. The high explosion values indicate that the aspects to which these keywords belong are still important topics and frontiers for research on biofuels related to synthetic biology in the future. Also, related to these words, others are verified as meta-transcriptomics, meta-genomics, assimilation metabolism, proteomic analysis, genetic and metabolic engineering in their application to transform living factories into biorefineries.

Given the availability of genetic and molecular tools to redesign existing native pathways or create a new synthetic pathway, *E. coli* was the best choice for producing biofuels from renewable energy sources [29]. However, the toxicity of the product is one of the main bottlenecks in achieving maximum production of biofuels. With that in mind, Xu et al. [154] used host deformation engineering to alleviate the issue of solvent toxicity in fermentation. Likewise, new synthetic promoters in *E. coli* provide better production of biochemicals and biofuels by fine-tuning levels of gene expression [155]. Bervoets et al. [116] present a set of orthogonal expression systems based on *Bacillus subtilis* sigma heterologous factors that may contribute to the assembly of more complex synthetic genetic systems in the future. In addition to being used as a living factory, due to complete knowledge of its genomics, *E. coli* is also used as a gene donor [115] for new functions in the metabolic pathway or as for a series of other microorganisms [129].

In an attempt to overcome the obstacles to greater use of biomass, new research in biomanufacturing based on genomics in microorganisms, enzymes, and new metabolic pathways has started a new era of discoveries with industrial potential [156,157]. An example is *Y. lipolytica* research aimed at increasing the production of fatty acids from cheap and renewable routes [36], in a context more adaptable to industrial applications. We can add new genome editing tools based on the CRISPR-Cas system, leading to greater viability in industrial microbial systems producing consumer goods [158,159], allowing the production of lipids with industrial potential for future biorefinery platforms. The use of microalgae has enormous energy potential, given the possibility of transforming CO₂ and heat into chemical energy at scales much larger than those produced by terrestrial plants [137] without competing with food production. *P.*

tricornutum is a strain with significant biotechnological potential for future photosynthetic biorefineries [160]. New species of microalgae, including *Scenedesmium sp NBRI012*, have high productivity of biomass, carbohydrates, and lipid content. After the production of bio-hydrogen, residual biomass with a high lipid content can be used as a source for the production of biodiesel [137].

At the same time, lignocellulosic biomass, agricultural residues, and wastewater have been emphasized as feedstock for the production of advanced biofuels using synthetic living factories. Thus, bioprocesses that use live factories are turning their attention to new substrates, leaving aside the use of glucose, for greater use of non-food biomass, CO₂, and low-cost waste as carbon sources, drawing attention to the potential of a bioeconomy regimen. The potential of lignocellulosic biomass provides a new path for the production of biofuels that do not compete with food because it is cheaper and available in large quantities [161,162]. In Brazil, as a pertinent example, the territorial extension and the regional edaphoclimatic characteristics make possible the intensive production of biomass for industrial biotechnology at a lower cost, compared to other countries that prospect for synthetic microbial cells. Concomitantly, there is also the possible use of agro-industrial by-products and residues as substrate [163]. Brazil, in the future, may become the largest producer of products of biobased origin. Another candidate substratum of great potential is the use of wastewater because the use of this cheap and abundant resource can significantly minimize input and energy costs in biofuels production processes [164].

Different engineering strategies, like automation, regulation, and reengineering of cellular machines can be tested on hosts in a relatively short time and at a lower experimental cost. However, while enabling predictive approaches to assist in research and development of biomolecules in various synthetic pathways at the destination host [156] we still face a knowledge gap that does not allow us to project cells in an environment in a truly predictable way that results in a lineage with increased cell yield. New cellular systems capable of using different carbon sources are needed for the production of biofuels [165], including genetic parts specifically related to biosensors and inducible promoters [166]. Emphasis is put on the development of tools for a better understanding of the metabolism of fatty acids [153] and genomic expression in oleaginous yeasts [167] allowing the use of cheaper and renewable substrates in industrial applications. In microalgae, new tools are needed that can improve nuclear manipulation and the construction of a synthetic genetic network on a genome-scale, thus being able

shortly to increase the biomass rate and CO₂ fixation capacity by these microorganisms [34]. Metabolic engineering in microalgae may improve control over lipid and growth pathways, resulting in more reproducible and predictable systems compared to wild-type strains [33].

On the other hand, there are political and economic issues. Given the lower productivity and high costs of bioproduction, the use of microorganisms as living factories is still difficult to compete with conventional industries [168]. Factors such as the current relatively low prices of fossil fuels and the devaluation of biofuels by developing countries make this technology lose space in the bioenergy market [169]. In the case of Brazil, despite the earlier policies for the development of biofuels, governmental inputs for fossil oil production, like the ocean pre-salt oil initiative in 2007, biofuels have been so far left behind. Thus, appropriate government policies are needed to increase interest in the production of advanced biofuels using live factories, so that this technology can achieve market success in the coming years.

Having overcome the challenges, synthetic biology could reach and cover not only the biofuel supply chain but also other areas that form agribusiness, with greater added value [170]. The synthetic biology tools applied to microorganisms offer the possibility of producing chemicals for agricultural production that can increase agricultural productivity [171], give greater nutritional value to agricultural products [172], and benefit the environment [173]. Live factories can also be used to make substances currently produced by plants, for the food [174] and medicine [175,176] sectors, among others. Thus, the diversity of compounds and molecules that can be produced using synthetic living factories can revolutionize the production of biomolecules for routine and common use, entering a new era of bioeconomy, with the development of bioproducts of high economic value [177,178,179]. We look forward to synergistic, institutional efforts to support the development of organic production systems economically viable, without aggravating land [180] and water use [181] and limiting the environmental impact of human activities while expanding the industry into new frontiers of bioenergy and other bio-based products.

4.2. Conclusion

In this article, we provide indicators to be used in the context of energy policy related to bioenergy, as well as to assess perspectives and knowledge on the use of synthetic biology tools for the production of microbial biofuels from sustainable bioeconomy

resources. This study contributes to several aspects of our current understanding of this interdisciplinary research field.

First, the research approaches on biofuels using synthetic biology retrieved here reverberates the concept of bioeconomy in the development of new forms of energy production and consumption, using new renewable biological substrates. The transition from an economy based on fossil resources to a bio-based economy is associated with the production of biofuels that do not use food-related feedstocks. This will be possible by combinations of approaches and tools of synthetic biology and evolutionary engineering in industrial bioprocesses.

Second, our analysis can help bioenergy, bioeconomy, and biotechnology researchers, funding agencies, and policymakers explore information relevant to this field regarding stakeholders, countries, institutions, and researchers, as well as new emerging trends and topics which form a thriving academic and industrial community.

Finally, although the study is not an exhaustive analysis of the entire scientific literature, given the exclusive use of the Web of Science database (<https://apps.webofknowledge.com>), it allows us to consider the technological importance of producing advanced biofuels from new sources of sustainable biomass by synthetic biotechnologies. However, we remain with important questions unanswered, like whether the use of these synthetic life factories is a low carbon process. The development of appropriate thermodynamic indicators related to energy, exergy, and emergency should help to answer such key questions.

4.3. References

- [1] M. Balat, Potential alternatives to edible oils for biodiesel production - A review of current work, *Energy Conversion and Management* 52 (2) (2011) 1479-1492. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.10.011>.
- [2] F. Cherubini, The biorefiner Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management* 51 (7) (2010) 1412-1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>.
- [3] M.A. Coleman, H.D. Goold, Harnessing synthetic biology for kelp forest conservation1, *Journal of Phycology* 55 (4) (2019) 745-751. <https://doi.org/10.1111/jpy.12888>.
- [4] K.E. French, Harnessing synthetic biology for sustainable development, *Nature Sustainability* 2 (4) (2019) 250-252. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0270-x>.
- [5] B.F.T. Rudorff, D.A. de Aguiar, W.F. da Silva, L.M. Sugawara, M. Adami, M.A. Moreira, Studies on the rapid expansion of sugarcane for ethanol production in

- São Paulo state (Brazil) using Landsat data, *Remote Sensing* 2 (4) (2010) 1057-1076. <https://doi.org/10.3390/rs2041057>.
- [6] D. Pimentel, T.W. Patzek, Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood, *Natural Resources Research* 14 (1) (2005) 65-76. <https://doi.org/10.1007/s11053-005-4679-8>.
- [7] J.C. Bergmann, D.D. Tupinambá, O.Y.A. Costa, J.R.M. Almeida, C.C. Barreto, B.F. Quirino, Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 21 (2013) 411-420. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.12.058>.
- [8] S.P. Souza, J.E.A. Seabra, L.A.H. Nogueira, Feedstocks for biodiesel production: Brazilian and global perspectives, *Biofuels* 9 (4) (2018) 455-478. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1278931>.
- [9] A. Ayres, Germany's water footprint of transport fuels, *Applied Energy* 113 (2014) 1746-1751. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.05.063>.
- [10] S. Nanda, J. Mohammad, S.N. Reddy, J.A. Kozinski, A.K. Dalai, Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels, *Biomass Conversion and Biorefinery* 4 (2) (2014) 157-191. <https://doi.org/10.1007/s13399-013-0097-z>.
- [11] A.S. Heeres, C.S.F. Picone, L.A.M. van der Wielen, R.L. Cunha, M.C. Cuellar, Microbial advanced biofuels production: Overcoming emulsification challenges for large-scale operation, *Trends in Biotechnology* 32 (4) (2014) 221-229. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.02.002>.
- [12] J.C. Liao, L. Mi, S. Pontrelli, S. Luo, Fuelling the future: Microbial engineering for the production of sustainable biofuels, *Nature Reviews Microbiology* 14 (5) (2016) 288-304. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.32>.
- [13] S. Nanda, A.K. Dalai, I. Gökalp, J.A. Kozinski, Valorization of horse manure through catalytic supercritical water gasification, *Waste Management* 52 (2016) 147-158. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.03.049>.
- [14] Y.H.P. Zhang, A sweet out-of-the-box solution to the hydrogen economy: Is the sugar-powered car science fiction?, *Energy and Environmental Science* 2 (3) (2009) 272-282. <https://doi.org/10.1039/b818694d>.
- [15] P. Zhu, O.Y. Abdelaziz, C.P. Hulteberg, A. Riisager, New synthetic approaches to biofuels from lignocellulosic biomass, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 21 (2020) 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.08.005>.
- [16] N. Srivastava, M. Srivastava, P.W. Ramteke, P.K. Mishra, Synthetic Biology Strategy for Microbial Cellulases, in: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (2019) 229-238. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63503-7.00014-0>.
- [17] U.C. Kalluri, H. Yin, X. Yang, B.H. Davison, Systems and synthetic biology approaches to alter plant cell walls and reduce biomass recalcitrance, *Plant Biotechnology Journal* 12 (9) (2014) 1207-1216. <https://doi.org/10.1111/pbi.12283>.
- [18] S. Mukherji, A. Van Oudenaarden, Synthetic biology: Understanding biological design from synthetic circuits, *Nature Reviews Genetics* 10 (12) (2009) 859-871.

- <https://doi.org/10.1038/nrg2697>.
- [19] P. Shapira, S. Kwon, J. Youtie, Tracking the emergence of synthetic biology, *Scientometrics* 112 (3) (2017) 1439-1469. <https://doi.org/10.1007/s11192-017-2452-5>.
- [20] S.A. Benner, A.M. Sismour, Synthetic biology, *Nature Reviews Genetics* 6 (7) (2005) 533–543. <https://doi.org/10.1038/nrg1637>.
- [21] J. Philp, Balancing the bioeconomy: Supporting biofuels and bio-based materials in public policy, *Energy and Environmental Science* 8 (11) (2015) 3063-3068. <https://doi.org/10.1039/c5ee01864a>.
- [22] E.-M. Aro, From first generation biofuels to advanced solar biofuels, *Ambio* 45 (2016) 24–31. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0730-0>.
- [23] M. Wehrs, D. Tanjore, T. Eng, J. Lievens, T.R. Pray, A. Mukhopadhyay, Engineering Robust Production Microbes for Large-Scale Cultivation, *Trends in Microbiology* 27 (2019) 524-537. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.006>.
- [24] N. Xu, L. Wei, J. Liu, Recent advances in the applications of promoter engineering for the optimization of metabolite biosynthesis, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35 (2) (2019) 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2606-0>.
- [25] N. Buschke, R. Schäfer, J. Becker, C. Wittmann, Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications - Optimization of substrate spectrum and process robustness by rational and evolutive strategies, *Bioresource Technology* 135 (2013) 544-554. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.047>.
- [26] D.N. Moysés, V.C.B. Reis, J.R.M. de Almeida, L.M.P. de Moraes, F.A.G. Torres, Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects, *International Journal of Molecular Sciences* 17 (3) (2016) 1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms17030207>.
- [27] W.H. Lee, Y.S. Jin, Evaluation of ethanol production activity by engineered *Saccharomyces cerevisiae* fermenting cellobiose through the phosphorolytic pathway in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose, *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (9) (2017) 1649-1656. <https://doi.org/10.4014/jmb.1705.05039>.
- [28] J.M. Bracher, M.D. Verhoeven, H.W. Wisselink, B. Crimi, J.G. Nijland, A.J.M. Driessen, P. Klaassen, A.J.A. Van Maris, J.M.G. Daran, J.T. Pronk, The *Penicillium chrysogenum* transporter PcAraT enables high-affinity, glucose-insensitive l-arabinose transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology for Biofuels* 11 (1) (2018) 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1047-6>.
- [29] V. Koppolu, V.K. Vasigala, Role of *Escherichia coli* in Biofuel Production , *Microbiology Insights* 9 (2016) 29-35. <https://doi.org/10.4137/mbi.s10878>.
- [30] S. Sherkhanov, T.P. Korman, S.G. Clarke, J.U. Bowie, Production of FAME biodiesel in *E. coli* by direct methylation with an insect enzyme, *Scientific Reports* 6 (2016) 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep24239>.
- [31] L. Wenning, C.S. Ejsing, F. David, R.R. Sprenger, J. Nielsen, V. Siewers, Increasing jojoba-like wax ester production in *Saccharomyces cerevisiae* by

- enhancing very long-chain, monounsaturated fatty acid synthesis, *Microbial Cell Factories* 18 (1) (2019) 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1098-9>.
- [32] A. Bergman, D. Vitay, J. Hellgren, Y. Chen, J. Nielsen, V. Siewers, Effects of overexpression of STB5 in *Saccharomyces cerevisiae* on fatty acid biosynthesis, physiology and transcriptome, *FEMS Yeast Research* 19 (3) (2019) 1-16. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz027>.
- [33] N. Arora, S. Tripathi, K.M. Poluri, V. Pruthi, Advanced gene technology and synthetic biology approaches to custom design microalgae for biodiesel production, in: *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*, Springer, Singapore (2019) 147-175. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_8.
- [34] S. Jagadevan, A. Banerjee, C. Banerjee, C. Guria, R. Tiwari, M. Baweja, P. Shukla, Recent developments in synthetic biology and metabolic engineering in microalgae towards biofuel production, *Biotechnology for Biofuels* 11 (2018) 1-21. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1181-1>.
- [35] M.P.A. Bellefleur, S.Y. Wanda, R. Curtiss, Characterizing active transportation mechanisms for free fatty acids and antibiotics in *Synechocystis sp. PCC 6803*, *BMC biotechnology* 19 (2019) 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0500-3>.
- [36] K.A. Markham, H.S. Alper, Synthetic Biology Expands the Industrial Potential of *Yarrowia lipolytica*, *Trends in Biotechnology* 36 (10) (2018) 1085-1095. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.004>.
- [37] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae beats bioethanol, *Trends in Biotechnology* 26 (3) (2008) 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>.
- [38] R.W. Davis, A.J. Siccardi, N.D. Huysman, N.B. Wyatt, J.C. Hewson, T.W. Lane, Growth of mono- and mixed cultures of *Nannochloropsis salina* and *Phaeodactylum tricornutum* on struvite as a nutrient source, *Bioresource Technology* 198 (2015) 577-585. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.070>.
- [39] J. Popko, C. Herrfurth, K. Feussner, T. Ischebeck, T. Iven, R. Haslam, M. Hamilton, O. Sayanova, J. Napier, I. Khozin-Goldberg, I. Feussner, Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricornutum*, *PLoS ONE* 11 (10) (2016) 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164673>.
- [40] S. Atsumi, W. Higashide, J.C. Liao, Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde, *Nature Biotechnology*. 27(12) (2009) 1177-1180. <https://doi.org/10.1038/nbt.1586>.
- [41] P.J. Strong, S. Xie, W.P. Clarke, Methane as a resource: Can the methanotrophs add value?, *Environmental Science and Technology* 49 (7) (2015) 4001-4018. <https://doi.org/10.1021/es504242n>.
- [42] S. Atsumi, T. Hanai, J.C. Liao, Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels, *Nature* 451 (7174) (2008) 86-89. <https://doi.org/10.1038/nature06450>.
- [43] S. Atsumi, A.F. Cann, M.R. Connor, C.R. Shen, K.M. Smith, M.P. Brynildsen,

- K.J.Y. Chou, T. Hanai, J.C. Liao, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production, *Metabolic Engineering* 10 (2008) 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.08.003>.
- [44] M.A. Rude, A. Schirmer, New microbial fuels: a biotech perspective, *Current Opinion in Microbiology* 12 (2009) 274-281. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.04.004>.
- [45] B.K. Singh, P. Trivedi, Microbiome and the future for food and nutrient security, *Microbial Biotechnology* 10 (2017) 50-53. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12592>.
- [46] Y.Y. Tye, K.T. Lee, W.N. Wan Abdullah, C.P. Leh, The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 60 (2016) 155-172. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.01.072>.
- [47] L.K. Narnoliya, J.S. Jadaun, S.P. Singh, Management of Agro-industrial Wastes with the Aid of Synthetic Biology, in: *Biosynthetic Technology and Environmental Challenges*. Springer, Singapore (2018) 11-28. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9_2.
- [48] S. Paul, A. Dutta, Challenges and opportunities of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion, *Resources, Conservation and Recycling* 130 (2018) 164-174. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.12.005>.
- [49] N. Dahmen, I. Lewandowski, S. Zibek, A. Weidtmann, Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives, *GCB Bioenergy* 11 (1) (2019) 107-117. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12586>.
- [50] E. Talamini, C. Eduardo Caldarelli, E.F.M. Wubben, H. Dewes, The composition and impact of stakeholders' agendas on US ethanol production, *Energy Policy* 50 (2012) 647-658. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2012.08.005>.
- [51] E. Talamini, E.F.M. Wubben, A. Domingos Padula, H. Dewes, Scanning the macro-environment for liquid biofuels: A comparative analysis from public policies in Brazil, United States and Germany, *Journal of Strategy and Management* 6 (2013) 40-60. <https://doi.org/10.1108/17554251311296558>.
- [52] J. Gomes, H. Dewes, Disciplinary dimensions and social relevance in the scientific communications on biofuels, *Scientometrics* 110 (3) (2017) 1173-1189. <https://doi.org/10.1007/s11192-016-2233-6>.
- [53] J.M. Clomburg, R. Gonzalez, Biofuel production in *Escherichia coli*: The role of metabolic engineering and synthetic biology, *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (2010) 419-434. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2446-1>.
- [54] B.M. Berla, R. Saha, C.M. Immethun, C.D. Maranas, T.S. Moon, H.B. Pakrasi, Synthetic biology of cyanobacteria: Unique challenges and opportunities, *Frontiers in Microbiology* 4 (2013) 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00246>.
- [55] D. Zilberman, E. Kim, S. Kirschner, S. Kaplan, J. Reeves, Technology and the future bioeconomy, *Agricultural Economics* 44 (2013) 95-102. <https://doi.org/10.1111/agec.12054>.

- [56] M.B. Synnestevedt, C. Chen, J.H. Holmes, CiteSpace II: visualization and knowledge discovery in bibliographic databases, *AMIA Annual Symposium Proceedings 2005* (2005) 724-728.
- [57] C. Chen, CiteSpace II: Detecting and visualizing emerging trends and transient patterns in scientific literature, *Journal of the American Society for Information Science and Technology* 59 (9) (2008) 1493-1512. <https://doi.org/10.1002/asi.20317>.
- [58] A. Mogoutov, B. Kahane, Data search strategy for science and technology emergence: A scalable and evolutionary query for nanotechnology tracking, *Research Policy* 36 (6) (2007) 893-903. <https://doi.org/10.1016/j.respol.2007.02.005>.
- [59] L.R. Jarboe, X. Zhang, X. Wang, J.C. Moore, K.T. Shanmugam, L.O. Ingram, Metabolic Engineering for Production of Biorenewable Fuels and Chemicals: Contributions of Synthetic Biology, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010 (2010) 1-18. <https://doi.org/10.1155/2010/761042>.
- [60] D. Julleson, F. David, B. Pflieger, J. Nielsen, Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals, *Biotechnology Advances* 33 (7) (2015) 1395-1402. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.011>.
- [61] J. Nielsen, J.D. Keasling, Synergies between synthetic biology and metabolic engineering, *Nature Biotechnology* 29 (8) (2011) 693-695. <https://doi.org/10.1038/nbt.1937>.
- [62] B. Raimbault, J.P. Cointet, P.B. Joly, Mapping the Emergence of Synthetic Biology, *Plos One* 11 (2016) 19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161522>.
- [63] Yeung, A. W. K., Tzvetkov, N. T., Gupta, V. K., Gupta, S. C., Orive, G., Bonn, G. K., ... & Silva, A. S., Current research in biotechnology: Exploring the biotech forefront, *Current Research in Biotechnology* 1 (2019) 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2019.08.003>.
- [64] C. Chen, F. Ibekwe-SanJuan, J. Hou, The structure and dynamics of cocitation clusters: A multiple-perspective cocitation analysis, *Journal of the American Society for Information Science and Technology* 61 (7) (2010) 1386-1409. <https://doi.org/10.1002/asi.21309>.
- [65] J. Kleinberg, Bursty and Hierarchical Structure in Streams, *Data Mining and Knowledge Discovery* 7 (2002) 373-397. <https://doi.org/10.1023/A:1024940629314>.
- [66] C. Chen, L. Leydesdorff, Patterns of connections and movements in dual-map overlays: A new method of publication portfolio analysis, *Journal of the American Society for Information Science and Technology* 65 (2014) 334-351. <https://doi.org/10.1002/asi.22968>.
- [67] J. Hou, X. Yang, C. Chen, Emerging trends and new developments in information science: a document co-citation analysis (2009-2016), *Scientometrics* 115 (2) (2018) 869-892. <https://doi.org/10.1007/s11192-018-2695-9>.
- [68] S. Ma, X. Yu, Q. Chen, Hotspots analysis and its applications in vocational

- education with citespace, in: Proceedings - 10th International Conference on Information Technology in Medicine and Education, ITME (2019) 394-398. <https://doi.org/10.1109/ITME.2019.00095>.
- [69] Y. Guangfen, Z. Dongke, An Analysis Based on Citespace III Knowledge Maps of Chinese Vocational Education Research, *Chinese Education and Society* 50 (5-6) (2017) 499-519. <https://doi.org/10.1080/10611932.2017.1408304>.
- [70] P.J. Rousseeuw, Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis, *Journal of Computational and Applied Mathematics* 20 (1987) 53-65. [https://doi.org/10.1016/0377-0427\(87\)90125-7](https://doi.org/10.1016/0377-0427(87)90125-7).
- [71] C. Chen, Science Mapping: A Systematic Review of the Literature, *Journal of Data and Information Science* 2 (2) (2017) 1-40. <https://doi.org/10.1515/jdis-2017-0006>.
- [72] L.C. Freeman, Centrality in social networks conceptual clarification, *Social Networks* 1 (3) (1978) 215-239. [https://doi.org/10.1016/0378-8733\(78\)90021-7](https://doi.org/10.1016/0378-8733(78)90021-7).
- [73] C. Olmeda-Gómez, C. Romá-Mateo, M.A. Ovalle-Perandones, Overview of trends in global epigenetic research (2009–2017), *Scientometrics* 119 (2019) 1545 - 1574 . <https://doi.org/10.1007/s11192-019-03095-y>.
- [74] C. Chen, CiteSpace II : Detecting and Visualizing Emerging Trends, *Journal of the American Society for Information Science and Technology* 59 (9) (2008) 1493-1512. <https://doi.org/10.1002/asi>.
- [75] H. Liu, K.N.G. Valdehuesa, K.R.M. Ramos, G.M. Nisola, W.K. Lee, W.J. Chung, L-arabonate and D-galactonate production by expressing a versatile sugar dehydrogenase in metabolically engineered *Escherichia coli*, *Bioresource Technology* 159 (2014) 455–459. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.056>.
- [76] K.N.G. Valdehuesa, H. Liu, K.R.M. Ramos, S.J. Park, G.M. Nisola, W.K. Lee, W.J. Chung, Direct bioconversion of D-xylose to 1,2,4-butanetriol in an engineered *Escherichia coli*, *Process Biochemistry* 49 (2014) 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.10.002>.
- [77] S. Zhang, J.M. Skerker, C.D. Rutter, M.J. Maurer, A.P. Arkin, C. V. Rao, Engineering *Rhodospiridium toruloides* for increased lipid production, *Biotechnology and Bioengineering* 113 (5) (2016) 1056-1066. <https://doi.org/10.1002/bit.25864>.
- [78] E.J. Oh, J.M. Skerker, S.R. Kim, N. Wei, T.L. Turner, M.J. Maurer, A.P. Arkin, Y.S. Jin, Gene Amplification on Demand Accelerates Cellobiose Utilization in Engineered *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology* 82 (2016) 3631–3639. <https://doi.org/10.1128/aem.00410-16>.
- [79] L. Zhang, E. King, R. Luo, H. Li, Development of a High-Throughput, *In Vivo* Selection Platform for NADPH-Dependent Reactions Based on Redox Balance Principles, *ACS Synthetic Biology* 7 (2018) 1715–1721. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00179>.
- [80] W.B. Black, L.Y. Zhang, C. Kamoku, J.C. Liao, H. Li, Rearrangement of Coenzyme A-Acylated Carbon Chain Enables Synthesis of Isobutanol via a Novel Pathway in *Ralstonia eutropha*, *Acs Synthetic Biology* 7 (2018) 794–800. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00409>.

- [81] W.B. Black, E. King, Y. Wang, A. Jenic, A.T. Rowley, K. Seki, R. Luo, H. Li, Engineering a Coenzyme A Detour To Expand the Product Scope and Enhance the Selectivity of the Ehrlich Pathway, *ACS Synthetic Biology* 7 (2018) 794–800. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00358>.
- [82] T. Ryzdzak, D. Garcia, D.M. Stevenson, M. Sladek, D.M. Klingeman, E.K. Holwerda, D. Amador-Noguez, S.D. Brown, A.M. Guss, Deletion of Type I glutamine synthetase deregulates nitrogen metabolism and increases ethanol production in *Clostridium thermocellum*, *Metabolic Engineering* 41 (2017) 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.04.002>.
- [83] R. Biswas, T.Y. Zheng, D.G. Olson, L.R. Lynd, A.M. Guss, Elimination of hydrogenase active site assembly blocks H-2 production and increases ethanol yield in *Clostridium thermocellum*, *Biotechnology for Biofuels* 8 (2015) 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0204-4>.
- [84] J. Alonso-Gutierrez, E.M. Kim, T.S. Batth, N. Cho, Q.J. Hu, L.J.G. Chan, C.J. Petzold, N.J. Hinson, P.D. Adams, J.D. Keasling, H.G. Martin, T.S. Lee, Principal component analysis of proteomics (PCAP) as a tool to direct metabolic engineering, *Metabolic Engineering* 28 (2015) 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.11.011>.
- [85] B.Y. Peng, M.R. Plan, P. Chrysanthopoulos, M.P. Hodson, L.K. Nielsen, C.E. Vickers, A squalene synthase protein degradation method for improved sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*, *Metabolic Engineering* 39 (2017) 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.12.003>.
- [86] B. Peng, M.R. Plan, A. Carpenter, L.K. Nielsen, C.E. Vickers, Coupling gene regulatory patterns to bioprocess conditions to optimize synthetic metabolic modules for improved sesquiterpene production in yeast, *Biotechnology for Biofuels* 10 (1) (2017) 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0728-x>.
- [87] E. Brunk, K.W. George, J. Alonso-Gutierrez, M. Thompson, E. Baidoo, G. Wang, C.J. Petzold, D. McCloskey, J. Monk, L. Yang, E.J. O'Brien, T.S. Batth, H.G. Martin, A. Feist, P.D. Adams, J.D. Keasling, B.O. Palsson, T.S. Lee, Characterizing Strain Variation in Engineered *E. coli* Using a Multi-Omics-Based Workflow, *Cell Systems* 2 (2016) 335–346. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.04.004>.
- [88] S. Gionata, G. Scalcinati, S. Partow, V. Siewers, M. Schalk, L. Daviet, J. Nielsen, Combined metabolic engineering of precursor and co-factor supply to increase α -santalene production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbial Cell Factories* 11 (1) (2012) 1-16. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-117>
- [89] P. Hammar, S.A. Angermayr, S.L. Sjostrom, J. van der Meer, K.J. Hellingwerf, E.P. Hudson, H.N. Joensson, Single-cell screening of photosynthetic growth and lactate production by cyanobacteria, *Biotechnology for Biofuels* 8 (2015) 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0380-2>.
- [90] S. Partow, V. Siewers, L. Daviet, M. Schalk, J. Nielsen, Reconstruction and Evaluation of the Synthetic Bacterial MEP Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Plos One* 7 (2012) 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052498>.

- [91] R. Yamada, K. Wakita, R. Mitsui, R. Nishikawa, H. Ogino, Efficient production of 2,3-butanediol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through modulation of gene expression by cocktail delta-integration, *Bioresource Technology* 245 (2017) 1558–1566. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.034>.
- [92] T. Hasunuma, A. Kondo, Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering, *Biotechnology Advances* 30 (2012) 1207–1218. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.011>.
- [93] T. Sanda, T. Hasunuma, F. Matsuda, A. Kondo, Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids, *Bioresource Technology* 102 (17) (2011) 7917-7924. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.028>.
- [94] R. Yamada, K. Wakita, R. Mitsui, H. Ogino, Enhanced D-lactic Acid Production by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Following Optimization of the Global Metabolic Pathway, *Biotechnology and Bioengineering* 114 (2017) 2075–2084. <https://doi.org/10.1002/bit.26330>.
- [95] S. Balamurugan, X. Wang, H.L. Wang, C.J. An, H. Li, D.W. Li, W.D. Yang, J.S. Liu, H.Y. Li, Occurrence of plastidial triacylglycerol synthesis and the potential regulatory role of AGPAT in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Biotechnology for Biofuels* 10 (2017) 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0786-0>.
- [96] Y. Yao, Y. Lu, K.T. Peng, T. Huang, Y.F. Niu, W.H. Xie, W.D. Yang, J.S. Liu, H.Y. Li, Glycerol and neutral lipid production in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* promoted by overexpression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, *Biotechnology for Biofuels* 7 (1) (2014) 1-9. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-110>.
- [97] Y.H. Ma, X. Wang, Y.F. Niu, Z.K. Yang, M.H. Zhang, Z.M. Wang, W.D. Yang, J.S. Liu, H.Y. Li, Antisense knockdown of pyruvate dehydrogenase kinase promotes the neutral lipid accumulation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Microbial Cell Factories* 13 (1) (2014) 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0100-9>.
- [98] M. Wang, L. Liu, L. Fan, T. Tan, CRISPRi based system for enhancing 1-butanol production in engineered *Klebsiella pneumoniae*, *Process Biochemistry* 56 (2017) 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.02.013>.
- [99] P.P. Peralta-Yahya, F. Zhang, S.B. Del Cardayre, J.D. Keasling, Microbial engineering for the production of advanced biofuels, *Nature* 488 (7411) (2012) 320-328. <https://doi.org/10.1038/nature11478>.
- [100] S. Atsumi, T. Hanai, J.C. Liao, Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels, *Nature* 451 (2008) 86-89. <https://doi.org/10.1038/nature06450>.
- [101] D.G. Gibson, L. Young, R.Y. Chuang, J.C. Venter, C.A. Hutchison, H.O. Smith, Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases, *Nature Methods* 6 (2009), 343-345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.

- [102] S. Atsumi, A.F. Cann, M.R. Connor, C.R. Shen, K.M. Smith, M.P. Brynildsen, K.J.Y. Chou, T. Hanai, J.C. Liao, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production, *Metabolic Engineering* 10 (6) (2008) 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.08.003>.
- [103] C.R. Shen, E.I. Lan, Y. Dekishima, A. Baez, K.M. Cho, J.C. Liao, Driving Forces Enable High-Titer Anaerobic 1-Butanol Synthesis in *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*. (2011). <https://doi.org/10.1128/aem.03034-10>.
- [104] S. Atsumi, W. Higashide, J.C. Liao, Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde, *Nature Biotechnology* 27 (12) (2009) 1177-1180. <https://doi.org/10.1038/nbt.1586>.
- [105] M. Tai, G. Stephanopoulos, Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production, *Metabolic Engineering* 15 (2013) 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.08.007>.
- [106] C. Dellomonaco, F. Fava, R. Gonzalez, The path to next generation biofuels: Successes and challenges in the era of synthetic biology, *Microbial Cell Factories* 9 (2010) 1-15. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-1>.
- [107] F. Zhang, J.M. Carothers, J.D. Keasling, Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids, *Nature Biotechnology* 30 (4) (2012) 354-359. <https://doi.org/10.1038/nbt.2149>.
- [108] W. Rungtaphan, J.D. Keasling, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals, *Metabolic Engineering* 21 (2014) 103-113. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.07.003>.
- [109] C. Rigouin, M. Gueroult, C. Croux, G. Dubois, V. Borsenberger, S. Barbe, A. Marty, F. Daboussi, I. André, F. Bordes, Production of Medium Chain Fatty Acids by *Yarrowia lipolytica*: Combining Molecular Design and TALEN to Engineer the Fatty Acid Synthase, *ACS Synthetic Biology* 6 (2017) 1870–1879. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00034>.
- [110] C. Rigouin, C. Croux, V. Borsenberger, M. Ben Khaled, T. Chardot, A. Marty, F. Bordes, Increasing medium chain fatty acids production in *Yarrowia lipolytica* by metabolic engineering, *Microbial Cell Factories* 17 (2018) 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0989-5>.
- [111] A.Q. Yu, Y.K. Zhao, Y.R. Pang, Z.H. Hu, C.Y. Zhang, D.G. Xiao, M.W. Chang, S.S.J. Leong, An oleaginous yeast platform for renewable 1-butanol synthesis based on a heterologous CoA-dependent pathway and an endogenous pathway, *Microbial Cell Factories* 17 (2018) 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1014-8>.
- [112] A.K. Lobs, C. Schwartz, I. Wheeldon, Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications, *Synthetic and Systems Biotechnology* 2 (2017) 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.08.002>.
- [113] L.H. Hagen, J.A. Frank, M. Zamanzadeh, V.G.H. Eijsink, P.B. Pope, S.J. Horn, M. Arntzen, Quantitative metaproteomics highlight the metabolic contributions of uncultured phylotypes in a thermophilic anaerobic digester, *Applied and*

- Environmental Microbiolog 83 (2) (2017) 1-15.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01955-16>.
- [114] L.N. Jayakody, C.W. Johnson, J.M. Whitham, R.J. Giannone, B.A. Black, N.S. Cleveland, D.M. Klingeman, W.E. Michener, J.L. Olstad, D.R. Vardon, R.C. Brown, S.D. Brown, R.L. Hettich, A.M. Guss, G.T. Beckham, Thermochemical wastewater valorization: Via enhanced microbial toxicity tolerance, *Energy and Environmental Science* 11 (6) (2018) 1625-1638.
<https://doi.org/10.1039/c8ee00460a>.
- [115] Y. Chen, Y. Wang, T.H. Chen, M.D. Yao, W.H. Xiao, B.Z. Li, Y.J. Yuan, Identification and manipulation of a novel locus to improve cell tolerance to short-chain alcohols in *Escherichia coli*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 11 (6) (2018) 1625-1638. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1996-y>.
- [116] I. Bervoets, M. Van Brempt, K. Van Nerom, B. Van Hove, J. Maertens, M. De Mey, D. Charlier, A sigma factor toolbox for orthogonal gene expression in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Research* 46 (2018) 2133–2144.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky010>.
- [117] J. Speda, B.H. Jonsson, U. Carlsson, M. Karlsson, Metaproteomics-guided selection of targeted enzymes for bioprospecting of mixed microbial communities, *Biotechnology for Biofuels* 10 (1) (2017) 1-17.
<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0815-z>.
- [118] S. Pandey, Prospects of metagenomic cellulases for converting lignocellulosic biomass into bio-ethanol, *Journal of Pure and Applied Microbiology* 11 (2) (2017) 1079-1090. <https://doi.org/10.22207/JPAM.11.2.51>.
- [119] W. Hollinshead, L. He, Y.J. Tang, Biofuel production: An odyssey from metabolic engineering to fermentation scale-up, *Frontiers in Microbiology* 11 (2) (2017) 1079-1090. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00344>.
- [120] H. Akinosho, K. Yee, D. Close, A. Ragauskas, The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications, *Frontiers in Chemistry* 2 (2014) 1-18.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00066>.
- [121] J.K. Ko, Y. Um, H.M. Woo, K.H. Kim, S.M. Lee, Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway, *Bioresource Technology* 209 (2016) 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.124>.
- [122] D. Radecka, V. Mukherjee, R.Q. Mateo, M. Stojiljkovic, M.R. Foulquié-Moreno, J.M. Thevelein, Looking beyond *Saccharomyces*: The potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation, *FEMS Yeast Research* 15 (6) (2015) 1-13. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>.
- [123] R.C. Kuhad, D. Deswal, S. Sharma, A. Bhattacharya, K.K. Jain, A. Kaur, B.I. Pletschke, A. Singh, M. Karp, Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges, *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 55 (2016) 249–272. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.132>.
- [124] M. Bilal, M.Z. Nawaz, H.M.N. Iqbal, J.L. Hou, S. Mahboob, K.A. Al-Ghanim,

- H.R. Cheng, Engineering Ligninolytic Consortium for Bioconversion of Lignocelluloses to Ethanol and Chemicals, *Protein and Peptide Letters* 25 (2018) 108–119. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180122105835>.
- [125] S. Zhou, G. Du, Z. Kang, J. Li, J. Chen, H. Li, J. Zhou, The application of powerful promoters to enhance gene expression in industrial microorganisms, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33 (2) (2017) 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2184-3>.
- [126] Z.Y. Dossani, A.R. Apel, H. Szmids-Middleton, N.J. Hillson, S. Deutsch, J.D. Keasling, A. Mukhopadhyay, A combinatorial approach to synthetic transcription factor-promoter combinations for yeast strain engineering, *Yeast* 35 (2018) 273–280. <https://doi.org/10.1002/yea.3292>.
- [127] S. Kwon, N.K. Kang, H.G. Koh, S.E. Shin, B. Lee, B.R. Jeong, Y.K. Chang, Enhancement of biomass and lipid productivity by overexpression of a bZIP transcription factor in *Nannochloropsis salina*, *Biotechnology and Bioengineering* 115 (2018) 331–340. <https://doi.org/10.1002/bit.26465>.
- [128] T. Matsu-ura, A.A. Dovzhenok, S.T. Coradetti, K.R. Subramanian, D.R. Meyer, J.J. Kwon, C. Kim, N. Salomonis, N.L. Glass, S. Lim, C.I. Hong, Synthetic Gene Network with Positive Feedback Loop Amplifies Cellulase Gene Expression in *Neurospora crassa*, *Acs Synthetic Biology* 7 (2018) 1395–1405. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00011>.
- [129] C.Q. Liu, K. Zhang, W.Y. Cao, G. Zhang, G.Q. Chen, H.Y. Yang, Q. Wang, H.B. Liu, M. Xian, H.B. Zhang, Genome mining of 2-phenylethanol biosynthetic genes from *Enterobacter* sp CGMCC 5087 and heterologous overproduction in *Escherichia coli*, *Biotechnology for Biofuels* 11 (2018) 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1297-3>.
- [130] H.J. Hwang, S.Y. Lee, P.C. Lee, Engineering and application of synthetic nar promoter for fine-tuning the expression of metabolic pathway genes in *Escherichia coli*, *Biotechnology for Biofuels*. 11 (2018) 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1104-1>.
- [131] I. Buhaescu, H. Izzedine, Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications, *Clinical Biochemistry* 40 (2007) 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.03.016>.
- [132] J. Alonso-Gutierrez, D. Koma, Q.J. Hu, Y.C. Yang, L.J.G. Chan, C.J. Petzold, P.D. Adams, C.E. Vickers, L.K. Nielsen, J.D. Keasling, T.S. Lee, Toward industrial production of isoprenoids in *Escherichia coli*: Lessons learned from CRISPR-Cas9 based optimization of a chromosomally integrated mevalonate pathway, *Biotechnology and Bioengineering* 115 (2018) 1000–1013. <https://doi.org/10.1002/bit.26530>.
- [133] X.W. Guo, Y. Zhang, L.L. Li, X.Y. Guan, J. Guo, D.G. Wu, Y.F. Chen, D.G. Xiao, Improved xylose tolerance and 2,3-butanediol production of *Klebsiella pneumoniae* by directed evolution of rpoD and the mechanisms revealed by transcriptomics, *Biotechnology for Biofuels* 11 (1) (2018) 1-18. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1312-8>.
- [134] M.N. Rhie, H.T. Kim, S.Y. Jo, L.L. Chu, K.A. Baritugo, M.G. Baylon, J. Lee,

- J.G. Na, L.H. Kim, T.W. Kim, C. Park, S.H. Hong, J.C. Joo, S.J. Park, Recent Advances in the Metabolic Engineering of *Klebsiella pneumoniae*: A Potential Platform Microorganism for Biorefineries, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 24 (1) (2019) 48-64. <https://doi.org/10.1007/s12257-018-0346-x>.
- [135] R.S. Allen, K. Tilbrook, A.C. Warden, P.C. Campbell, V. Rolland, S.P. Singh, C.C. Wood, Expression of 16 nitrogenase proteins within the plant mitochondrial matrix, *Frontiers in Plant Science* 8 (2017) 1-14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00287>.
- [136] J.M. Park, C. Rathnasingh, H. Song, Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* based on in silico analysis and its pilot-scale application for 1,3-propanediol and 2,3-butanediol co-production, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 44 (2017) 431–441. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1898-4>.
- [137] C.N. Dasgupta, M.R. Suseela, S.K. Mandotra, P. Kumar, M.K. Pandey, K. Toppo, J.A. Lone, Dual uses of microalgal biomass: An integrative approach for biohydrogen and biodiesel production, *Applied Energy* 146 (2015) 202-208. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.070>.
- [138] Y. Maeda, T. Yoshino, T. Matsunaga, M. Matsumoto, T. Tanaka, Marine microalgae for production of biofuels and chemicals, *Current Opinion in Biotechnology* 50 (2018) 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.018>.
- [139] X. Wang, H.P. Dong, W. Wei, S. Balamurugan, W.D. Yang, J.S. Liu, H.Y. Li, Dual expression of plastidial GPAT1 and LPAT1 regulates triacylglycerol production and the fatty acid profile in *Phaeodactylum tricorutum*, *Biotechnology for Biofuels* 11 (2018) 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1317-3>.
- [140] X. Wang, W. Wei, N.J. Li, W.S.Q. Yuan, Y. Ding, W.D. Yang, J.S. Liu, S. Balamurugan, H.Y. Li, Heterogeneous expression of human PNPLA3 triggers algal lipid accumulation and lipid droplet enlargement, *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 31 (2018) 276–281. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.019>.
- [141] Z. Adler-Agnon (Shemesh), S. Leu, A. Zarka, S. Boussiba, I. Khozin-Goldberg, Novel promoters for constitutive and inducible expression of transgenes in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* under varied nitrate availability, *Journal of Applied Phycology* 30 (5) (2018) 2763-2772. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1335-8>.
- [142] J.D. Keasling, Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering, *Metabolic Engineering* 14 (3) (2012) 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.01.004>.
- [143] R. Kelwick, J.T. MacDonald, A.J. Webb, P. Freemont, Developments in the Tools and Methodologies of Synthetic Biology, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 14 (3) (2012) 189-195. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00060>.
- [144] C.J. Paddon, J.D. Keasling, Semi-synthetic artemisinin: A model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development, *Nature Reviews Microbiology* 12 (5) (2014) 355-367. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3240>.

- [145] X. Zou, L. Wang, Z. Li, J. Luo, Y. Wang, Z. Deng, S. Du, S. Chen, Genome Engineering and Modification Toward Synthetic Biology for the Production of Antibiotics, *Medicinal Research Reviews* 38 (1) (2018) 229-260. <https://doi.org/10.1002/med.21439>.
- [146] A. Sengupta, H.B. Pakrasi, P.P. Wangikar, Recent advances in synthetic biology of cyanobacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (13) (2018) 5457-5471. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9046-x>.
- [147] M.J. Smanski, H. Zhou, J. Claesen, B. Shen, M.A. Fischbach, C.A. Voigt, Synthetic biology to access and expand nature's chemical diversity, *Nature Reviews Microbiology* 14 (2016) 1-15. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.24>.
- [148] L. Katz, Y.Y. Chen, R. Gonzalez, T.C. Peterson, H. Zhao, R.H. Baltz, Synthetic biology advances and applications in the biotechnology industry: a perspective, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 45 (2018) 449-461. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2056-y>.
- [149] T. Si, H. Zhao, A brief overview of synthetic biology research programs and roadmap studies in the United States, *Synthetic and Systems Biotechnology* 1 (4) (2016) 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.08.003>.
- [150] Y. Flores Bueso, M. Tangney, Synthetic Biology in the Driving Seat of the Bioeconomy, *Trends in Biotechnology* 35 (5) (2017) 373-378. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.02.002>.
- [151] G.K. Gronvall, US Competitiveness in Synthetic Biology, *Health Security* 13 (6) (2015) 378-389. <https://doi.org/10.1089/hs.2015.0046>.
- [152] S. Atsumi, M.R. Connor, Synthetic biology guides biofuel production, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010 (2010) 1-9. <https://doi.org/10.1155/2010/541698>.
- [153] F. Darvishi, M. Ariana, E.R. Marella, I. Borodina, Advances in synthetic biology of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for producing non-native chemicals, *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (2018) 5925-5938. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9099-x>.
- [154] G. Xu, A. Wu, L. Xiao, R. Han, Y. Ni, Enhancing butanol tolerance of *Escherichia coli* reveals hydrophobic interaction of multi-tasking chaperone SecB, *Biotechnology for Biofuels* 12 (1) (2019) 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1507-7>.
- [155] H.J. Hwang, S.Y. Lee, P.C. Lee, Engineering and application of synthetic nar promoter for fine-tuning the expression of metabolic pathway genes in *Escherichia coli*, *Biotechnology for Biofuels* 11 (1) (2018) 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1104-1>.
- [156] Y. Chen, D. Banerjee, A. Mukhopadhyay, C.J. Petzold, Systems and synthetic biology tools for advanced bioproduction hosts, *Current Opinion in Biotechnology* 64 (2020) 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.007>.
- [157] F. Cheng, X.L. Tang, T. Kardashliev, Transcription Factor-Based Biosensors in High-Throughput Screening: Advances and Applications, *Biotechnology Journal* 13 (7) (2018) 1-8. <https://doi.org/10.1002/biot.201700648>.
- [158] C.M. Schwartz, M.S. Hussain, M. Blenner, I. Wheeldon, Synthetic RNA

- Polymerase III Promoters Facilitate High-Efficiency CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Yarrowia lipolytica*, *ACS Synthetic Biology* 5 (4) (2016) 356-359. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00162>.
- [159] D. Gao, S. Smith, M. Spagnuolo, G. Rodriguez, M. Blenner, Dual CRISPR-Cas9 Cleavage Mediated Gene Excision and Targeted Integration in *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnology Journal* 13 (9) (2018) 1-8. <https://doi.org/10.1002/biot.201700590>.
- [160] D. R.W., S. A.J., H. N.D., W. N.B., H. J.C., L. T.W., Growth of mono- and mixed cultures of *Nannochloropsis salina* and *Phaeodactylum tricornutum* on struvite as a nutrient source, *Bioresource Technology* 198 (2015) 577-585. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.070>.
- [161] M. Santos-Merino, M.P. Garcillán-Barcia, F. De La Cruz, Engineering the fatty acid synthesis pathway in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 improves omega-3 fatty acid production, *Biotechnology for Biofuels* 11 (1) (2018) 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1243-4>.
- [162] N. V. Maheshwari, Agro-industrial lignocellulosic waste: An alternative to unravel the future bioenergy, *Biofuels: Greenhouse Gas Mitigation and Global Warming: Next Generation Biofuels and Role of Biotechnology* (2018) 291-305. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3763-1_16.
- [163] S. González-García, P. Gullón, B. Gullón, Bio-compounds Production from Agri-food Wastes Under a Biorefinery Approach: Exploring Environmental and Social Sustainability. Quantification of Sustainability Indicators in the Food Sector. Springer, Singapore, (2019) 25-53. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2408-6_2.
- [164] M.R. Siddiqui, A. Miranda, A. Mouradov, Microalgae as Bio-Converters of Wastewater into Biofuel and Food, in: *Water Scarcity and Ways to Reduce the Impact*. Springer, Cham, 2019 75-94. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75199-3_5.
- [165] J.K. Ko, S.M. Lee, Advances in cellulosic conversion to fuels: engineering yeasts for cellulosic bioethanol and biodiesel production, *Current Opinion in Biotechnology* 50 (2018) 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.007>.
- [166] N.M. Kim, R.W. Sinnott, N.R. Sandoval, Transcription factor-based biosensors and inducible systems in non-model bacteria: current progress and future directions, *Current Opinion in Biotechnology* 64 (2020) 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.009>.
- [167] T.Q. Shi, H. Huang, E.J. Kerkhoven, X.J. Ji, Advancing metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* using the CRISPR/Cas system, *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (2018) 9541–9548. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9366-x>.
- [168] L.K.S. Gujjala, S.P.J. Kumar, B. Talukdar, A. Dash, S. Kumar, K.C. Sherpa, R. Banerjee, Biodiesel from oleaginous microbes: opportunities and challenges, *Biofuels* 10 (1) (2019) 45-59. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1402587>.
- [169] S.C. Albers, A.M. Berklund, G.D. Graff, The rise and fall of innovation in biofuels, *Nature Biotechnology* 34 (8) (2016) 814-821.

- <https://doi.org/10.1038/nbt.3644>.
- [170] H.D. Goold, P. Wright, D. Hailstones, Emerging opportunities for synthetic biology in agriculture, *Genes* 9 (7) (2018) 1-17.
<https://doi.org/10.3390/genes9070341>.
- [171] K. V. Pixley, J.B. Falck-Zepeda, K.E. Giller, L.L. Glenna, F. Gould, C.A. Mallory-Smith, D.M. Stelly, C.N. Stewart, Genome Editing, Gene Drives, and Synthetic Biology: Will They Contribute to Disease-Resistant Crops, and Who Will Benefit?, *Annual Review of Phytopathology* 57 (2019) 165-188.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045954>.
- [172] G. Liu, E.K. Gilding, E.D. Kerr, B.L. Schulz, B. Tabet, B.R. Hamaker, I.D. Godwin, Increasing protein content and digestibility in sorghum grain with a synthetic biology approach, *Journal of Cereal Science* 85 (2019) 27-34.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.11.001>.
- [173] E.T. Wurtzel, C.E. Vickers, A.D. Hanson, A.H. Millar, M. Cooper, K.P. Voss-Fels, P.I. Nickel, T.J. Erb, Revolutionizing agriculture with synthetic biology, *Nature Plants* 5 (2019) 1207–1210. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0539-0>.
- [174] A. Tyagi, A. Kumar, S. V. Aparna, R.H. Mallappa, S. Grover, V.K. Batish, Synthetic Biology: Applications in the Food Sector, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56 (11) (2016) 1777-1789.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2013.782534>.
- [175] J.C. Mortimer, Plant synthetic biology could drive a revolution in biofuels and medicine, *Experimental Biology and Medicine* 244 (4) (2019) 323-331.
<https://doi.org/10.1177/1535370218793890>.
- [176] O.N. Sekurova, O. Schneider, S.B. Zotchev, Novel bioactive natural products from bacteria via bioprospecting, genome mining and metabolic engineering, *Microbial Biotechnology* 12 (5) (2019) 828-844. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13398>.
- [177] A. Aguilar, T. Twardowski, R. Wohlgemuth, Bioeconomy for Sustainable Development, *Biotechnology Journal* 14 (8) (2019) 1-11.
<https://doi.org/10.1002/biot.201800638>.
- [178] L. Bengyella, S. Iftikhar, K. Nawaz, D.J. Fonmboh, E.L. Yekwa, R.C. Jones, Y.M.T. Njanu, P. Roy, Biotechnological application of endophytic filamentous bipolaris and curvularia: a review on bioeconomy impact, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35 (5) (2019) 1-14.
<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2644-7>.
- [179] H.M. Zabed, S. Akter, J. Yun, G. Zhang, F.N. Awad, X. Qi, J.N. Sahu, Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 105 (2019) 105-128. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.048>.
- [180] P. Havlík, U.A. Schneider, E. Schmid, H. Böttcher, S. Fritz, R. Skalský, K. Aoki, S. De Cara, G. Kindermann, F. Kraxner, S. Leduc, I. McCallum, A. Mosnier, T. Sauer, M. Obersteiner, Global land-use implications of first and second generation biofuel targets, *Energy Policy* 39 (10) (2011) 5690-5702.
<https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.03.030>.

- [181] T.J. Wallington, J.E. Anderson, R.D. De Kleine, H.C. Kim, H. Maas, A.R. Brandt, G.A. Keoleian, When Comparing Alternative Fuel-Vehicle Systems, Life Cycle Assessment Studies Should Consider Trends in Oil Production, *Journal of Industrial Ecology* 21 (2) (2017) 244-248. <https://doi.org/10.1111/jiec.12418>.

5. OPORTUNIDADES TECNOLÓGICAS EM BIOLOGIA SINTÉTICA PARA ETANOL CELULÓSICO: SERÁ O FUTURO DA BIOECONOMIA SUSTENTÁVEL?

Resumo

A biologia sintética está revolucionando a forma como produzimos mercadorias e compostos de alto valor, indispensáveis ao desenvolvimento da sociedade moderna. Para a segurança energética, os avanços nas ferramentas de biologia sintética em microorganismos e plantas contribuem significativamente para progressos da produção de biocombustíveis a partir de matérias-primas de biomassa lignocelulósica. A utilização de microorganismos como fábricas vivas para a produção de etanol apresentam vantagens significativas em comparação à primeira geração de etanol, pois não impactarão no meio ambiente e nem na segurança alimentar para as futuras gerações podendo que. desenvolvendo e ampliando a bioeconomia. Com base nos dados de patentes analisamos as aplicações das ferramentas de biologia sintética relacionadas a etanol celulósico, analisando as tendências tecnológicas, distribuição regional, institucional e de mercado de P&D dos últimos vinte anos (1999-2019). Um total de 298 famílias de patentes foram recuperadas usando o Orbit Intelligence, indicando clara e consistentemente, que a produtividade da inovação vem declinando nos últimos anos. As estradas tecnológicas emergentes foram identificadas como modificação de cepas de leveduras e bactérias utilizando ferramentas de engenharia metabólica, engenharia genética e biologia sintética para uma melhor tolerância às diferentes fontes de carbono, co-fermentação de biomassa lignocelulósica, métodos de propagação de microorganismos e pré-tratamento de biomassa. O país mais produtivo correspondeu aos EUA, onde localizam-se inúmeras empresas e instituições requerentes. Também observamos que o desenvolvimento de fábricas vivas celulares robustas poderá tornar a produção de etanol menos dependente de substratos bioeconômicos alimentares e mais sustentável socioeconomicamente. Podemos concluir que este estudo extrai e apresenta distintas oportunidades tecnológicas, servindo como Proxy para o desenvolvimento da biotecnologia sintética aplicada na produção de etanol celulósico.

Palavras chaves: Produção microbiana, Biodiesel, Bioenergia, Desenvolvimento Social.

5.1. Introdução

A transição de uma economia baseada em recursos fósseis para uma bioeconomia perpassa, necessariamente, pela utilização de biotecnologias sintéticas (Clarke and Kitney, 2016; de Lorenzo and Schmidt, 2018; French, 2019; Srivastava et al., 2020). A biologia sintética vem evoluindo e afetando positivamente a vida humana, oportunizando projetar e construir novas peças biológicas, dispositivos e sistemas não existentes e/ou redesenhar sistemas biológicos já existentes (Benner and Sismour, 2005; Khalil and Collins, 2010; Ren et al., 2020) para a produção de biocombustíveis e produtos químicos úteis (Nielsen and Keasling, 2011; Chownk et al., 2019).

A sobreposição dos campos da biologia sintética e da bioeconomia ocorre quando consideramos esta como parte da economia que se utiliza de novos conhecimentos biológicos para fins comerciais e industriais, melhorando o bem-estar do ser humano (Enriquez, 1998; Zilberman et al., 2013). Contudo, essa percepção se intensifica quando

pensamos em uma utilização sustentável da biomassa para a produção de biocombustíveis-não alimentares (Philp, 2015; Aro, 2016; Dupont-Inglis and Borg, 2018).

Atualmente, o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar pelo Brasil (Rudorff et al., 2010) e de milho pelos EUA (Pimentel and Patzek, 2007) é a principal commodity na cadeia global de combustíveis renováveis com utilização similar a gasolina. Todavia, tal fenômeno fomenta embates científicos sobre a segurança alimentar e o uso da terra, haja vista que tratam-se de matérias-primas à base de amido ou/e açúcar e que podem ser destinadas, direta ou indiretamente, à alimentação humana (Carlson et al., 2012; Cassidy et al., 2013; Fitzherbert et al., 2008; Tomei and Helliwell, 2016; Rulli et al., 2016).

Na produção microbiana de etanol a partir da fermentação de biomassa lignocelulósica essa dependência por matérias-primas alimentícias é superada, sendo uma alternativa sustentável para a geração de bioenergia usando substratos da bioeconomia (Guerriero et al., 2016; Lara-Flores et al., 2018). A biomassa lignocelulósica é uma das matérias-primas mais abundante no globo (Tye et al., 2016; Narnoliya et al., 2018), com uma produção de aproximadamente 181,5 bilhões de toneladas/ano. (Paul and Dutta, 2018; Dahmen et al., 2019), podendo provocar mudanças significativas nos sistemas socioeconômicos, agrícolas e energéticos quando empregada de forma eficiente (Ingle et al., 2019).

No entanto, a biomassa lignocelulósica é composta por polissacarídeos (celulose, hemicelulose e lignina) que fornecem resistência natural às paredes celulares das plantas à desconstrução microbiana em processos de fermentação, conhecida com recalcitrância (Himmel et al., 2007; Somerville et al., 2010), diminuindo os rendimentos e elevando os custos de produção (Yang and Wyman, 2007). Entretanto, com os avanços ferramentais de biologia sintética em meta-genomics (Chen et al., 2018), engenharia genética (EauClaire et al., 2016), sistemas de comunicação ortogonal (Bervoets et al., 2018), metaproteomics (Speda et al., 2017), metabolômica (Pandey, 2017) e engenharia metabólica (Hollinshead et al., 2014; Liao et al., 2016; Du et al., 2019) vem sendo utilizadas na tentativa de solucionar as etapas críticas do processo de fermentação microbiana e elevar os rendimentos na produção de etanol celulósico.

Por ser um campo altamente tecnológico, inúmeras empresas estão começando e crescendo com a biologia sintética para produção de combustíveis renováveis. Do ponto de vista industrial, o estabelecimento de atividades nesse campo não depende apenas da aptidão de um determinado organismo para produzir um determinado composto, mas de tornar-se uma atividade lucrativa no longo prazo. No entanto, o baixos rendimentos,

títulos e produtividade em processos industriais (Chisti 2013; Rahman et al. 2016; Khetkorn et al. 2017; Xue et al. 2017) ainda são recorrentes em função das baixa densidade celular, retardando a expansão industrial eficiente desse campo (Julleson, David, Pflieger and Nielsen 2015). No entanto, não deve ser negligenciado seu uso para a produção de biocombustíveis. Estima-se que a tecnologias de biologia sintética para a produção de etanol estejam disponíveis nos próximos anos (Dehghani Madvar et al., 2019).

O desenvolvimento científico e tecnológico exige grande esforço em capital humano e financeiro pela indústria, e sua posse traz vantagens competitivas ao responsável quando depositadas em um banco de patentes. A análise de patentes é uma das melhores abordagens para acessar os aspectos tecnológicos e comerciais de um campo específico (Devarapalli et al., 2016). Logo, embora, haja interesse em trabalhos anteriores na busca de patentes em etanol celulósico (Gustafsson et al., 2015; Kessler and Sperling, 2016; Karvonen and Klemola, 2019; Toivanen and Novotny, 2017) ou acerca da biologia sintética (van Doren et al., 2013; Carbonell et al., 2016; Ribeiro and Shapira, 2020), não foram verificadas pesquisas que contemplem ambos os campos tecnológicos e sua resposta às necessidades energéticas futuras pautadas em uma bioeconomia sustentável.

Assim, tendo em vista o potencial da biologia sintética para desenvolver e ampliar a bioeconomia sustentável no futuro próximo, a pesquisa se propõe a fornecer uma visão geral dos caminhos, aplicações e tendências em biologia sintética relacionadas a etanol celulósico mediante a análise de patentes. Da mesma forma, analisamos diferentes indicadores para fornecer uma visão geral dos esforços de P&D, panorama geopolítico e institucional, análise de mercado, co-classificação de dados usando o IPC e análise de conteúdo das patentes em biologia sintética relacionadas a etanol celulósico nos últimos 20 anos. Fornecemos um conjunto de dados centrais de alta qualidade a partir do banco de dados do Questel-Orbit podendo contribuir na formulação de novas políticas orientadas para o seu desenvolvimento e aplicação em mercados emergentes, assegurando o desenvolvimento bioeconômico para as próximas gerações (Dehghani Madvar et al., 2019).

5.2.Métodos

Documentos de patentes estão sendo amplamente utilizados para mapear o surgimento de novas tecnologias para a geração bioenergética (Kessler and Sperling, 2016; Toivanen and Novotny, 2017; Arnold et al., 2019; Arbige et al., 2019). Assim, coletamos e

analisamos dados de pedidos de patentes relacionados ao tema em estudo por meio do Orbit Intelligence, considerando como horizonte temporal os últimos vinte anos (1999-2019). O Orbit Intelligence faz parte do portal Questel-Orbit, uma base privada de pesquisa de patentes que abrange mais de 100 autoridades mundiais. As publicações são agrupadas em famílias de patentes (Axonal, 2015). Entendidas como uma coleção de patentes concedidas em vários escritórios de patentes (Wu et al., 2019).

2.3.16 Seleção de fonte de dados e amostra

Realizamos uma análise dos documentos de patentes em 21 de dezembro de 2019 no portal Questel-Orbit usando o Orbit Intelligence. A estratégia de busca para recuperar documentos em biologia sintética relacionados a etanol celulósico consistiu na submissão de palavras-chave criteriosamente selecionadas. A consulta utilizada nesta pesquisa contém três estratégias de busca combinadas nos campos de conceitos, título e resumo dos documentos de patentes. A primeira estratégia acerca-se concerne a diferentes abordagens e ferramentas relacionadas à biotecnologia utilizadas para projetar e construir novos microorganismos ou plantas. A segunda estratégia de pesquisa contempla os tipos de biocombustíveis relacionados ao etanol. A terceira estratégia investiga fontes de matérias-primas empregadas para a produção desse biocombustível. Operadores booleanos e símbolos de proximidade foram utilizados. Assim, a estratégia de recuperação de patentes foi a seguinte: ((synthetic 2D (biolog+ OR genom+ OR nets)) OR (metabolic 2D (engineer+ OR pathway+))) AND (ethanol OR bioethanol OR second generation OR 2G OR Bio alcohol) AND (lignocellulosic 2D (biomas+)) AND (xylose OR hemicellulose OR pentose OR residue OR corn stover OR switchgrass OR rice straw) AND (sugar 2D (cane bagasse OR fermentation)). A classificação das patentes seguiu o IPC (Classificação Internacional de Patentes). Como retorno, trezentas e trinta e duas (n= 332) famílias de patentes de janeiro de 1999 a 20 de dezembro de 2019 foram recuperadas (dados suplementares). Posteriormente efetuamos a remoção dos registros duplicados e falsos positivos que não estavam relacionados ao escopo da pesquisa, o que nos forneceu um portfólio composto por duzentas e noventa e oito (n= 298) famílias de patentes, que prosseguiram para o processo de análise. Os documentos selecionados incluíam famílias de patentes concedidas, pedidos de patentes, patentes vivas (76,5%) e mortas (23,5%). Em nossa análise consideramos ambas as famílias de patentes, pois patentes mortas são reconhecidas como uma importante fonte de dados para novas tecnologias.

2.3.17 Análises e métricas

Para análise das patentes em biologia sintética relacionadas a etanol celulósico utilizamos diferentes métodos analíticos e visuais disponíveis no Orbit Intelligence. As patentes foram analisadas por meio da ferramenta *analyze* que permite verificar sua distribuição temporal, tendências tecnológicas, principais países e detentores responsáveis.

Usamos as variáveis e medidas de patente mais comumente aplicadas na literatura empírica da inovação para analisar os pedidos de depósitos em biologia sintética relacionado a etanol celulósico. Primeiramente analisamos a distribuição de depósitos das famílias de patentes em biologia sintética relacionados a etanol celulósico para verificarmos o perfil de depósitos dessa tecnologia. Os valores correspondem às quantidades totais de famílias de patentes para o período de 1999 a 2019. Para essa variável foi acrescentada a análise de tendência usando o *sigma plot* como ferramenta estatística. Na sequência, identificamos os principais conceitos para as famílias de patentes recuperadas. As patentes foram analisadas usando a análise semânticas do Orbit Intelligence. Nessa análise, o software agrupou as famílias de patentes de acordo com sua proximidade semântica, auxiliando na identificação dos possíveis agrupamentos tecnológicos.

Para elucidar os principais domínios tecnológicos e aplicações das famílias de patentes analisamos os códigos predominantemente utilizados para classificar as patentes, seguindo a lógica da Classificação Internacional de Patentes (WIPO, 2019). Cada subdivisão possui um símbolo que consiste em algarismos arábicos e letras do alfabeto latino (WIPO, 2019). Além disso, como o código IPC pode ser muito detalhado para permitir o exame das atividades gerais de patente, classificações mais agregadas podem ser úteis

A distribuição geográfica e institucional dessas tecnologias foi identificada. A distribuição geográfica de pedidos de patentes foi rastreada com o tempo da primeira publicação, em vez do ano da concessão. Analisou-se países prioritários e distribuição de patentes vivas, também chamado de mercado alvo dessas tecnologias de acordo com a distribuição global e evolução do destino dos pedidos de patente nos últimos 20 anos. Patentes prioritárias estão relacionada ao primeiro pedido de patente daquela família e também o país que possui prioridade pela tecnologia. Já a distribuição de patentes vivas fornece informações relevantes sobre as estratégias de patentes dos atores do setor

estudado, pois os registros nacionais são um bom indicador dos mercados que precisam ser protegidos. A análise dos principais censitários de patentes é importante analisar a distribuição dos solicitantes de patentes ativas em um campo de pesquisa. Os requerentes foram analisados pelo seu número de patentes vivas, tamanho médio dessas famílias, índice de generalidade e originalidade. O tamanho e a média de patentes referem-se às patentes ativas e sua amplitude, respectivamente.

O índice de generalidade de uma patente mede até que ponto os avanços técnicos de acompanhamento estão espalhados por diferentes campos tecnológicos. Simplificando, é a largura do impacto de uma patente. Pode ser entendido como a variedade de campos das citações futuras de uma referida patente. Essas futuras citações podem ser empregadas para avaliar as gerações posteriores de uma invenção que se beneficiaram de uma determinada patente por meio da medição do intervalo de campos de tecnologia e, conseqüentemente, de indústrias que citam essa patente (Bresnahan and Trajtenberg, 1995; Hall et al. 2001; OECD, 2015). A generalidade das patentes pode ser medida pelo índice baseado em citações sugerido por Trajtenberg et al (1997). A generalidade de uma patente pode ser medida da seguinte maneira (1):

$$generality\ of\ patent\ i = 1 - \sum_{t=1}^T \left(\frac{NCITED_{it}}{NCITED_t} \right)^2 \quad (1)$$

Onde: $NCITED_i$ denota o total de citações recebidas da patente i ; $NCITED_{it}$ denota a patente i é citações recebidas pelas patentes no campo tecnológico t ; e T é o número de campos tecnológicos.

O índice de originalidade de uma patente mede até que ponto a patente se baseia em amplas raízes tecnológicas, porque é mais provável que a patente sintetize conhecimento em uma ampla variedade de disciplinas. Ou seja, a originalidade mede a amplitude dos campos tecnológicos nos quais uma patente está pautada (Trajtenberg et al., 1997; OECD, 2015). A originalidade das patentes pode ser medida pelo índice baseado em citações sugerido por Trajtenberg et al (1997). A originalidade de uma patente pode ser medida da seguinte maneira (2):

$$originality\ of\ patent\ i = 1 - \sum_{t=1}^T \left(\frac{NCITING_{it}}{NCITING_t} \right)^2 \quad (2)$$

Onde $NCITING_i$ indica o total de citações feitas pela patente i e $NCITING_{it}$ indica a patente de i citações dirigidas para as patentes no campo tecnológico t .

O cruzamento dos dados geopolíticos e empresariais permite averiguar os principais detentores dessa tecnologia e mercados alvos. Por fim analisamos os gastos econômicos pertinentes das tecnologias, tendo como variáveis os países e seus requerentes.

5.3. Resultados

2.3.18 Distribuição temporal de depósitos de patentes

A Figura 1 apresenta a distribuição de depósitos de famílias de patentes em biologia sintética relacionados a etanol celulósico. Os valores correspondem às quantidades totais de famílias de patentes. O conjunto completo para o período (1999–2019) é de 298 famílias de patentes. Nos primeiros 8 anos do período pesquisado (1999–2006), o número anual de patentes publicadas não foi expressivo, sendo que o primeiro depósito de patente ocorreu somente em 2001. De 2007 a 2011, o número de depósitos sobre esse tópico subsequentemente mostrou um aumento considerável, atingindo picos em 2010 e 2011. Consequente, os depósitos diminuíram em 2012, antes de se recuperar temporariamente em 2013 e 2014. Após esse ano, os depósitos diminuíram consideravelmente, como observado por meio da linha de tendência de depósitos de patentes em biologia sintética para etanol celulósico. Logo, evidenciamos um período de queda e posterior estabilização, o que podemos entender como uma transição do crescimento para a maturidade (Haupt et al., 2007).

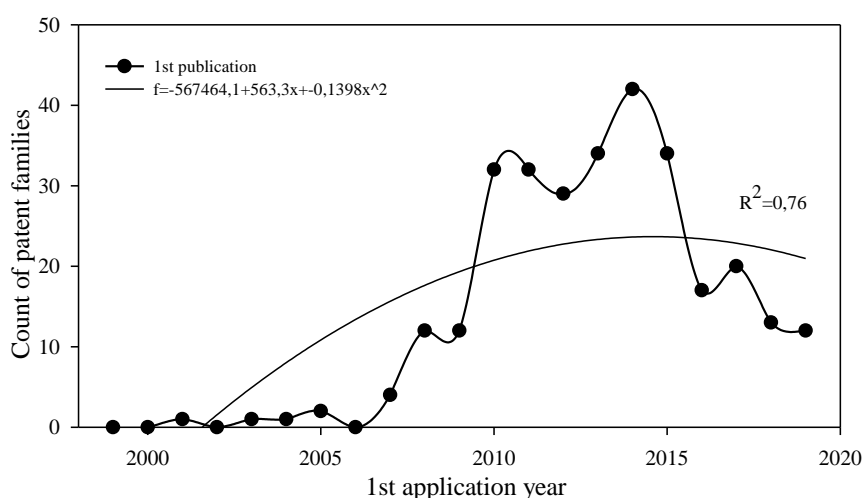


Fig. 1 Distribuição das patentes em biologia sintética relacionadas a etanol celulósico. A distribuição das 298 patentes entre 1999-2019, de acordo como o Questel-Orbit, ocorre de forma irregular, com anos de pico e outros de queda (linha preta). Essa característica não linear evidencia-se quando analisamos a linha de tendência geral para o número de depósitos. (Fonte: Questel-Orbit)

2.3.19 Principais conceitos e agrupamentos tecnológicos

A Figura 2 apresenta a distribuição dos principais conceitos para as famílias de patentes recuperadas. É possível identificarmos rapidamente nove *clusters* semânticos regularmente utilizados pelos requerentes (Figura 2A). A maioria dessas patentes está

relacionada ao uso de microrganismos (leveduras e bactérias gram-negativas), atividade enzimática, biomassa, produto de fermentação e produção de biocombustíveis. Quanto à aplicação das tecnologias, constatamos a predominância de matérias primas oriundas de biomassa, como resíduos agrícolas (palha de milho, trigo, arroz, bagaço da cana-de-açúcar e switchgrass) e seus principais açúcares fermentáveis (xilose, hemicelulose e arabinose) para produção de etanol. Nos primeiros anos, o termo “xilose” apareceu com destaque frente as demais (Figura 2B), seguido de “corn strover” e “lignocellulosic biomass”. Na sequência, esses termos foram acompanhados das palavras “ethyl alcohol”, tendo em vista que nossa análise buscou por patentes com esse foco.

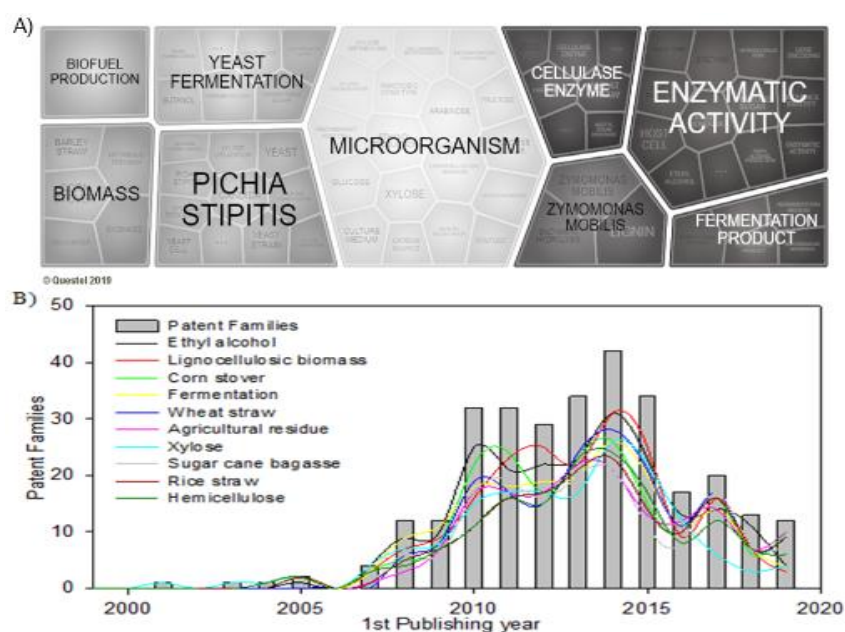


Figura 2 Conceitos predominantes nas famílias de patentes recuperadas. 2A fornece uma visualização geral do conteúdo desse portfólio formado a partir das 298 famílias de patentes em biologia sintética para etanol celulósico. 2B apresenta a distribuição desses conceitos em relação ao portfólio completo nos vinte anos averiguados.

(Fonte: Questel-Orbit)

Portanto, ao identificarmos os conceitos comumente empregados na área de biologia sintética concernentes a etanol celulósico, podemos propor insights para o desenvolvimento ou a identificação de tecnologias protegidas em um campo tecnológico emergente com vistas à sua aplicação industrial.

2.3.20 Principais domínios tecnológicos e aplicações

Para elucidar os principais focos tecnológicos e aplicações das famílias de patentes analisamos os códigos predominantemente utilizados para classificar as patentes (Tabela 1), seguindo a lógica da Classificação Internacional de Patentes (IPC)(WIPO, 2019). Aproximadamente 40% das famílias de patentes em biologia sintética relacionadas a

etanol celulósico pertencem às subclasses C12P Que contemplam invenções concernentes a processos de fermentação ou processos que utilizem enzimas para sintetizar uma composição ou composto químico desejado, ou ainda para separar isômeros ópticos de uma mistura racêmica. Dessas, 37% são do grupo C12P-007, relativo à preparação de compostos orgânicos. Na sequência, destacamos a classe C12N (30% das famílias de patentes), pertinente a micro-organismos ou enzimas, ou suas composições; propagação, conservação, ou manutenção de micro-organismos; engenharia genética ou de mutações e meios de cultura. O grupo C12N-001 - processos de propagação, manutenção ou conservação de micro-organismos ou suas composições, ou processos de preparação, isolamento de composições contendo um microrganismo e meios de cultura para tal responde por 20% das patentes nessa subclasse.

Tabela 1 Principais códigos IPC para famílias de patentes em biologia sintética para etanol celulósico

Códigos IPC	Descrição do código	Nº famílias
C12P-007/06	Preparation of oxygen-containing organic compounds [2006.01] • containing a hydroxy group [2006.01] •• acyclic [2006.01] ••• Ethanol, i.e. non-beverage [2006.01] •••• produced as by-product or from waste or cellulosic material substrate [2006.01]	29
C12P-007/10	••••• substrate containing cellulosic material [2006.01]	20
C12N-001/21	• Bacteria; Culture media therefor [2006.01] •• modified by introduction of foreign genetic material [2006.01]	13
C12P-007/16	•• Butanols [2006.01]	13
C12N-001/20	• Bacteria; Culture media therefor [2006.01] • Recombinant DNA-technology [2006.01] •• Introduction of foreign genetic material using vectors; Vectors; Use of hosts therefor; Regulation of expression [2006.01]	10
C12N-015/81	•• Vectors or expression systems specially adapted for eukaryotic hosts [2006.01] •••• for fungi [2006.01] ••••• for yeasts [2006.01]	10
C12P-007/18	•• polyhydric [2006.01]	9
C12P-007/14	•••• Multiple stages of fermentation; Multiple types of microorganisms or reuse for microorganisms [2006.01] • Fungi (culture of mushrooms A01G 18/00; as new plants A01H 15/00); Culture media therefor [2006.01]	9
C12N-001/19	•• Yeasts; Culture media therefor [2006.01] ••• modified by introduction of foreign genetic material [2006.01]	8
C12N-001/22	• Processes using, or culture media containing, cellulose or hydrolysates thereof [2006.01]	7

(Fonte: Questel-Orbit; WIPO, 2019)

Quando analisamos separadamente cada um dos dez códigos predominantes propostos pela classificação IPC (Tabela 1), verificamos a sobressalência do código *C12P-007/06*, que contribui com vinte e nove (29) famílias de patentes principais. Este código está relacionado à preparação de compostos orgânicos contendo oxigênio como etanol

combustível, cujas reivindicações preponderantes incluem leveduras capazes de fermentar xilose na presença de glicose (WO2009093630A1; US10301653B2), desenvolvimento de biomassa pré-tratada (WO2009137804A1; WO2015142399A1), utilização de leveduras (WO2012067510A1) e bactérias (WO2012067510A1) na presença de glicerol. Verificamos também invenções relacionadas a métodos para engenharia de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (WO2012067510A1), bioprocessamento usando *Clostrídio* recombinante (WO2012067510A1), métodos para produção de etanol e hidrogênio utilizando microorganismos (WO2009124321A1), métodos de propagação de microrganismos para fermentação de hidrolisado (WO2017112475A1), desenvolvimento de processos de fermentação por meio de enzimas transketolase/tiaminapirifosfato (WO2010014817A2) e hidrólise de material celulósico aumentada com uma composição de enzima (WO2010080408A2), entre outras tecnologias.

Por conseguinte, o código C12P-007/10 aborda, especificamente, resíduos ou material celulósico ou substrato contendo material celulósico para produção de etanol e responde por vinte (20) famílias de patentes principais. Essas invenções estão relacionadas ao desenvolvimento de microrganismos fermentadores de xilose e arabinose em etanol (WO2013071112A1), co-fermentação de biomassa lignocelulósica pré-tratada (WO2014160402A1; WO2014160402A1; WO2008124162A2; WO2008124162A2), métodos de oxidação úmida de biomassa (WO2017049394A1), uso de engenharia genética em microrganismos (WO2011150318A1) e enzimas (WO2011150318A1).

O desenvolvimento de bactérias e meios de cultura modificados pela introdução de material genético exógeno é classificado pelos códigos C12N-001/20 e C12N-001/21, que, conjuntamente, representam vinte e três (23) famílias de patentes principais. As invenções estão relacionadas ao desenvolvimento e adaptação de cepas de *Zymomonas mobilis* (BR112013014912A2; BR112013014912A2), *C. thermocellum*, (WO2014182054A1; WO2014182054A1; WO2011137401A2), *E. coli* (WO2011137401A2; WO2014078472A1), e bactérias termofílicas anaeróbicas (BRPI0712490A2; WO2010031793A2; WO2010031793A2; WO2010031793A2) para a produção de etanol. Além disso, verificamos a existência de tecnologias para a remoção ou a inativação de inibidores microbianos em hidrolisados de biomassa (WO2013019822A1; WO2013019822A1) e para a conversão de xilose (BR112014015565A2; BR112014015566A2) e arabinose (BR112014015566A2) em etanol.

A preparação de compostos orgânicos contendo oxigênio para produção de butanóis (C12P-007/16) apresenta dez (10) famílias de patentes. As tecnologias pertinentes a esse código estão relacionadas a células hospedeiras microbianas recombinantes de *S. cerevisiae*, capazes de converter material hemicelulósico em álcoois do tipo butanóis (WO2010059616A2), separação de sólidos não dissolvidos após a liquefação (WO2010059616A2), co-produção de biocombustíveis (WO2010059616A2), microorganismos que utilizam hidrolisados de proteínas e carboidratos de biomassa (WO2014047421A1), engenharia genética em bactérias (WO2014047421A1) e leveduras (WO2015103001A1).

O uso de tecnologias de DNA recombinante para a introdução de material endógeno por meio de vetores e regulamento de expressão em leveduras e fungos categorizados pelo código C12N-015/81 apresentam dez (10) famílias de patentes principais. Essas patentes visam o desenvolvimento de células de leveduras com atividade da xilose isomerase (WO2014098939A1), meio de cultura e biorreatores (WO2011123715A1), polipeptídeo transportador de L-arabinose (I) de *Pichia stiptis* (WO2011123715A1), controle de transcrição genética (WO2011123715A1), produção de etanol livre de glicerol usando levedura recombinante (WO2019063542A1; WO2019063543A1), células microbianas capazes de transportar xilo-oligossacarídeos (WO2019063543A1) e células de levedura com uma atividade enzimática reduzida em relação à síntese de glicerol dependente de NADH (WO2019063543A1; WO2019063543A1).

A preparação de compostos orgânicos contendo pelo menos dois grupos de hidroxilas (C12P-007/18) apresenta nove famílias de patentes principais. Nesse código, as invenções estão voltadas ao desenvolvimento de vias metabólicas de pentose não nativa em células de levedura (BR112013009157A2), genes de leveduras que codificam enzimas na via da pentose (WO2019149789A1), microrganismo termofílico ou mesofílico geneticamente modificado (WO2019149789A1), cepas de *S. cerevisiae* com produtividade reduzida de glicerol (WO2019149789A1) e propagação de microrganismos de fermentação (WO2017112471A1).

Novas formas de fermentação por meio de múltiplos estágios, diferentes tipos de microrganismos e/ou reutilização de microrganismos representados pelo código C12P-007/14 apresentam nove (9) famílias de patentes principais. As tecnologias estão relacionadas à produção de xaropes enriquecidos com açúcar C5 e C6 (WO2017112471A1), produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (WO2010075213A2) e produção de xilitol a partir de biomassa com componente de

pentose enriquecido (WO2014045297A2). Métodos de degradação de pectina (WO2010033823A2; WO2010033823A2), material celulósico pré-tratado (WO2010033823A2), desenvolvimento de biocatalisadores (WO2015089428A1) e propagação de microorganismos (WO2018097844A1) para a produção de etanol também são verificados nesse código.

A modificação de leveduras pela introdução de material genético exógeno representado por C12N-001/19 apresenta oito (8) famílias de patentes principais. As invenções estão relacionadas ao uso de engenharia metabólica para eliminação da via de glicerol (WO2010033823A2), utilização conjunta de xilose e glicose (WO2010033823A2) e fermentação rápida de xilose (WO2010033823A2; WO2010033823A2) em leveduras. Métodos de expressão aprimorada de uma enzima do sistema glicolítico (WO2010033823A2), transporte de glicerol (WO2015028583A2) e de conversão alfa-ceto-isovalerado a isobutiraldeído (WO2015028583A2) também integram esse código.

O décimo código com sete (7) famílias de patentes está relacionado a processos que utilizam meios de cultura contendo celulose ou hidrolisados (C12N-001/22). As invenções concernem ao crescimento contínuo da xilose utilizando *Zymomonas* (WO2015028583A2), degradação de oligossacarídeos por células hospedeiras recombinantes (WO2007005646A9) e bioprocessamento de lignocelulose empregando *Clostrídium* recombinante (WO2010063766A1). Métodos para redução de glicerol em processos fermentativos de biomassa (WO2010063766A1), aumento da tolerância à toxicidade do acetato em células hospedeiras microbianas recombinantes (WO2019058260A1) e controle da contaminação durante a fermentação (WO2019058260A1) também fazem parte desse código.

Os conhecimentos desses focos tecnológicos e de suas aplicações permitem aos pesquisadores identificarem campos potenciais para o desenvolvimento de novas vias de produção de etanol celulósico utilizando a biologia sintética como desenvolvedora tecnológica.

2.3.21 Distribuição geográfica dos depósitos de patentes

Consequente, analisamos a distribuição geográfica das famílias de patentes em biologia sintética relacionadas a etanol celulósico, de acordo com o país prioritário (Figura 3) e proteção por países (Figura 4). Acerca do primeiro elemento analítico, verificamos apenas 14 países prioritários detentores dessa tecnologia. O domínio quase que absoluto dessa

tecnologia é dos USA (Figura 3A), de modo que aproximadamente 67% do portfólio recuperado está em nome de requerentes americanos. As principais aplicações tecnológicas patenteadas desse país estão voltadas a produção de etanol a partir de subprodutos ou resíduos de biomassa (C12P-007/10; C12P-007/06), bem como modificação de bactérias (C12N-001/21) e fungos (C12N-001/19) através da introdução de material genético endógeno. Ou seja, aplicações puras para a solução dos principais gargalos vivenciados atualmente na conversão de biomassa em etanol (Gupta and Verma, 2015; Sindhu et al., 2016). Distante está a Organização Europeia de Patentes, seguida pelo Japão e China, que respondem por 13%, 6% e 3% das famílias de patentes, respectivamente. As demais famílias de patentes, que somam 11%, estão distribuídas entre outros 10 países.

A Figura 4B fornece uma visão dinâmica das tendências de depósitos de patentes para países prioritários, considerando os dados de registro mais antigo para o período de 1999 a 2019. A evolução de depósitos mostra que os Estados Unidos obtiveram uma liderança precoce, com posterior declínio nos últimos anos, o que igualmente ocorreu com a o restante dos países prioritários, com exceção da Organização Europeia de Patentes, haja vista seu viés de crescimento para as patentes prioritárias a partir de 2018 (Figura 2B).

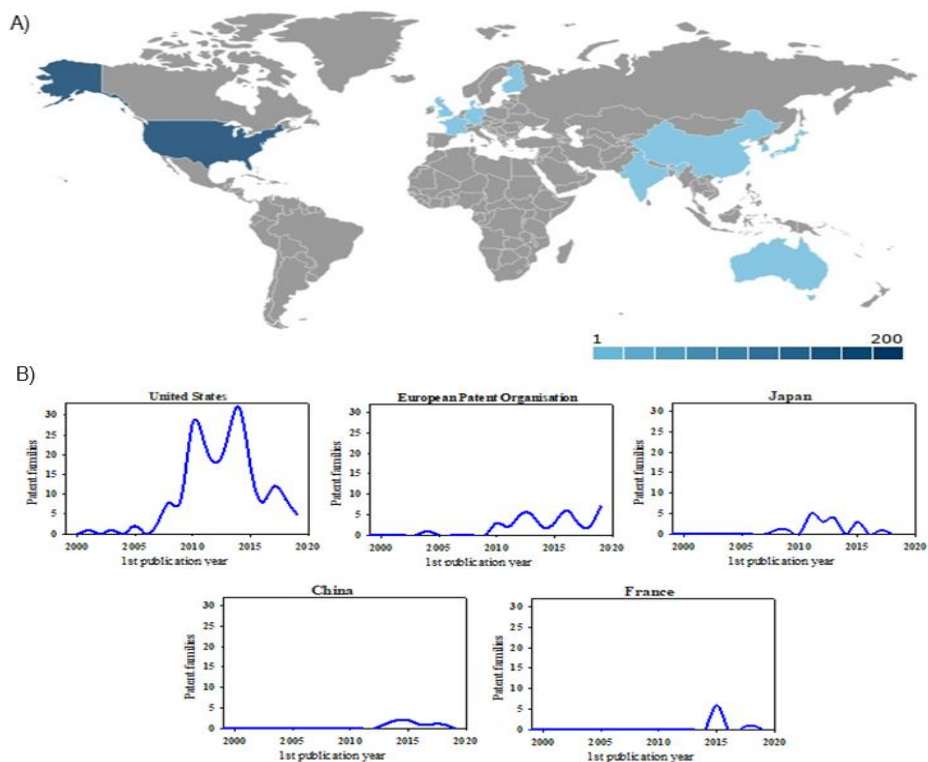


Figura 3 Número de pedidos prioritários de patentes nos vários escritórios. 2A) distribuição global e; B) Evolução do destino dos pedidos de patente prioritários nos últimos 20 anos (1999-2019). (Fonte: Questel-Orbit)

A distribuição global de famílias de patentes vivas protegidas nos vários escritórios pode ser verificada na Figura 4. Os dados corroboram na identificação de mercados-alvo e demonstram as estratégias de patenteamento dos países requerentes. Considerando a Fig. 4a, observamos, como esperado, que a demanda está concentrada nos Estados Unidos, com 49% das famílias de patentes, seguido pela Organização Europeia de Patentes (37% das famílias), Índia (33% das famílias), Brasil (30% das famílias) e China (29% das famílias de patentes). O crescimento relevante em depósito de patentes prioritárias pelos norte-americanos impacta nos depósitos provenientes nos demais países alvos dessas tecnologias de produção de bioenergia (Figura 3B).

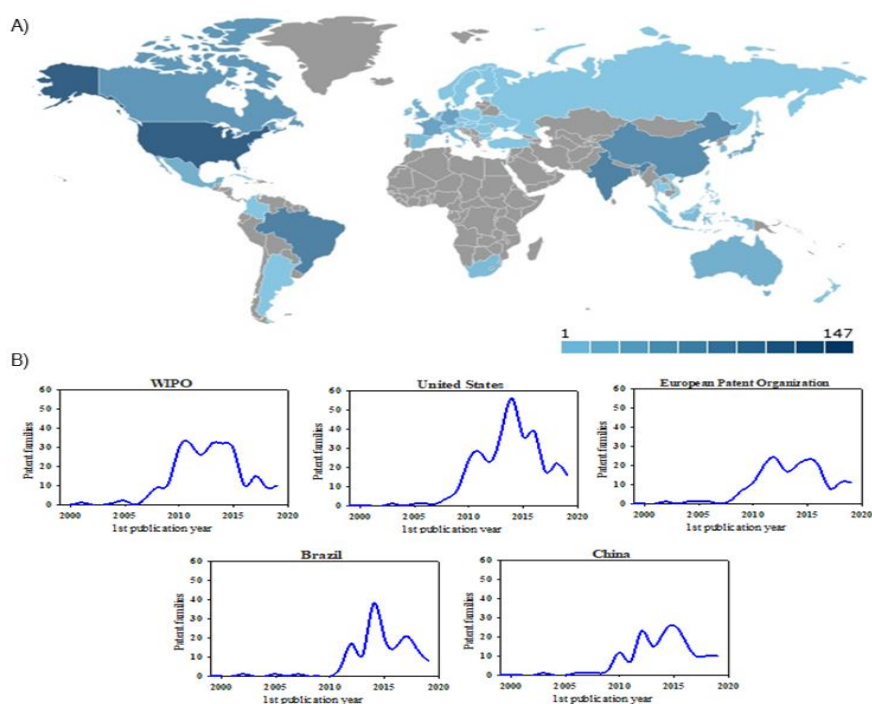


Figura 4 Número de patentes vivas protegidas nos vários escritórios. 2 A) distribuição global e; B) Evolução do destino dos pedidos de patente nos últimos 20 anos (1999-2019). (Fonte: Questel-Orbit)

Por meio desses dados podemos obter informações sobre as estratégias de patentes dos requerentes do setor estudado, haja vista que as preferências de arquivamento em determinados países indicam o potencial dos mercados a partir da visão de necessidade de proteção comercial das novas tecnologias industriais.

2.3.22 Principais censitários

Os principais censitários em patentes de biologia sintética relacionadas a etanol celulósico abrangem tanto empresas privadas quanto instituições de ensino. Os requerentes foram analisados pelo seu número de patentes vivas, tamanho médio dessas

famílias, índice de generalidade e originalidade (Tabela 2). O tamanho e a média de patentes referem-se às patentes ativas e sua amplitude, respectivamente. Por sua vez, o índice de generalidade é definido por Hall et al. (2001), como a variedade de campos das citações futuras de uma referida patente. Essas futuras citações podem ser empregadas para avaliar as gerações posteriores de uma invenção que se beneficiaram de uma determinada patente por meio da medição do intervalo de campos de tecnologia e, conseqüentemente, de indústrias que citam essa patente (Bresnahan and Trajtenberg, 1995;OECD, 2015). Já o índice de originalidade mede a amplitude dos campos tecnológicos nos quais uma patente está pautada (Trajtenberg et al., 1997;OECD, 2015).

Tabela 2 Famílias de patentes por cessionários com indicadores de valor

Censitários	Famílias de patentes vivas	Tamanho médio das famílias	Índice	
			Originalidade	Generalidade
Novozymes	27	5,8	0,91	0,87
Du Pont De Nemours	18	8,7	0,87	0,87
Butamax Advanced Biofuels	17	9,3	0,9	0,88
Lallemand	14	5,7	0,85	0,84
DSM	11	6,5	0,84	0,81
Danisco	10	8,6	0,9	0,88
University of Florida	6	1,7	0,84	0,87
Toray Industries	9	7,1	0,92	0,84
DSM Ip Assets	7	7,4	0,83	0,78
University of California	3	2,7	0,86	0,88

(Fonte: Questel-Orbit)

A Novozymes, maior detentora de patentes (27 famílias de patentes) é uma empresa dinamarquesa que atua no desenvolvimento e comercialização de enzimas para uso industrial. Também destacamos as empresas americanas, DuPont De Nemours (18 famílias de patentes) e Butamax Advanced Biofuels (17 famílias de patentes). Esta surge da parceria da DuPont e BP, de modo que em 2017 adquiriu as empresas Nesika Energy e LLC, instalando uma planta de produção de etanol em Scandia no Kansas-US, com o intuito de adicionar a essa unidade a produção de bioisobutanol¹. Integrando o grupo das cinco principais empresas mundiais detentoras de patentes concernentes à tecnologia analisada, destacamos a canadense Lallemand, com 14 famílias de patentes, e a holandesa DSM, que contribui com 12 famílias de patentes. Em relação ao tamanho médio de patentes, a Butamax Advanced Biofuels configura-se como aquela com o maior tamanho médio, cerca de 9,3, seguida pela DuPont De Nemours (8,7) e pela Danisco (8,6).

¹ DuPont Industrial Biosciences. <http://biosciences.dupont.com/>

A Butamax Advanced Biofuels (0,88), Danisco (0,88) e a University of California (0,88) apresentam os maiores índices de generalidade de patentes e, conseqüentemente, tendem a responder pelos pedidos dotados de maior relevância. Conseqüente, há a Novozymes (0,87) e a Du Pont De Nemours (0,87). Para o índice de originalidade, os melhores resultados foram expressos pela Toray Industries (0,92 e pela Novozymes (0,91). Ou seja, é inegável a importância das empresas citadas para as invenções e posteriores inovações no campo tecnológico analisado.

Destacamos que, com exceção da Butamax Advanced Biofuels que visa à produção e comercialização de Bio-Isobutanol, as demais empresas destinam-se a desenvolver e comercializar enzimas, leveduras e catalisadores para a produção de biocombustíveis avançados.

2.3.23 *Gastos com pedidos de patentes*

A distribuição dos custos para a obtenção e a manutenção das patentes em biologia sintética relacionadas a etanol celulósico entre o período de 2018 e 2020, por país alvo pode ser observada na Figura 5A, bem como seus respectivos Cessionários (Figura 5B). Os dados de 2020 são provenientes de estimativas dos anos anteriores. Além disso, para mensurarmos os custos da obtenção de uma patente devemos analisar o escopo geográfico, a complexidade do pedido e a duração do procedimento de concessão. Nesse processo, diferentes taxas requerem pagamento no decorrer do processo e da manutenção dessas patentes. Dentre os países e organizações alvos, a Organização Europeia de Patentes (EPO) desembolsou os maiores valores no ano de 2018 (US \$ 1,5 milhões de dólares), seguida pelos USA (U S\$ 1,4 milhões). Esses custos sofreram uma redução no ano de 2019 e na sua estimativa para 2020. No entanto, ao dividirmos os custos totais pelo número de patentes de cada país, observamos que o Brasil apresenta o maior custo unitário por patente, o que corresponde a aproximadamente U S\$ 13 mil, corroborando com as estimativas do INPI².

Quando analisamos os custos para os Cessionários (Figura 4b), a Novozymes apresenta o maior custo para obtenção e manutenção das patentes. Por sua vez, a Du Pont de Nemours responde pelo maior custo unitário por patente, aproximando-se de U S\$ 10 mil, seguida pela Butamax Advanced Biofuels, com valor estimado em U S\$ 8,1 mil no ano de 2018 e diminuindo nos anos de 2019 e 2020.

²<http://www.inpi.gov.br/arquivos/tabela-nova-patentes.pdf>

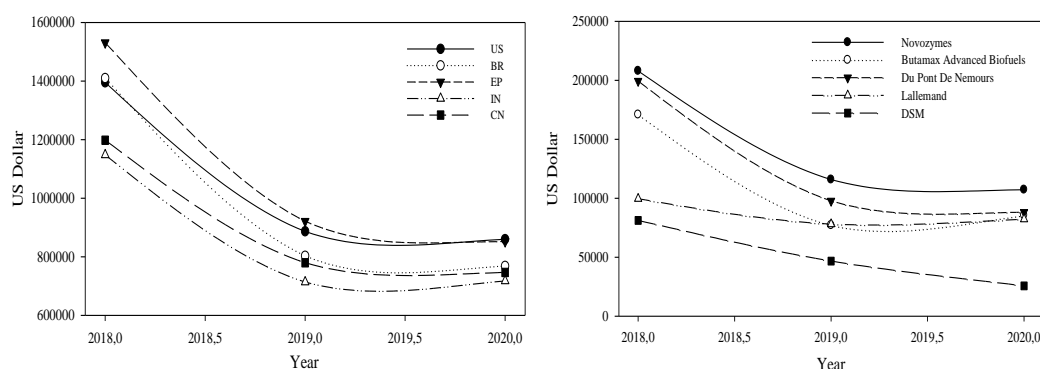


Fig. 5 Gastos em pedidos de patentes. 5A países de publicação; 5B censitários. (Fonte: Questel-Orbit)

5.4. Discussão

Nesse estudo prospectivo analisamos as aplicações das ferramentas de biologia sintética relacionadas a etanol celulósico mediante a análise de patentes, a fim de investigar a dinâmica atual desse desenvolvimento tecnológico e seu papel como Proxy para uma bioeconomia sustentável usando matérias-primas-não alimentícias. Conquanto, os resultados apresentados não estão necessariamente envolvidos somente no campo da biologia sintética, mas também, nas suas inúmeras abordagens que poderão circunscrever o desenvolvimento da produção de etanol celulósico em todo o mundo. Levando em consideração essas premissas, nossa análise fornece uma compilação das patentes relevantes, possibilitando entender, rastrear e teorizar se a biologia sintética poderá ser a resposta para o sucesso de uma bioeconomia sustentável, bem como oportunizar cenários socio mercadológicos com essa orientação.

Um dos principais resultados é a confirmação do declínio do campo analisado em termos de atividade de depósito de patentes (Figura 1). Os dados indicam que a produtividade da inovação em biologia sintética relacionada a etanol celulósico vem declinando nos últimos anos (2015-2019), denotando uma transição do crescimento para a maturidade (Haupt et al., 2007). Recentemente Toivanen and Novotny (2017) apresentaram uma análise sobre o surgimento de raças de patentes em biocombustíveis lignocelulósicos até 2015, onde é verificado que o campo tecnológico mostrava características de crescimento. Apesar de não apresentarem um foco analítico completamente idêntico, de forma nenhuma anula a complementaridade dos estudos realizados, de modo que os nossos resultados caracterizam um avanço nesse campo.

Considerando as tendências de desenvolvimento de patentes, podemos propor certas suposições sobre seus fatores subjacentes. Assim, a queda no número de famílias de patentes pode ser explicada por uma estabilização dos orçamentos de P&D, o que leva a

um fluxo de pedidos de patente menor, aliado ao elevado custo da tecnologia para conversão de biomassa em etanol (Chovau et al., 2013; Gupta and Verma, 2015; Lynd et al., 2017). A parcela significativa desse custo é proveniente das enzimas (Dehghani Madvar et al., 2019) e do pré-tratamento da biomassa (Sindhu et al., 2016) para posterior fermentação. Para (Silveira et al., 2015), uma redução adicional no custo do pré-tratamento é essencial para maximizar os rendimentos da produção de etanol celulósico e, conseqüentemente, viabilizar a produção. Somando-se aos fatores tecnológico-produtivos, as condições econômicas e políticas recentes que provocam queda nos preços do petróleo, tendem a desmotivar a realização de novos investimentos na produção de biocombustíveis avançados em países desenvolvidos, como Estados Unidos e Japão, por exemplo (Albers et al., 2016).

Outro aspecto refere-se às oportunidades tecnológicas que este estudo extrai, servindo como Proxy para mapear o desenvolvimento tecnológico para a produção de produtos derivados da bioeconômica. Conforme evidenciamos nos resultados, o desenvolvimento de inovações nesse campo é multidisciplinar, oportunizando soluções para aplicações industriais, que, em sua maioria, empregam *S. cerevisiae*, *E. coli* e *Z. mobilis* (Akinoshio et al., 2014). No entanto, esses microorganismos potencialmente utilizáveis nesses processos fermentativos não são naturalmente adaptáveis as condições industriais extremas (Radecka et al., 2015), ou não toleram altas concentrações de compostos inibidores liberados durante a fermentação de biomassa (Hasunuma et al., 2011). Assim, para tentar superar esses obstáculos, diferentes abordagens de biologia sintética e engenharia metabólica são empregadas no desenvolvimento de microrganismos para torna-los fábricas vivas robustas as atividades industriais necessárias para fermentação de biomassa em etanol (Jetti et al., 2019; Adiego-Pérez et al., 2019; Mitsui et al., 2019; Shen et al., 2019; Banerjee et al., 2019; Ren et al., 2020). Essas perspectivas acerca da biologia sintética podem permitir dobrar e sondar o genoma em escalas de comprimento e de tempo diferentes, possibilitando entender o posicionamento e as funções do gene (Landhuis, 2020). Não obstante, verificamos a prospecção de novas leveduras e bactérias não convencionais como a *Pichia stipitis* (Nandal et al., 2020) para fermentação de biomassa lignocelulósica.

Mesmo que a levedura *S. cerevisiae* domine a fermentação do etanol a partir de matérias-primas à base de açúcar, não configura-se como degradadora natural de arabinose (Buschke et al., 2013) e xilose (Banerjee et al., 2010; Moysés et al., 2016), sendo necessário o uso de engenharia de vias para tornar esse açúcar acessível por meio

do processo de fermentação (Lee and Jin, 2017; Bracher et al., 2018). Recentemente Ye et al. (2019) integraram uma via heteróloga da arabinose fúngica em *S. cerevisiae* com a exclusão do gene da fosfatase PHO13, aumentando a taxa de consumo de arabinose e a produtividade específica de etanol em condições aeróbicas. Em Cunha et al., (2019), duas vias (XR/XDH ou XI) de assimilação da xilose por *S. cerevisiae* foram comparadas na produção de etanol em diferentes condições de fermentação, demonstrando resultados satisfatórios para a viabilização desse combustível a partir de hidrolisados hemicelulósicos não desintoxicados. Conquanto, Mitsui et al., (2019) desenvolveram um novo método de embaralhamento de genoma usando CRISPR-Cas para melhorar a tolerância ao estresse em leveduras *S. cerevisiae*. Quanto a *E. coli*, suas principais desvantagens referem-se a faixa estreita de crescimento de pH neutro (6.0-8.0), além de não ser o etanol um produto central nessa bactéria. Todavia, Sun et al., (2018b) desenvolveram com sucesso um bioprocesso eficiente através de uma cepa de *E. coli* para produção de etanol e recuperação de xilose a partir do hidrolisado de espiga de milho. Cepas dessa bactéria com utilização regulada de glicose mostraram metabolismo eficiente de açúcares mistos em hidrolisados lignocelulósicos e, portanto, maior produtividade da produção de etanol (Sun et al., 2018a). Na mesma perspectiva, a engenharia metabólica vem sendo estudada para proporcionar a utilização simultânea de glicose e xilose nessa cultura bacteriana (Kim et al., 2019)

Um alto rendimento e produtividade em etanol celulósico são alcançados também usando cepas de *Z. mobilis* devido à sua fisiologia única (Yang et al., 2016; Wang et al., 2018), sendo possível empregar outros substratos, mitigando os desafios socioambientais para a expansão da produção de etanol (Gonçalves et al., 2015; Duan et al., 2019). Diferentes abordagens vêm sendo testadas em *Z. mobilis* para melhorar a fermentação de substratos de biomassa lignocelulósica em etanol (Yang et al.; 2018; Zhang et al., 2019).

A identificação de métodos de pré-tratamento e degradação de biomassa é uma das etapas mais importantes no processo de fermentação microbiana de biomassa lignocelulósica por aumentar a digestibilidade do máximo de açúcares disponíveis (Jönsson and Martín, 2016). A biomassa é constituída de uma celulose altamente cristalina e uma bainha de hemicelulose envolvida em uma rede de lignina, conhecida com recalcitrância (Himmel et al., 2007; Somerville et al., 2010). Essa torna-se um obstáculo predominante no uso da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol, pois determina o restante do processo de fermentação e a eficiência geral desse processo produtivo (Moreno et al., 2017). O pré-tratamento biológico (Salvachúa et al., 2011;

Saritha et al., 2012; Saha et al., 2016; Saha et al., 2017; Méndez-Hernández et al., 2019), vem sendo empregado para a desconstrução dessa biomassa em virtude de sua aplicação ampla, menor consumo energético, sem geração de substâncias tóxicas e maior rendimento (Sharma et al., 2019).

A co-fermentação de diferentes açúcares de biomassa lignocelulósica e seus resíduos possibilitam que os processos de produção de etanol tornem-se viáveis economicamente (Ko et al., 2016). O potencial de uma co-cultura utilizando cepas de *E. coli* e uma levedura para fermentar rapidamente todos os açúcares presentes na biomassa pré-tratada com taxas elevadas de etanol é apresentado por (Wang et al., 2019). Na mesma perspectiva (Amoah et al., 2019) desenvolveram uma levedura com assimilação de xilose capaz de co-fermentar xilose e glicose em líquido iônico para produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica. Avanços também são verificados na tentativa de superar obstáculos e perturbações presentes na degradação de lignina (Fang et al., 2018; Sadalage et al., 2019) e celulose (Carver et al., 2019) usando consórcio microbiano e engenharia genética por meio de Cas9 guiada por RNA em *S. cerevisiae* (EauClaire et al., 2016), *Candida glycerinogenes* (Zhu et al., 2019), *Rhodospiridium toruloides* (Schultz et al., 2019), cujos resultados denotam aumentos significativos da tolerância ao estresse de microrganismos em processos fermentativos severos.

Na sequência, verificamos a predominância de nações desenvolvidas como principais detentoras de patentes em biologia sintética para a produção de etanol celulósico (Figura 3), com destaque para os USA, que se caracteriza como o maior produtor de etanol e possui 70% das patentes recuperadas. O auge de depósitos desse país ocorreu entre 2008 e 2014, decrescendo posteriormente. Para Van Doren et al., (2013), o desenvolvimento de patentes de biologia sintética pelos norte-americanos é uma consequência do desenvolvimento biotecnológico há vários anos no país, expresso pela alocação de investimentos substanciais em pesquisa envolvendo ferramentas de biologia sintética por meio da criação de centros e programas de pesquisa (Si and Zhao, 2016). Desse modo, no referido período, foram investidos aproximadamente US\$ 820 milhões em pesquisas em biologia sintética³, destinadas ao desenvolvimento de biocombustíveis avançados e bioprodutos advindos de sistemas microbianos (Si and Zhao, 2016).

Em média, 46% das famílias de patentes depositadas prioritariamente pelos USA foram depositadas por seus censitários fora de suas fronteiras territoriais, em países como

³<http://www.synbioproject.org/>

Índia (107 famílias) e Brasil (104 famílias). Para Streltsova and Linton (2018), ambos os países vêm apresentando um rápido crescimento na atividade de patentes relacionadas a biotecnologia. Recentemente, em 2018 a Índia aprovou a Política Nacional de Biocombustíveis para suceder à política existente desde 2009, elucidando a intenção do país pretende em obter uma mistura de 10% de etanol na gasolina até 2020 e 20% até 2030(Singh, 2019; Sinha et al., 2019) . Essas políticas são provenientes da necessidade de produção interna, pois a Índia apresenta um déficit de 22,3 bilhões de litros de ethanol⁴. Esse combustível produzido a partir de resíduos agrícolas oferece perspectivas significativas devido à ampla acessibilidade, abundância e preço comparativamente barato, provando ser uma fonte substituta para uma faixa estreita de energia não renovável e de culturas alimentares (Prasad et al., 2020; Bharj et al., 2020).

O Brasil, apesar de ser o segundo maior produtor de etanol, não apresenta patentes prioritárias registradas em biologia sintética para a produção de etanol celulósico, tornando-se apenas um mercado alvo para os demais países detentores dessas tecnologias, como os USA, por exemplo. Contudo, o país apresenta o maior custo unitário por patentes protegidas, o que corresponde a aproximadamente US\$ 13 mil. De certa forma, tal resultado pode ser um dos motivos pela inexistência de pedidos de patentes por censitários nacionais. Para Cicogna et al. (2017), o Brasil é um exemplo de uma indústria infantil que está lentamente atingindo a sua maturidade. Na mesma perspectiva (Kang et al., 2015), apontam para a necessidade de políticas governamentais que facilitem o desenvolvimento de tecnologias renováveis promissoras, além de oferecer incentivos para sua comercialização.

Na tentativa de modificar essa situação, em 2017 uma nova política nacional para biocombustíveis foi criada pelo governo brasileiro, o RenovaBio, com o objetivo de promover a produção de etanol e biodiesel a partir de várias fontes disponíveis no país (MME, 2019). O Brasil, no futuro, poderá tornar-se o maior produtor de produtos de origem biológica, quando superadas as barreiras econômicas, logísticas, regulatórias e políticas (Portugal-Pereira et al., 2015). Sua extensão territorial e suas características edafoclimáticas regionais diversas possibilitam ao país uma produção intensiva de biomassa para biotecnologia industrial a um custo relativamente menor em comparação com outros locais que prospectam células microbianas sintéticas. Ademais, trata-se de um dos principais produtores mundiais de alimento, cuja industrialização gera uma

⁴National Informatics Centre- NIC- <http://petroleum.nic.in/>

quantidade significativa de resíduos com potencial para transformação em bioenergia, fornecendo um novo caminho para a produção de biocombustíveis não concorrentes em alimentos, mas sim resíduos de biomassa e agrícola (Portugal-Pereira et al., 2015; Maitan-Alfnas et al., 2015; da Silva et al., 2019) .

Nosso estudo também aponta que o conhecimento aplicado para a criação de novas tecnologias em biologia sintética relacionada a etanol celulósico provém, principalmente, de empresas que atuam no desenvolvimento de enzimas e microorganismos para transformação de biomassa em etanol e também na produção e comercialização desse biocombustível. As empresas buscam, por meio de patentes, a exploração comercial dessas novas tecnologias, pois maximizam sua vantagem competitiva (Leu et al., 2012). As indústrias operam em ambientes tecnológicos complexos e seu conhecimento tecnológico é extremamente relevante para obter vantagem competitiva e essas não podem confiar apenas em suas unidades internas de pesquisa e desenvolvimento (P&D), mas também precisam procurar obter fontes externas de tecnologia (Grindley and Teece, 2003; Lin et al., 2015; Caviggioli et al., 2017), e para que suas tecnologia permaneça impossibilitada para uso de terceiros, as mesmas buscam por proteção patentearia.

Com base em nosso método de análise as famílias de patentes em biologia sintética relacionada a etanol celulósico foram identificadas, mescladas e analisadas para obter insights gerais sobre as tendências, tópicos e partes interessadas nesse campo. Este trabalho pode ser uma base robusta para pesquisas futuras, a fim de planejar, monitorar ou justificar decisões para políticas de P&D nesse campo tecnológico.

5.5. Conclusões e caminhos para pesquisas futuras

O objetivo deste artigo foi analisar a aplicação das ferramentas de biologia sintética relacionada a etanol celulósico mediante a análise de patentes nos últimos 20 anos, fornecendo uma visão geral dos esforços de P&D, panorama geopolítico, análise de mercado, co-classificação de dados proposta pelo IPC e análise de conteúdo das patentes.

Apesar da utilização de uma única fonte de dados, os resultados são robustos e, em geral, às especificações de cada variável mostram que: (a) a busca de patentes no campo analisado vem declinando nos últimos anos; (b) as invenções depositadas focam no design e na construção de novas plataformas celulares para produção de etanol celulósico utilizando ferramentas metabólicas e sintéticas e no desenvolvimento de métodos de co-fermentação e pré-tratamento de biomassa lignocelulósica; (c) os USA são os maiores detentores dessas tecnologias, tendo países como Índia e Brasil como principais mercados

alvos; (d) os principais detentores são empresas que atuam na comercialização de tecnologia (enzimas, bactérias e leveduras) para a produção de biocombustíveis e produtos químicos.

Pensando em bioeconomia sustentável para a geração energética, o uso de ferramentas de biologia sintética, apesar da diminuição na busca de depósitos de patentes, poderá prover novas fábricas vivas cada vez mais adaptadas à tecnologia industrial. Ao utilizarem os resultados provenientes desse estudo, engenheiros sintéticos ou bioenergéticos poderão optar por microrganismos robustos, capazes de realizar processos de fermentação otimizados ou métodos de processamento de biomassa, aliviando um gargalo que limita os rendimentos da pesquisa em bioenergia. À medida que esses esforços amadurecem, podem ser ampliados na produção de biocombustíveis a base de substratos bioeconômicos-não alimentares.

No geral, o método de pesquisa forneceu uma nova abordagem para a avaliação do desempenho de P&D em biologia sintética relacionado a etanol celulósico e para a bioeconomia. Os resultados podem ajudar pesquisadores a integrar-se rapidamente ao campo analisado, pois poderão facilmente compreender as fronteiras tecnológicas. O estudo também fornece referências para futuras pesquisas e políticas energéticas que poderão servir como Proxy para um mundo focado em uma bioeconomia mais sustentável usando matérias-primas-não alimentícias. Além disso, este artigo ilustra a importância das repercussões do conhecimento em P&D e denota maior atenção em trabalhos futuros, sendo necessária a maximização da compreensão acerca dos sistemas celulares para garantir produtividades elevada com diferentes fontes de carbono de baixo custo para co-produção de etanol e produtos químicos ou integração de diferentes gerações de etanol para melhorar os resultados econômicos de cada processo.

5.6. Referências

- Adiego-Pérez, B., Randazzo, P., Daran, J.M., Verwaal, R., Roubos, J.A., Daran-Lapujade, P., Van Der Oost, J., 2019. Multiplex genome editing of microorganisms using CRISPR-Cas. *FEMS Microbiology Letters*, 366(8), fnz086. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz086>
- Akinosho, H., Yee, K., Close, D., Ragauskas, A., 2014. The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. *Frontiers in Chemistry*, 2, 66. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00066>
- Albers, S.C., Berklund, A.M., Graff, G.D., 2016. The rise and fall of innovation in biofuels. *Nature Biotechnology*, 34(8), 814. <https://doi.org/10.1038/nbt.3644>

- Amoah, J., Ogura, K., Schmetz, Q., Kondo, A., Ogino, C., 2019. Co-fermentation of xylose and glucose from ionic liquid pretreated sugar cane bagasse for bioethanol production using engineered xylose assimilating yeast. *Biomass and Bioenergy*, 128, 105283. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105283>
- Arbige, M. V., Shetty, J.K., Chotani, G.K., 2019. Industrial Enzymology: The Next Chapter. *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.09.010>
- Arnold, M., Tainter, J.A., Strumsky, D., 2019. Productivity of innovation in biofuel technologies. *Energy Policy*, 124, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2018.09.005>
- Aro, E.M., 2016. From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio*, 45(1), 24-31. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0730-0>
- Banerjee, S., Mishra, G., Roy, A., 2019. Metabolic Engineering of Bacteria for Renewable Bioethanol Production from Cellulosic Biomass. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s12257-019-0134-2>
- Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T., Pandey, R.A., 2010. Commercializing lignocellulosic bioethanol: Technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4(1), 77-93. <https://doi.org/10.1002/bbb.188>
- Benner, S.A., Sismour, A.M., 2005. Synthetic biology. *Nature Reviews Genetics*, 6(7), 533-543. <https://doi.org/10.1038/nrg1637>
- Bervoets, I., Van Brempt, M., Van Nerom, K., Van Hove, B., Maertens, J., De Mey, M., Charlier, D., 2018. A sigma factor toolbox for orthogonal gene expression in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 46, 2133–2144. <https://doi.org/10.1093/nar/gky010>
- Bharj, R.S., Singh, G.N., Kumar, R., 2020. Agricultural Waste Derived 2nd Generation Ethanol Blended Diesel Fuel in India: A Perspective. In *Alternative Fuels and Their Utilization Strategies in Internal Combustion Engines* (pp. 9-24). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0418-1_2
- BR112013009157A2 - polipeptídeos com atividade de permease - Google Patents [WWW Document], n.d. URL <https://patents.google.com/patent/BR112013009157A2/pt?q=BR112013009157> (accessed 1.17.20).
- BR112013014912A2 - micro-organismo recombinante, zymomonas recombinante, polipeptídeo, métodos para a produção de uma zymomonas recombinantes produtora de etanol e para a produção de etanol - Google Patents [WWW Document], n.d. URL <https://patents.google.com/patent/BR112013014912A2/pt?q=BR112013014912> (accessed 1.17.20).
- BR112014015565A2 - método de produzir uma célula, célula e método para produzir etanol - Google Patents [WWW Document], n.d. URL

- <https://patents.google.com/patent/BR112014015565A2/pt?q=BR112014015565> (accessed 1.17.20).
- BR112014015566A2 - célula hospedeira bacteriana recombinante e processo para produção de etanol - Google Patents [WWW Document], n.d. URL <https://patents.google.com/patent/BR112014015566A2/pt?q=BR112014015566> (accessed 1.17.20).
- Bracher, J.M., Verhoeven, M.D., Wisselink, H.W., Crimi, B., Nijland, J.G., Driessen, A.J.M., Klaassen, P., Van Maris, A.J.A., Daran, J.M.G., Pronk, J.T., 2018. The *Penicillium chrysogenum* transporter PcAraT enables high-affinity, glucose-insensitive l-arabinose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), 63.. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1047-6>
- Bresnahan, T.F., Trajtenberg, M., 1995. General purpose technologies “Engines of growth”? *Journal of Econometrics*, *65*(1), 83-108. [https://doi.org/10.1016/0304-4076\(94\)01598-T](https://doi.org/10.1016/0304-4076(94)01598-T)
- BRPI0712490A2 - cepa bg1 de *trehmoanaerobacter mathranii* - Google Patents [WWW Document], n.d. URL <https://patents.google.com/patent/BRPI0712490A2/pt?q=BRPI0712490> (accessed 1.17.20).
- Buschke, N., Schäfer, R., Becker, J., Wittmann, C., 2013. Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications - Optimization of substrate spectrum and process robustness by rational and evolutive strategies. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.047>
- Carbonell, P., Gök, A., Shapira, P., Faulon, J.L., 2016. Mapping the patent landscape of synthetic biology for fine chemical production pathways. *Microbial Biotechnology*, *135*, 544-554. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12401>
- Carlson, K.M., Curran, L.M., Ratnasari, D., Pittman, A.M., Soares-Filho, B.S., Asner, G.P., Trigg, S.N., Gaveau, D.A., Lawrence, D., Rodrigues, H.O., 2012. Committed carbon emissions, deforestation, and community land conversion from oil palm plantation expansion in West Kalimantan, Indonesia. *Proceedings of the National Academy of Science*, *109*(19), 7559-7564. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200452109>
- Carver, S.M., Lepistö, R., Tuovinen, O.H., 2019. Effect of the type and concentration of cellulose and temperature on metabolite formation by a fermentative thermophilic consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, *44*(32), 17248-17259. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.02.177>
- Cassidy, E.S., West, P.C., Gerber, J.S., Foley, J.A., 2013. Redefining agricultural yields: From tonnes to people nourished per hectare. *Environmental research*, *8*(3). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/8/3/034015>
- Caviggioli, F., De Marco, A., Scellato, G., Ughetto, E., 2017. Corporate strategies for technology acquisition: evidence from patent transactions. *Management Decision*. <https://doi.org/10.1108/MD-04-2016-0220>

- Chen, Y., Wang, Y., Chen, T.-H., Yao, M.-D., Xiao, W.-H., Li, B.-Z., Yuan, Y.-J., 2018. Identification and manipulation of a novel locus to improve cell tolerance to short-chain alcohols in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 45, 589–598. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1996-y>
- Chisti, Y., 2013. Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology* 167, 201–214. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.020>
- Chovau, S., Degrauwe, D., Van Der Bruggen, B., 2013. Critical analysis of techno-economic estimates for the production cost of lignocellulosic bio-ethanol. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26, 307-321. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.064>
- Chownk, M., Thakur, K., Purohit, A., Vashisht, A., Kumar, S., 2019. Applications and Future Perspectives of Synthetic Biology Systems, in: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, p. 393-412. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64085-7.00016-2>
- Cicogna, M.P.V., Khanna, M., Zilberman, D., 2017. Prospects for Biofuel Production in Brazil: Role of Market and Policy Uncertainties. In *Handbook of Bioenergy Economics and Policy: Volume II* (pp. 89-117). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6906-7_5
- Clarke, L.J., Kitney, R.I., 2016. Synthetic biology in the UK – An outline of plans and progress. *Synth Syst Biotechnol* 1: 243–257. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.09.003>
- Cunha, J.T., Soares, P.O., Romani, A., Thevelein, J.M., Domingues, L., 2019. Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xyloitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1360-8>
- da Silva, J.E., de Araújo Melo, D.M., de Freitas Melo, M.A., de Aguiar, E.M., Pimenta, A.S., de Medeiros, E.P., Calixto, G.Q., Braga, R.M., 2019. Energetic characterization and evaluation of briquettes produced from naturally colored cotton waste. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(14), 14259-14265. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04777-z>
- Dahmen, N., Lewandowski, I., Zibek, S., Weidtmann, A., 2019. Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives. *GCB Bioenergy*, 11(1), 107-117. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12586>
- de Lorenzo, V., Schmidt, M., 2018. Biological standards for the Knowledge-Based BioEconomy: What is at stake. *New Biotechnology*, 40, 170-180. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.001>
- Dehghani Madvar, M., Aslani, A., Ahmadi, M.H., Karbalaie Ghomi, N.S., 2019. Current status and future forecasting of biofuels technology development. *International Journal of Energy Research*, 43(3), 1142-1116. <https://doi.org/10.1002/er.4344>

- Devarapalli, P., Deshpande, N., Hirwani, R.R., 2016. Xylose utilization in ethanol production: a patent landscape. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *10*(5), 534-541. <https://doi.org/10.1002/bbb.1664>
- Du, C., Li, Y., Zhao, X., Pei, X., Yuan, W., Bai, F., Jiang, Y., 2019. The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(6), 2845-2855. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09625-1>
- Duan, G., Wu, B., Qin, H., Wang, W., Tan, Q., Dai, Y., Qin, Y., Tan, F., Hu, G., He, M., 2019. Replacing water and nutrients for ethanol production by ARTP derived biogas slurry tolerant *Zymomonas mobilis* strain. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1463-2>
- Dupont-Inglis, J., Borg, A., 2018. Destination bioeconomy – The path towards a smarter, more sustainable future. *New Biotechnology*, *40*, 140-143. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.010>
- EauClaire, S.F., Zhang, J., Rivera, C.G., Huang, L.L., 2016. Combinatorial metabolic pathway assembly in the yeast genome with RNA-guided Cas9. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *43*(7), 1001-1015. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1776-0>
- Enriquez, J., 1998. GENOMICS: Genomics and the World's Economy. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.281.5379.925>
- Fang, X., Li, Q., Lin, Y., Lin, X., Dai, Y., Guo, Z., Pan, D., 2018. Screening of a microbial consortium for selective degradation of lignin from tree trimmings. *Bioresource Technology*, *254*, 247-255. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.058>
- Fitzherbert, E.B., Struebig, M.J., Morel, A., Danielsen, F., Brühl, C.A., Donald, P.F., Phalan, B., 2008. How will oil palm expansion affect biodiversity? *Trends in Ecology and Evolution*, *23*(10), 538-545. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.012>
- French, K.E., 2019. Harnessing synthetic biology for sustainable development. *Nature Sustainability*, *2*(4), 250-252. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0270-x>
- Gonçalves, F.A., dos Santos, E.S., de Macedo, G.R., 2015. Alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* in the presence of inhibitory compounds and seawater. *Journal of Basic Microbiology*, *55*(6), 695-708. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400589>
- Grindley, P.C., Teece, D.J., 2003. When is virtual virtuous? Organizing for innovation. *World Scientific Book Chapters*, p. 189-203, 2003. https://doi.org/10.1142/9789812796929_0007
- Guerriero, G., Hausman, J.F., Strauss, J., Ertan, H., Siddiqui, K.S., 2016. Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Engineering in Life Sciences*, *16*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400196>

- Gupta, A., Verma, J.P., 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *41*, 550-567. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>
- Gustafsson, R., Kuusi, O., Meyer, M., 2015. Examining open-endedness of expectations in emerging technological fields: The case of cellulosic ethanol. *Technological Forecasting and Social Change*, *91*, 179-193. <https://doi.org/10.1016/j.techfore.2014.02.008>
- Hall, B.H., Jaffe, A.B., Trajtenberg, M., 2001. 13 The NBER Patent-Citations Data File: Lessons, Insights, and Methodological Tools. *Patents, citations, and innovations: A window on the knowledge economy*, 403. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-148>
- Hasunuma, T., Sanda, T., Yamada, R., Yoshimura, K., Ishii, J., Kondo, A., 2011. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, *10*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-2>
- Haupt, R., Kloyer, M., Lange, M., 2007. Patent indicators for the technology life cycle development. *Research Policy*, *36*(3), 387-398. <https://doi.org/10.1016/j.respol.2006.12.004>
- Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, *316*(5827), 982-982. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>
- Hollinshead, W., He, L., Tang, Y.J., 2014. Biofuel production: An odyssey from metabolic engineering to fermentation scale-up. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 344. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00344>
- Ingle, A.P., Ingle, P., Gupta, I., Rai, M., 2019. Socioeconomic impacts of biofuel production from lignocellulosic biomass, in: *Sustainable Bioenergy*, Elsevier, 2019. p. 347-366. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817654-2.00013-7>
- Jetti, K.D., Gns, R.R., Garlapati, D., Nammi, S.K., 2019. Improved ethanol productivity and ethanol tolerance through genome shuffling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *International Microbiology*, *22*(2), 247-254. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-00044-2>
- Jullesson, D., David, F., Pflieger, B., Nielsen, J., 2015. Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. *Biotechnology Advances*, *33*(7), 1395-1402. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.011>
- Kang, J.S., Kholod, T., Downing, S., 2015. Analysis of Russia's biofuel knowledge base: A comparison with Germany and China. *Energy Policy*, *85*, 182-193. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2015.06.002>

- Karvonen, M., Klemola, K., 2019. Identifying bioethanol technology generations from the patent data. *World Patent Information*, 57, 25-34.
<https://doi.org/10.1016/j.wpi.2019.03.004>
- Kessler, J., Sperling, D., 2016. Tracking U.S. biofuel innovation through patents. *Energy Policy*, 98, 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2016.08.021>
- Khalil, A.S., Collins, J.J., 2010. Synthetic biology: applications come of age. *Nature Reviews Genetics*, 11(5), 367-379. <https://doi.org/10.1038/nrg2775>
- Khetkorn, W., Rastogi, R.P., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., Madamwar, D., Pandey, A., Larroche, C., 2017. Microalgal hydrogen production – A review. *Bioresource Technology*, 243, 1194-1206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.085>
- Kim, J., Tremaine, M., Grass, J.A., Purdy, H.M., Landick, R., Kiley, P.J., Reed, J.L., 2019. Systems Metabolic Engineering of *Escherichia coli* Improves Coconversion of Lignocellulose-Derived Sugars. *Biotechnology Journal*, 14(9), 1800441..
<https://doi.org/10.1002/biot.201800441>
- Ko, J.K., Um, Y., Woo, H.M., Kim, K.H., Lee, S.M., 2016. Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway. *Bioresource Technology*, 209, 290-296.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.124>
- Landhuis, E., 2020. Technologies to watch in 2020. *Nature* 577, 585–587.
<https://doi.org/10.1038/d41586-020-00114-4>
- Lara-Flores, A.A., Araújo, R.G., Rodríguez-Jasso, R.M., Aguedo, M., Aguilar, C.N., Trajano, H.L., Ruiz, H.A., 2018. Bioeconomy and Biorefinery: Valorization of Hemicellulose from Lignocellulosic Biomass and Potential Use of Avocado Residues as a Promising Resource of Bioproducts. In *Waste to Wealth* (pp. 141-170). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7431-8_8
- Lee, W.H., Jin, Y.S., 2017. Evaluation of ethanol production activity by engineered *saccharomyces cerevisiae* fermenting cellobiose through the phosphorolytic pathway in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 1649-1656..
<https://doi.org/10.4014/jmb.1705.05039>
- Leu, H.J., Wu, C.C., Lin, C.Y., 2012. Technology exploration and forecasting of biofuels and biohydrogen energy from patent analysis, in: *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15719-15725.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.143>
- Liao, J.C., Mi, L., Pontrelli, S., Luo, S., 2016. Fuelling the future: Microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nature Reviews Microbiology*, 14(5), 288. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.32>
- Lin, B.W., Chen, W.C., Chu, P.Y., 2015. Mergers and acquisitions strategies for industry leaders, challengers, and niche players: Interaction effects of technology positioning and industrial environment. *IEEE Transactions on Engineering Management*, 62(1), 80-88. <https://doi.org/10.1109/TEM.2014.2380822>

- Lynd, L.R., Liang, X., Bidy, M.J., Allee, A., Cai, H., Foust, T., Himmel, M.E., Laser, M.S., Wang, M., Wyman, C.E., 2017. Cellulosic ethanol: status and innovation. *Current Opinion in Biotechnology*, *45*, 202-211. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.03.008>
- Maitan-Alfenas, G.P., Visser, E.M., Guimarães, V. ria M., 2015. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, *1*, 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.10.001>
- Méndez-Hernández, J.E., Loera, O., Méndez-Hernández, E.M., Herrera, E., Arce-Cervantes, O., Soto-Cruz, N.Ó., 2019. Fungal Pretreatment of Corn Stover by *Fomes* sp. EUM1: Simultaneous Production of Readily Hydrolysable Biomass and Useful Biocatalysts. *Waste and Biomass Valorization*, *10*(9), 2637-2650. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0290-1>
- Mitsui, R., Yamada, R., Ogino, H., 2019. Improved Stress Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by CRISPR-Cas-Mediated Genome Evolution. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *10*(9), 2637-2650. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03040-y>
- MME, 2019. RenovaBio [WWW Document]. Petróleo, gás natural e biocombustíveis.
- Moreno, A.D., Alvira, P., Ibarra, D., Tomás-Pejó, E., 2017. Production of Ethanol from Lignocellulosic Biomass. In *Production of Platform Chemicals from Sustainable Resources* (pp. 375-410). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4172-3_12
- Moysés, D.N., Reis, V.C.B., de Almeida, J.R.M., de Moraes, L.M.P., Torres, F.A.G., 2016. Xylose fermentation by *saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(3), 207. <https://doi.org/10.3390/ijms17030207>
- Nandal, P., Sharma, S., Arora, A., 2020. Bioprospecting non-conventional yeasts for ethanol production from rice straw hydrolysate and their inhibitor tolerance. *Renewable Energy*, *147*, 1694-1703. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.09.067>
- Narnoliya, L.K., Jadaun, J.S., Singh, S.P., 2018. Management of Agro-industrial Wastes with the Aid of Synthetic Biology. In *Biosynthetic Technology and Environmental Challenges* (pp. 11-28). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9_2
- Nielsen, J., Keasling, J.D., 2011. Synergies between synthetic biology and metabolic engineering. *Nature Biotechnology*, *29*(8), 693-695. <https://doi.org/10.1038/nbt.1937>
- OECD, 2015. Measuring the Technological and Economic Value of Patents, in: *Enquires Into Intellectual Property's Economic Impact*.
- Pandey, S., 2017. Prospects of metagenomic cellulases for converting lignocellulosic biomass into bio-ethanol. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *11*(2), 1079-1091. <https://doi.org/10.22207/JPAM.11.2.51>

- Paul, S., Dutta, A., 2018. Challenges and opportunities of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Resources, Conservation and Recycling*, *130*, 164-174. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.12.005>
- Philp, J., 2015. Balancing the bioeconomy: Supporting biofuels and bio-based materials in public policy. *Energy and Environmental Science*, *8*(11), 3063-3068. <https://doi.org/10.1039/c5ee01864a>
- Pimentel, D., Patzek, T.W., 2007. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower, in: *Food, Energy, and Society*, Third Edition. <https://doi.org/10.1201/9781420046687>
- Portugal-Pereira, J., Soria, R., Rathmann, R., Schaeffer, R., Szklo, A., 2015. Agricultural and agro-industrial residues-to-energy: Techno-economic and environmental assessment in Brazil. *Biomass and Bioenergy*, *81*, 521-533. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.08.010>
- Prasad, S., Kumar, S., Sheetal, K.R., Venkatramanan, V., 2020. Global Climate Change and Biofuels Policy: Indian Perspectives. In *Global Climate Change and Environmental Policy* (pp. 207-226). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9570-3_6
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R.Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M.R., Thevelein, J.M., 2015. Looking beyond *Saccharomyces*: The potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, *15*(6). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>
- Rahman, Z., Rashid, N., Nawab, J., Ilyas, M., Sung, B.H., Kim, S.C., 2016. *Escherichia coli* as a fatty acid and biodiesel factory: current challenges and future directions. *Environmental Science and Pollution Research* *23*, 12007–12018. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6367-0>
- Ren, J., Lee, J., Na, D., 2020. Recent advances in genetic engineering tools based on synthetic biology. *Journal of Microbiology*, *58*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s12275-020-9334-x>
- Ribeiro, B., Shapira, P., 2020. Private and public values of innovation: A patent analysis of synthetic biology. *Research Policy*, *49*(1), 103875. <https://doi.org/10.1016/j.respol.2019.103875>
- Rudorff, B.F.T., de Aguiar, D.A., da Silva, W.F., Sugawara, L.M., Adami, M., Moreira, M.A., 2010. Studies on the rapid expansion of sugarcane for ethanol production in São Paulo state (Brazil) using Landsat data. *Remote Sensing*, *2*(4), 1057-1076. <https://doi.org/10.3390/rs2041057>
- Rulli, M.C., Bellomi, D., Cazzoli, A., De Carolis, G., D'Odorico, P., 2016. The water-land-food nexus of first-generation biofuels. *Scientific Reports*, *6*, 22521. <https://doi.org/10.1038/srep22521>
- Sadalage, P.S., Dar, M.A., Chavan, A.R., Pawar, K.D., 2019. Formulation of synthetic bacterial consortia and their evaluation by principal component analysis for

- lignocellulose rich biomass degradation. *Renewable Energy*, *31*(4), 517-535.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.10.053>
- Saha, B.C., Kennedy, G.J., Qureshi, N., Cotta, M.A., 2017. Biological pretreatment of corn stover with *Phlebia brevispora* NRRL-13108 for enhanced enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production. *Biotechnology Progress*, *24*(5), 1075-1084. <https://doi.org/10.1002/btpr.2420>
- Saha, B.C., Qureshi, N., Kennedy, G.J., Cotta, M.A., 2016. Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *109*, 29-35.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.020>
- Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, Á.T., Martínez, M.J., 2011. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technology*, *102*(16), 7500-7506.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.027>
- Saritha, M., Arora, A., Lata, 2012. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. *Indian Journal of Microbiology*, *52*(2), 122-130. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0199-x>
- Schultz, J.C., Cao, M., Zhao, H., 2019. Development of a CRISPR/Cas9 system for high efficiency multiplexed gene deletion in *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology and Bioengineering*, *116*(8), 2103-2109.
<https://doi.org/10.1002/bit.27001>
- Sharma, H.K., Xu, C., Qin, W., 2019. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. *Waste and Biomass Valorization*, *10*(2), 235-251. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0059-y>
- Shen, W., Zhang, J., Geng, B., Qiu, M., Hu, M., Yang, Q., Bao, W., Xiao, Y., Zheng, Y., Peng, W., Zhang, G., Ma, L., Yang, S., 2019. Establishment and application of a CRISPR-Cas12a assisted genome-editing system in *Zymomonas mobilis*. *Microbial Cell Factories*, *18*(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1219-5>
- Si, T., Zhao, H., 2016. A brief overview of synthetic biology research programs and roadmap studies in the United States. *Synthetic and Systems Biotechnology*, *1*(4), 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.08.003>
- Silveira, M.H.L., Morais, A.R.C., Da Costa Lopes, A.M., Oleksyszyn, D.N., Bogel-Łukasik, R., Andraus, J., Pereira Ramos, L., 2015. Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries. *ChemSusChem*, *8*(20), 3366-3390. <https://doi.org/10.1002/cssc.201500282>
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. *Bioresource Technology*, *199*, 76-82.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Singh, K., 2019. India's bioenergy policy. *Energy, Ecology and Environment*, *4*(5), 253-260. <https://doi.org/10.1007/s40974-019-00125-6>

- Sinha, S.K., Subramanian, K.A., Singh, H.M., Tyagi, V. V., Mishra, A., 2019. Progressive Trends in Bio-Fuel Policies in India: Targets and Implementation Strategy, *10*(1), 155-166. *Biofuels*. <https://doi.org/10.1080/17597269.2018.1522483>
- Somerville, C., Youngs, H., Taylor, C., Davis, S.C., Long, S.P., 2010. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science*, *329*(5993), 790-792. <https://doi.org/10.1126/science.1189268>
- Speda, J., Jonsson, B.H., Carlsson, U., Karlsson, M., 2017. Metaproteomics-guided selection of targeted enzymes for bioprospecting of mixed microbial communities. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0815-z>
- Srivastava, A., Villalobos, M.B., Singh, R.K., 2020. Engineering Photosynthetic Microbes for Sustainable Bioenergy Production, in: *Contemporary Environmental Issues and Challenges in Era of Climate Change* (pp. 183-198). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9595-7_10
- Streltsova, E., Linton, J.D., 2018. Biotechnology Patenting in the BRICS Countries: Strategies and Dynamics. *Trends in Biotechnology*, *36*(7), 642-645. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.11.008>
- Sun, J., Tian, K., Wang, J., Dong, Z., Liu, X., Permaul, K., Singh, S., Prior, B.A., Wang, Z., 2018a. Improved ethanol productivity from lignocellulosic hydrolysates by *Escherichia coli* with regulated glucose utilization. *Microbial Cell Factories*, *17*(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0915-x>
- Sun, J., Wang, J., Tian, K., Dong, Z., Liu, X., Permaul, K., Singh, S., Prior, B.A., Wang, Z., 2018b. A novel strategy for production of ethanol and recovery of xylose from simulated corn cob hydrolysate. *Biotechnology Letters*, *40*(5), 781-788. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2537-0>
- Toivanen, H., Novotny, M., 2017. The emergence of patent races in lignocellulosic biofuels, 2002–2015. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *77*, 318-326. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.089>
- Tomei, J., Helliwell, R., 2016. Food versus fuel? Going beyond biofuels. *Land Use Policy*, *56*, 320-326. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2015.11.015>
- Trajtenberg, M., Henderson, R., Jaffe, A., 1997. University versus corporate patents: A window on the basicness of invention. *Economics of Innovation and New Technology*, *5*(1), 19-50. <https://doi.org/10.1080/10438599700000006>
- Tye, Y.Y., Lee, K.T., Wan Abdullah, W.N., Leh, C.P., 2016. The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *60*, 155-172. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.01.072>
- US10301653B2 - Microorganisms that co-consume glucose with non-glucose carbohydrates and methods of use - Google Patents [WWW Document], n.d. URL <https://patents.google.com/patent/US10301653B2/en?q=US10301653> (accessed 1.17.20).

- van Doren, D., Koenigstein, S., Reiss, T., 2013. The development of synthetic biology: A patent analysis. *Systems and Synthetic Biology*, 7(4), 209-220.
<https://doi.org/10.1007/s11693-013-9121-7>
- Wang, L., York, S.W., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., 2019. Simultaneous fermentation of biomass-derived sugars to ethanol by a co-culture of an engineered *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 273, 269-276. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.016>
- Wang, X., He, Q., Yang, Y., Wang, J., Haning, K., Hu, Y., Wu, B., He, M., Zhang, Y., Bao, J., Contreras, L.M., Yang, S., 2018. Advances and prospects in metabolic engineering of *Zymomonas mobilis*. *Metabolic Engineering*, 50, 57-73..
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.001>
- WIPO, 2019. Guide to the International Patent Classification. World Intellectual Property Organization.
- WO2007005646A9 - Cellules hotes recombinantes et milieu pour production d'ethanol - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2007005646A9/fr?oq=WO2007%2F005646>
 (accessed 1.17.20).
- WO2008124162A2 - Substrate-selective co-fermentation process - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2008124162A2/en?oq=WO2008%2F124162>
 (accessed 1.17.20).
- WO2009093630A1 - Hexose-pentose cofermenting yeast having excellent xylose fermentability and method of highly efficiently producing ethanol using the same - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2009093630A1/en?oq=WO2009093630>
 (accessed 1.17.20).
- WO2009124321A1 - Methods and compositions for improving the production of fuels in microorganisms - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2009124321A1/en?oq=WO2009%2F124321>
 (accessed 1.17.20).
- WO2009137804A1 - Yeast cells and methods for increasing ethanol production - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2009137804A1/en?oq=WO2009%2F137804>
 (accessed 1.17.20).
- WO2010014817A2 - Producing fermentation products - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2010014817A2/en?oq=WO2010%2F014817>
 (accessed 1.17.20).
- WO2010031793A2 - Thermophilic fermentative bacterium producing butanol and/or hydrogen from glycerol - Google Patents [WWW Document], n.d. URL

- <https://patents.google.com/patent/WO2010031793A2/en?q=WO2010%2F031793>
(accessed 1.17.20).
- WO2010033823A2 - Methods and compositions for degrading pectin - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2010033823A2/en?q=WO2010%2F033823>
(accessed 1.17.20).
- WO2010059616A2 - Biocatalysts and methods for conversion of hemicellulose hydrosates to biobased products - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2010059616A2/en?q=WO2010%2F059616>
(accessed 1.17.20).
- WO2010063766A1 - Bioprocessing ligno-cellulose into ethanol with recombinant clostridium - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2010063766A1/en?q=WO2010%2F063766>
(accessed 1.17.20).
- WO2010075213A2 - Production of ethanol from lignocellulosic biomass - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2010075213A2/en?q=WO2010%2F075213>
(accessed 1.17.20).
- WO2010080408A2 - Methods for increasing enzymatic hydrolysis of cellulosic material in the presence of a peroxidase - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2010080408A2/en?q=WO2010%2F080408>
(accessed 1.17.20).
- WO2011123715A1 - Metabolically engineered yeasts for the production of ethanol and other products from xylose and cellobiose - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2011123715A1/en?q=WO2011%2F123715>
(accessed 1.17.20).
- WO2011137401A2 - Redirected bioenergetics in recombinant cellulolytic clostridium microorganisms - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2011137401A2/en?q=WO2011%2F137401>
(accessed 1.17.20).
- WO2011150318A1 - Acetate-resistant yeast strain for the production of a fermentation product - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2011150318A1/en?q=WO2011%2F150318>
(accessed 1.17.20).
- WO2012067510A1 - Yeast strains engineered to produce ethanol from glycerol - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2012067510A1/en?q=WO2012%2F067510>
(accessed 1.17.20).

- WO2013019822A1 - Removal of microbial fermentation inhibitors from cellulosic hydrolysates or other inhibitor-containing compositions - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2013019822A1/en?q=WO2013%2F019822>
(accessed 1.17.20).
- WO2013071112A1 - A genetically modified strain of *s. cerevisiae* engineered to ferment xylose and arabinose - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2013071112A1/en?q=WO2013%2F071112>
(accessed 1.17.20).
- WO2014045297A2 - A selective microbial production of xylitol from biomass based sugar stream with enriched pentose component" - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2014045297A2/en?q=WO2014%2F045297>
(accessed 1.17.20).
- WO2014047421A1 - Production of renewable hydrocarbon compositions - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2014047421A1/en?q=WO2014%2F047421>
(accessed 1.17.20).
- WO2014078472A1 - Combining genetic traits for furfural tolerance - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2014078472A1/en?q=WO2014%2F078472>
(accessed 1.17.20).
- WO2014098939A1 - Expression of xylose isomerase activity in yeast - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2014098939A1/en?q=WO2014%2F098939>
(accessed 1.17.20).
- WO2014160402A1 - Co-conversion of carbohydrates to fermentation products in a single fermentation step - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2014160402A1/en?q=WO2014%2F160402>
(accessed 1.17.20).
- WO2014182054A1 - Recombinant microorganism metabolizing 3,6-anhydride-1-galactose and a use thereof - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2014182054A1/en?q=WO2014%2F182054>
(accessed 1.17.20).
- WO2015028583A2 - Glycerol and acetic acid converting cells with improved glycerol transport - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2015028583A2/en?q=WO201528583>
(accessed 1.17.20).
- WO2015089428A1 - Enhanced efficiency ethanol production and sugar conversion processes - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2015089428A1/en?q=WO201589428>
(accessed 1.17.20).

- WO2015103001A1 - Expression of a hap transcriptional complex subunit - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2015103001A1/en?q=WO2015%2F103001>
(accessed 1.17.20).
- WO2015142399A1 - Preparation of biomass - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2015142399A1/en?q=WO2015%2F142399>
(accessed 1.17.20).
- WO2017049394A1 - Oxydation par voie humide de biomasse - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2017049394A1/fr?q=WO2017%2F049394>
(accessed 1.17.20).
- WO2017112471A1 - Methods, systems, and compositions for propagation of a fermentation microorganism - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2017112471A1/en?q=WO2017%2F112471>
(accessed 1.17.20).
- WO2017112475A1 - Methods, systems, and compositions for propagation of a fermentation microorganism - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2017112475A1/en?q=WO2017%2F112475>
(accessed 1.17.20).
- WO2018097844A1 - Methods, systems, and compositions for propagation of a fermentation microorganism - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2018097844A1/en?q=WO2018%2F097844>
(accessed 1.17.20).
- WO2019058260A1 - Acetate toxicity tolerance in recombinant microbial host cells - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2019058260A1/en?q=WO2019%2F058260>
(accessed 1.17.20).
- WO2019063542A1 - Improved glycerol free ethanol production - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2019063542A1/en?q=WO2019%2F063542>
(accessed 1.17.20).
- WO2019063543A1 - Improved glycerol free ethanol production - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2019063543A1/en?q=WO2019%2F063543>
(accessed 1.17.20).
- WO2019149789A1 - Yeast cell capable of simultaneously fermenting hexose and pentose sugars - Google Patents [WWW Document], n.d. URL
<https://patents.google.com/patent/WO2019149789A1/en?q=WO2019%2F149789>
(accessed 1.17.20).

- Wu, L., Zhu, H., Chen, H., Roco, M.C., 2019. Comparing nanotechnology landscapes in the US and China: a patent analysis perspective. *Journal of Nanoparticle Research*, 21(8), 180. <https://doi.org/10.1007/s11051-019-4608-0>
- Xue, C., Zhao, J.B., Chen, L.J., Yang, S.T., Bai, F.W., 2017. Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process engineering for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Advances* 35, 310–322. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.01.007>
- Yang, B., Wyman, C.E., 2007. Perspective: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(1), 26-40.. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Yang, S., Fei, Q., Zhang, Y., Contreras, L.M., Utturkar, S.M., Brown, S.D., Himmel, M.E., Zhang, M., 2016. *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. *Microbial Biotechnology*, 9(6), 699-717. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12408>
- Yang, Y., Hu, M., Tang, Y., Geng, B., Qiu, M., He, Q., Chen, S., Wang, X., Yang, S., 2018. Progress and perspective on lignocellulosic hydrolysate inhibitor tolerance improvement in *Zymomonas mobilis*. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0193-9>
- Ye, S., Jeong, D., Shon, J.C., Liu, K.H., Kim, K.H., Shin, M., Kim, S.R., 2019. Deletion of PHO13 improves aerobic l-arabinose fermentation in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(12), 1725-1731. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02233-y>
- Zhang, K., Lu, X., Li, Y., Jiang, X., Liu, L., Wang, H., 2019. New technologies provide more metabolic engineering strategies for bioethanol production in *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(5), 2087-2099. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09620-6>
- Zhu, M., Sun, L., Lu, X., Zong, H., Zhuge, B., 2019. Establishment of a transient CRISPR-Cas9 genome editing system in *Candida glycerinogenes* for co-production of ethanol and xylonic acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128(3), 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.03.009>
- Zilberman, D., Kim, E., Kirschner, S., Kaplan, S., Reeves, J., 2013. Technology and the future bioeconomy. *Agricultural Economics (United Kingdom)*, 44(s1), 95-102. <https://doi.org/10.1111/agec.12054>

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O consumo mundial de combustíveis fósseis continua aumentando, e consequentemente os problemas causados pelo seu uso intensivo vem se agravando. Na contramão estão às reservas de petróleo, que ano após ano, estão diminuindo, sendo necessário revermos nosso atual modelo tecnológico (petroquímico), e mudarmos gradativamente para uma nova matriz econômica baseada em produtos de base biológica. Essa modificação tecnológica representará transformações significativas e fundamentais para os sistemas globais socioeconômicos, agrícolas, energéticos e técnicos, não apenas na produção de biocombustíveis.

É de conhecimento geral que a primeira geração de biocombustíveis se utiliza de partes comestíveis de plantas, amido e açúcares, como fonte de matéria-prima, o que fomenta calorosas discussões relacionadas à segurança alimentar e uso da terra. E quando sua capacidade de produção for expandida substancialmente para atender às demandas de fornecimento sustentável de combustíveis para transporte, é quase que improvável que essa produção seja sustentável a longo prazo, especialmente em países em desenvolvimento, como China e Índia, com grande população (LIU et al., 2019a).

Assim, a procura por alternativas para a produção de biocombustíveis é um fator imprescindível para o desenvolvimento econômico, industrial e social nos dias atuais, mesmo quando esses ainda não apresentem rendimentos satisfatórios. A produção de biocombustíveis utilizando microrganismos como fábricas vivas tem atraído atenção nos últimos anos por oportunizar possíveis soluções às questões de segurança alimentar e energética no futuro próximo. Diferentemente da primeira geração de biocombustíveis, não são usadas matérias-primas de dupla aptidão (alimento e energia), mas sim recursos da biomassa, CO₂ e energia solar, amplamente disponíveis no planeta (CHISTI, 2013b). Alcançar objetivos formulados racionalmente por meio da modificação genética e sintéticas em microrganismos chaves para a produção de biomoléculas é cada vez mais necessária.

Assim, a ênfase proporcionada as abordagens e ferramentas de biologia sintética nesta tese deve-se pelo seu papel fundamental para o desenvolvimento de novas plataformas microbianas para a produção de biocombustíveis a partir de recursos biológicos sustentáveis. É impossível pensarmos em uma produção sustentável de biocombustíveis, aliada ao desenvolvimento de uma bioeconomia global sem a adoção da biologia sintética e suas abordagens.

Os dois artigos científicos anteriormente apresentados buscaram, cronologicamente, responder como as seguintes interrogativas: (i) Como está a dinâmica atual do desenvolvimento científico e tecnológico das ferramentas de biologia sintética aplicadas na produção de biocombustíveis? (ii) Os biocombustíveis microbianos já são uma realidade no contexto produtivo mundial? (iii) E qual será o papel da biologia sintética na formulação política e mercadológica para um mundo focado em uma bioeconomia mais sustentável?

Ao mapear a literatura científica usando artigos e palavras-chave burst, demonstramos a evolução científica desse campo (Capítulo 4). Os pontos críticos da pesquisa em biologia sintética relacionados à biocombustíveis identificados podem ajudar os estudiosos a entender melhor a evolução e as tendências de desenvolvimento da pesquisa nesse campo. O domínio do conhecimento verificado em nossa análise passou de análises complexas em modelos microbianos tradicionais (*E. coli* e *S. cerevisiae*), o que permitiu um rápido avanço no campo e na validação de provas fundamentais de conceito, para metodologias voltadas à engenharia genômica de baixo custo e montagem de potenciais caminhos sintéticos para uso industrial. O desenvolvimento de novas ferramentas moleculares para montagem de DNA, recombinação e edição de genomas, reduziram o tempo necessário e maximizaram a eficiência da clonagem e da engenharia em microrganismos.

O design e a construção de novas fábricas vivas através do design racional de peças e módulos sintéticos, incluindo promotores, fatores de transcrição, RNAs e novas abordagens baseadas em omics, permitem a produção de metabólitos em processos industriais. Logo, oferecem benefícios notáveis não apenas para a produção de biocombustíveis, mas também para outras aplicações necessárias à sociedade moderna, despertando a atenção de países desenvolvidos, como os Estados Unidos e a China.

Apesar dos avanços impressionantes no campo da biologia sintética nos últimos anos, nossa capacidade de explorar sistemas biológicos permanece restrita a um pequeno número de microrganismos-modelo. Os temas e tendências emergentes verificados concentram-se principalmente na pesquisa e desenvolvimento da levedura oleaginosa *Y. lipolytica*, bactérias gram-negativas, *E. coli* e *K. pneumoniae* e em microalgas da espécie *P. tricornutum* para a produção de biocombustíveis avançados, sobretudo etanol, n-butanol e precursores como ácidos graxos.

Ao mesmo tempo, o uso de biomassa lignocelulósica vem sendo enfatizado como matéria-prima para a produção de biocombustíveis usando fábricas vivas sintéticas. O

potencial inexplorado dessa matérias-primas fornece um novo caminho para a produção de biocombustíveis e de bioprodutos que não competem com a produção de alimentos.

Pensando em uma produção de baixo custo em comparação com outros países que prospectam células microbianas sintéticas, o Brasil poderá se tornar um *player* na produção de produtos de origem biológica, desde que superadas as limitações políticas e econômicas, que até então limitam o crescimento científico-tecnológico e mercadológico dessas biotecnologias. Para isso são necessárias novas políticas governamentais apropriadas para aumentar o interesse na produção de biocombustíveis microbianos.

A falta de incentivos aliada aos elevados custos e baixo rendimento de produção fazem com que esses biocombustíveis não sejam uma realidade no contexto bioenergético atual, com exceção da produção de etanol, que está engatinhando. Apesar dos problemas econômicos e técnicos que limitam o potencial da produção de etanol celulósico, algumas biorrefinarias já estão produzindo esse biocombustível e coproduzindo energia elétrica e produtos de alto valor econômico, alcançando a produção de aproximadamente 58 milhões de litros em 2018 (PADELLA; O'CONNELL; PRUSSI, 2019).

No segundo artigo analisamos as aplicações das ferramentas de biologia sintética relacionadas a etanol celulósico mediante a análise de patentes, a fim de investigar a dinâmica atual desse desenvolvimento tecnológico e seu papel como Proxy para uma bioeconomia sustentável usando matérias-primas-não alimentícias. Conquanto, os resultados apresentados não estão necessariamente envolvidos somente no campo da biologia sintética, mas também nas suas inúmeras abordagens que poderão circunscrever o desenvolvimento da produção de etanol celulósico em todo o mundo. A análise fornece uma compilação das patentes relevantes, possibilitando entender, rastrear e teorizar se a biologia sintética poderá ser a resposta para o sucesso de uma bioeconomia sustentável, bem como oportunizar cenários sócio mercadológicos com essa orientação.

Os dados recuperados indicam que a produtividade da inovação em biologia sintética relacionada a etanol celulósico vem declinando nos últimos anos (2015-2019). Essa queda no número de depósitos de famílias de patentes pode ser explicada por uma estabilização dos orçamentos de P&D, aliado ao elevado custo dessa tecnologia. Somando-se aos fatores tecnológico-produtivos, as condições econômicas e políticas recentes que provocam queda nos preços do petróleo tendem a desmotivar a realização de novos investimentos na produção de biocombustíveis avançados em países desenvolvidos, como Estados Unidos e Japão.

Outro aspecto verificado são as oportunidades tecnológicas que este estudo proporciona. O desenvolvimento de inovações nesse campo é multidisciplinar, oportunizando soluções para aplicações industriais pautadas no *design* e na construção de novas plataformas celulares para produção de etanol celulósico. As abordagens em metagenômica, engenharia genética, sistemas de comunicação ortogonal, meta proteômica e metabolômica em leveduras, bactérias e enzimas estão sendo utilizadas na tentativa de solucionar as etapas críticas do processo. Além do uso de co-fermentação e pré-tratamento de biomassa lignocelulósica para elevar os rendimentos na produção de etanol celulósico. Além do uso de co-fermentação e pré-tratamento de biomassa lignocelulósica para elevar os rendimentos na produção de etanol celulósico. Os conhecimentos e suas aplicações permitem aos pesquisadores identificarem campos potenciais para o desenvolvimento de novas vias de produção de etanol celulósico utilizando a biologia sintética como desenvolvedora tecnológica. Espera-se que essas tecnologias estejam disponíveis nos próximos anos (DEHGHANI MADVAR et al., 2019).

A predominância de nações desenvolvidas como principais detentoras de patentes em biologia sintética para a produção de etanol celulósico com destaque para os Estados Unidos é verificada. O desenvolvimento de patentes de biologia sintética é uma consequência do desenvolvimento biotecnológico há vários anos no país, expresso pela alocação de investimentos substanciais em pesquisa, centros e programas de pesquisa (SI; ZHAO, 2016), orientados para a solução dos principais gargalos vivenciados atualmente na conversão de biomassa em etanol (GUPTA; VERMA, 2015; SINDHU et al., 2016).

Os dados fornecem informações sobre as estratégias dos países prioritários requerentes do setor estudado, haja vista que as preferências de arquivamento dos Estados Unidos concentram-se em países com potencial de desenvolvimento dessas tecnologias (tais como Brasil e Índia), indicando o potencial dos mercados a partir da visão de necessidade de proteção comercial das novas tecnologias industriais. Apesar das afirmações proferidas no capítulo 4, que destacam o Brasil como possível produtor mundial de produtos de origem biológica, desde que superadas as limitações políticas e econômicas, os dados desse capítulo (5) reafirmam as licitações políticas e econômicas. Ou seja, apesar de ser o segundo maior produtor de etanol, o Brasil não apresenta patentes prioritárias registradas nesse campo tecnológico, tornando-se apenas um mercado alvo para os demais países detentores dessas tecnologias. Os elevados custos de proteção podem ser um dos motivos pela inexistência de pedidos de patentes por censitários

nacionais, uma vez que as tecnologias empregadas por empresas brasileiras na produção de etanol celulósico são de empresas estrangeiras, como a Novozimes, Du Pont De Nemours, Lallemand e DSM.

Pensando em bioeconomia sustentável para a geração energética, o uso de ferramentas de biologia sintética poderá prover novas fábricas vivas cada vez mais adaptadas à tecnologia industrial. Ao utilizarem os resultados provenientes desses estudos, engenheiros sintéticos ou bioenergéticos poderão optar por microorganismos robustos, capazes de realizar processos de fermentação otimizados ou métodos de processamento de biomassa, aliviando um gargalo que limita os rendimentos da pesquisa em bioenergia. À medida que esses esforços amadurecem, podem ser ampliados na produção de biocombustíveis empregando substratos bioeconômicos-não alimentares.

A incrível diversidade de compostos e moléculas que potencialmente produzidas por meio da biologia sintética pode revolucionar a produção de biomoléculas para uso rotineiro e comum, proporcionando o surgimento de uma nova era: a da bioeconomia, caracterizada pelo desenvolvimento de bioprodutos de alto valor econômico. Aplicações da biologia sintética na produção de biocombustíveis e biofertilizantes já provou ser uma realidade. No entanto, apesar de já ter seu início também na produção animal, deve haver uma aceleração para melhorar a sanidade a partir de novos antibióticos, vacinas e anticorpos (SINGH et al. 2019).

Com base nos dois artigos podemos inferir que as abordagens de biologia sintética reverberam o conceito de bioeconomia na busca pelo desenvolvimento de novas formas de produção e consumo de energia, aliadas ao desenvolvimento de produtos com maior valor agregado utilizando novos recursos biológicos renováveis como substratos. A biologia sintética em produtos químicos finos é uma tecnologia que se tornará econômica, previsível e sustentável nos próximos anos, ampliando o portfólio de novos produtos que anteriormente representavam investimentos altos para muitos setores, incluindo cosméticos, sabores, polímeros e produtos farmacêuticos (BREITLING; TAKANO, 2015; CARBONELL et al., 2016b). Dessa forma, a produção deve ser conduzida para biorrefinarias que possam coproduzir biocombustíveis e bioprodutos de valor agregado, tornando a produção microbiana de biocombustíveis economicamente viável (ROLZ; DE LEÓN; MENDIZÁBAL DE MONTENEGRO, 2019).

6.1. Contribuições

Do ponto de vista prático, este trabalho fornece novos indicadores a serem utilizados no contexto da formulação de políticas energéticas, bem como estruturando perspectivas e conhecimentos científicos e tecnológico sobre o uso de ferramentas de biologia sintética para a produção de biocombustíveis microbianos a partir de recursos da bioeconomia sustentável.

Contribuímos para o restabelecimento de novas diretrizes de pesquisa e elaboração de políticas para futuras pesquisas no campo analisado. A intersecção do campo da bioeconomia e da biologia sintética poderá reconstruir o capital natural e melhorar a qualidade de vida da população, equilibrando o gerenciamento de bens naturais coletivos, como ar, água e solo, com as expectativas econômicas da sociedade.

Do ponto de vista metodológico, o mesmo fornece descobertas recentes que poderão ajudar os pesquisadores de bioenergia, bioeconomia e biotecnologia a explorar informações valiosas e entender profundamente os principais países e suas instituições e pesquisadores, além de novas tendências e tópicos emergentes relevantes para o campo científico e tecnológico, criando uma comunidade acadêmica cada vez mais próspera e multidisciplinar.

6.2. Limitações

Algumas limitações inerentes associadas a este estudo estão listadas a seguir. Primeiro, este estudo realizou uma análise do mapa do conhecimento com base na literatura científica e tecnológica utilizando apenas uma base de dados para cada foco metodológico. Os dados deste estudo são derivados do banco de dados Web of Science e Orbit respectivamente. Portanto, podemos não ter sido capazes de recuperar todos os trabalhos sobre os tópicos estudados, e o viés de seleção pode estar presente. Dessa forma futuras pesquisas devem considerar as comparações entre diferentes bancos de dados para análise científica e tecnológica.

O trabalho ilustra a importância das repercussões do conhecimento em P&D e denota maior atenção em trabalhos futuros, sendo necessária a maximização da compreensão acerca dos sistemas celulares para garantir produtividades e rendimentos elevados com diferentes fontes de carbono de baixo custo. Podemos acrescentar a necessidade de novos estudos que relacionam a co-produção de etanol e produtos químicos ou integração de diferentes gerações de etanol na tentativa de melhorar os

resultados econômicos de cada processo. Além do mais, temos muito a avançar nessa discussão, pois não está claro em nossas leituras se o uso dessas fábricas de vivas sintética é realmente um processo de baixo carbono. O desenvolvimento de indicadores termodinâmicos adequados relacionados à energia, exergia e emergência deve ajudar a responder a essas perguntas-chave.

7. Referências

ACHEAMPONG, M. *et al.* In pursuit of Sustainable Development Goal (SDG) number 7: will biofuels be reliable? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 75, p. 927-937, 2017.

ADIEGO-PÉREZ, B. *et al.* Multiplex genome editing of microorganisms using CRISPR-Cas. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 366, n. 8, [art.] fnz086, [p. 1-19], 2019.

ADLER-AGNON, Z. *et al.* Novel promoters for constitutive and inducible expression of transgenes in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under varied nitrate availability. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 30, n. 5, p. 2763-2772, 2018.

AGUILAR, A.; TWARDOWSKI, T.; WOHLGEMUTH, R. Bioeconomy for sustainable development. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 14, n. 8, [art.] 1800638, [p. 1-11], 2019.

AKINOSHO, H *et al.* The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. **Frontiers in Chemistry**, Lausanne, v. 2, [art.] 66, [p. 1-18], 2014.

ALAM, M. A.; WANG, Z. (ed.). **Microalgae biotechnology for development of biofuel and wastewater treatment**. Puchong: Springer Singapore, 2019.

ALBERS, S. C.; BERKLUND, A. M.; GRAFF, G. D. The rise and fall of innovation in biofuels. **Nature Biotechnology**, New York, v. 34, n. 8, p. 814-821, 2016.

ALLEN, R. S. *et al.* Expression of 16 nitrogenase proteins within the plant mitochondrial matrix. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, [art.] 287, [p. 1-14], 2017.

ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, [art.] 48, [p. 1-16], 2012.

ALONSO-GUTIERREZ, J. *et al.* Principal component analysis of proteomics (PCAP) as a tool to direct metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 28, p. 123-133, 2015.

- ALONSO-GUTIERREZ, J. *et al.* Toward industrial production of isoprenoids in *Escherichiacoli*: lessons learned from CRISPR-Cas9 based optimization of a chromosomally integrated mevalonate pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 115, n. 4, p. 1000-1013, 2018.
- ALSTOTT, J. *et al.* Mapping technology space by normalizing patent networks. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 443-479, 2017.
- AMOAH, J. *et al.* Co-fermentation of xylose and glucose from ionic liquid pretreated sugar cane bagasse for bioethanol production using engineered xylose assimilating yeast. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 128, [art.] 105283, [p. 1-17], 2019.
- ARBIGE, M. V.; SHETTY, J. K.; CHOTANI, G. K. Industrial enzymology: the next chapter. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 37, n. 12, p. 1355-1366, 2019.
- ARMSTRONG, R. Synthetic biology: living quarters. **Nature**, London, v. 467, n. 7318, p. 916-918, 2010.
- ARNOLD, M.; TAINTER, J. A.; STRUMSKY, D. Productivity of innovation in biofuel technologies. **Energy Policy**, Surrey, v. 124, p. 54-62, 2019.
- ARO, E-M. From first generation biofuels to advanced solar biofuels. **Ambio**, Stockholm, v. 45, n. 1, p. 24-31, 2016.
- ARORA, D. *et al.* Expanding the chemical diversity through microorganisms co-culture: current status and outlook. **Biotechnology Advances**, New York, v. 40, [art.] 107521, [p. 1-14], 2020.
- ARORA, N. *et al.* Advanced gene technology and synthetic biology approaches to custom design microalgae for biodiesel production. *In*: ALAM, A.; WANG, Z. (ed.). **Microalgae biotechnology for development of biofuel and wastewater treatment**. Singapore: Springer, 2019. p. 147-175.
- ASHWATH, N.; KABIR, Z. Environmental, economic, and social impacts of biofuel production from sugarcane in Australia. *In*: KHAN, M. T.; KHAN, I. A. (ed.). **Sugarcane biofuels**. Cham: Springer, 2019. p. 267-284.
- ASIMAKOPOULOS, K.; GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V. Reactor systems for syngas fermentation processes: a review. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 348, p. 732-744, 2018.
- ATSUMI, S.; CONNOR, M. R. Synthetic biology guides biofuel production. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cuyahoga Falls, v. 2010, [art.] ID 541698, 2010.
- ATSUMI, S. *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 10, n. 6, p. 305-311, 2008.
- ATSUMI, S.; HANAI, T.; LIAO, J. C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. **Nature**, London, v. 451, n. 7174, p. 86, 2008.

ATSUMI, S.; HIGASHIDE, W.; LIAO, J. C. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. **Nature Biotechnology**, New York, v. 27, n. 12, p. 1177-1180, 2009.

AYRES, A. Germany's water footprint of transport fuels. **Applied Energy**, Amsterdam, v. 113, p. 1746-1751, 2014.

BABELE, P. K.; YOUNG, J. D. Applications of stable isotope-based metabolomics and fluxomics toward synthetic biology of cyanobacteria. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine**, Hoboken, v. 12, n. 3, [art.] e1472, [p. 1-19], 2019.

BAEK, K. *et al.* DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. **Scientific Reports**, London, v. 6, [art.] 30620, [p. 1-7], 2016.

BALAMURUGAN, S. *et al.* Occurrence of plastidial triacylglycerol synthesis and the potential regulatory role of AGPAT in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 10, n. 1, [art.] 97, [p. 1-14], 2017.

BALAT, M. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production—A review of current work. **Energy Conversion and Management**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 1479-1492, 2011.

BANERJEE, S.; MISHRA, G.; ROY, A. Metabolic engineering of bacteria for renewable bioethanol production from cellulosic biomass. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Seoul, v. 24, p. 713–733, 2019.

BANERJEE, S. *et al.* Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 4, n. 1, p. 77-93, 2010.

BASSALO, M. C.; LIU, R; GILL, R. T. Directed evolution and synthetic biology applications to microbial systems. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 39, p. 126-133, 2016.

BELLEFLEUR, M. PA; WANDA, S-Y; CURTISS, R. Characterizing active transportation mechanisms for free fatty acids and antibiotics in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **BMC Biotechnology**, London, v. 19, [art.] 5, [p. 1-17], 2019.

BENALCÁZAR, E. A. *et al.* Production of bulk chemicals from lignocellulosic biomass via thermochemical conversion and syngas fermentation: a comparative techno-economic and environmental assessment of different site-specific supply chain configurations. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 11, n. 5, p. 861-886, 2017.

BENGYELLA, L. *et al.* Biotechnological application of endophytic filamentous bipolaris and curvularia: a review on bioeconomy impact. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 35, n. 5, [art.] 69, [p. 1-14], 2019.

BENNER, S. A.; SISMOUR, A. M. Synthetic biology. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, n. 7, p. 533-543, 2005.

BENNICH, T.; BELYAZID, S. The route to sustainability—prospects and challenges of the bio-based economy. **Sustainability**, Basel, v. 9, n. 6, [art.] 887, [p. 1-18], 2017.

BERGMAN, A. *et al.* Effects of overexpression of STB5 in *Saccharomyces cerevisiae* on fatty acid biosynthesis, physiology and transcriptome. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 19, n. 3, [art.] foz027, [p. 1-16], 2019.

BERGMANN, J. C. *et al.* Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 21, p. 411-420, 2013.

BERLA, B. M. *et al.* Synthetic biology of cyanobacteria: unique challenges and opportunities. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, [art. 246], [p. 1-14], 2013.

BERNABÒ, N. *et al.* A scientometric analysis of reproductive medicine. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 103-120, 2016.

BERVOETS, I. *et al.* A sigma factor toolbox for orthogonal gene expression in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 2133-2144, 2018.

BHARJ, R. S.; SINGH, G. N.; KUMAR, R. Agricultural waste derived 2nd generation ethanol blended diesel fuel in India: a perspective. *In: SINGH, A. P. et al. Alternative fuels and their utilization strategies in internal combustion engines*. Singapore: Springer, 2020. p. 9-24.

BILAL, M. *et al.* Engineering ligninolytic consortium for bioconversion of lignocelluloses to ethanol and chemicals. **Protein and Peptide Letters**, Schiphol, v. 25, n. 2, p. 108-119, 2018.

BISWAS, R. *et al.* Improved growth rate in *Clostridium thermocellum* hydrogenase mutant via perturbed sulfur metabolism. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 10, [art.] 6, [p. 1-10], 2017.

BLACK, W. B. *et al.* Engineering a coenzyme a detour to expand the product scope and enhance the selectivity of the ehrlich pathway. **ACS Synthetic Biology**, Washington, DC, v. 7, n. 12, p. 2758-2764, 2018a.

BLACK, W. B. *et al.* Rearrangement of coenzyme A-acylated carbon chain enables synthesis of isobutanol via a novel pathway in *Ralstonia eutropha*. **ACS Synthetic Biology**, Washington, DC, v. 7, n. 3, p. 794-800, 2018b.

BOBER, J. R.; BEISEL, C. L.; NAIR, N. U. Synthetic biology approaches to engineer probiotics and members of the human microbiota for biomedical applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 20, p. 277-300, 2018.

- BOYACK, K. W.; KLAVANS, R. Co-citation analysis, bibliographic coupling, and direct citation: Which citation approach represents the research front most accurately? **Journal of the American Society for information Science and Technology**, New York, v. 61, n. 12, p. 2389-2404, 2010.
- BRACHER, J. M. *et al.* The *Penicillium chrysogenum* transporter PcAraT enables high-affinity, glucose-insensitive l-arabinose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 11, [art.] 63, [p. 1-16], 2018.
- BREITLING, R.; TAKANO, E. Synthetic biology advances for pharmaceutical production. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 35, p. 46-51, 2015.
- BRESNAHAN, T. F.; TRAJTENBERG, M. General purpose technologies “Engines of growth”? **Journal of Econometrics**, Amsterdam, v. 65, n. 1, p. 83-108, 1995.
- BRUNK, E. *et al.* Characterizing strain variation in engineered *E. coli* using a multi-omics-based workflow. **Cell Systems**, Maryland Heights, v. 2, n. 5, p. 335-346, 2016.
- BUGGE, M. M.; HANSEN, T.; KLITKOU, A. What is the bioeconomy? A review of the literature. **Sustainability**, Basel, v. 8, n. 7, [art.] 691, [p. 1-22], 2016.
- BUHAESCU, I.; IZZEDINE, H. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. **Clinical Biochemistry**, New York, v. 40, n. 9/10, p. 575-584, 2007.
- BULTER, T. *et al.* Design of artificial cell–cell communication using gene and metabolic networks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 101, n. 8, p. 2299-2304, 2004.
- BUSCHKE, N. *et al.* Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications—optimization of substrate spectrum and process robustness by rational and evolutive strategies. **Bioresource Technology**, Barking, v. 135, p. 544-554, 2013.
- BUSH, L. M.; GIBBS, C.; DEANS, T. L. Synthetic biology: paving the way with novel drug delivery. **The Biochemist**, London, v. 41, n. 3, p. 24-27, 2019.
- CAI, P.; GAO, J.; ZHOU, Y. CRISPR-mediated genome editing in non-conventional yeasts for biotechnological applications. **Microbial Cell Factories**, London, v. 18, [art.] 63, [p. 1-12], 2019.
- CAMERON, D. E.; BASHOR, C. J.; COLLINS, J. J. A brief history of synthetic biology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 12, n. 5, p. 381-390, 2014.
- CANALS, L. M. I. *et al.* Approaches for addressing life cycle assessment data gaps for bio-based products. **Journal of Industrial Ecology**, Cambridge, v. 15, n. 5, p. 707-725, 2011.

- CARBONELL, P. *et al.* Mapping the patent landscape of synthetic biology for fine chemical production pathways. **Microbial Biotechnology**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 687-695, 2016a.
- CARBONELL, P. *et al.* SYNBIOCHEM - A SynBio foundry for the biosynthesis and sustainable production of fine and speciality chemicals. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 44, n. 3, p. 675-677, 2016b.
- CARLSON, K. M. *et al.* Committed carbon emissions, deforestation, and community land conversion from oil palm plantation expansion in West Kalimantan, Indonesia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 109, n. 19, p. 7559-7564, 2012.
- CARRIQUIRY, M. A.; DU, X.; TIMILSINA, G. R. Second generation biofuels: economics and policies. **Energy Policy**, Surrey, v. 39, n. 7, p. 4222-4234, 2011.
- CARVER, S. M.; LEPISTÖ, R.; TUOVINEN, O. H. Effect of the type and concentration of cellulose and temperature on metabolite formation by a fermentative thermophilic consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 44, n. 32, p. 17248-17259, 2019.
- CASSIDY, E. S. *et al.* Redefining agricultural yields: from tonnes to people nourished per hectare. **Environmental Research Letters**, v. 8, n. 3, [art.] 034015, [p. 1-8], 2013.
- CAVIGGIOLI, F. *et al.* Corporate strategies for technology acquisition: evidence from patent transactions. **Management Decision**, Bradford, v. 55, n. 6, p. 1163-1181, 2017.
- CHEN, C. CiteSpace II: Detecting and visualizing emerging trends and transient patterns in scientific literature. **Journal of the American Society for Information Science and Technology**, New York, v. 57, n. 3, p. 359-377, 2006.
- CHEN, C. *et al.* Emerging trends in regenerative medicine: a scientometric analysis in CiteSpace. **Expert Opinion on Biological Therapy**, London, v. 12, n. 5, p. 593-608, 2012.
- CHEN, C. Science Mapping: a systematic review of the literature. **Journal of Data and Information Science**, Beijing, v. 2, n. 2, p. 1-40, 2017.
- CHEN, C. **The centrality of pivotal points in the evolution of scientific networks**. New York: ACM, 2005.
- CHEN, C.; DUBIN, R.; KIM, M. C. Emerging trends and new developments in regenerative medicine: a scientometric update (2000 – 2014). **Expert Opinion on Biological Therapy**, London, v. 14, n. 9, p. 1295-1317, 2014.
- CHEN, C.; IBEKWE-SANJUAN, F.; HOU, J. The structure and dynamics of cocitation clusters: a multiple-perspective cocitation analysis. **Journal of the American Society for Information Science and Technology**, New York, v. 61, n. 7, p. 1386-1409, 2010.

CHEN, C.; LEYDESDORFF, L. Patterns of connections and movements in dual-map overlays: a new method of publication portfolio analysis. **Journal of the American Society for Information Science and Technology**, New York, v. 65, n. 2, p. 334-351, 2014.

CHEN, C.; PAUL, R. J.; O'KEEFE, B. Fitting the jigsaw of citation: information visualization in domain analysis. **Journal of the American Society for Information Science and Technology**, New York, v. 52, n. 4, p. 315-330, 2001.

CHEN, M. T.; WEISS, R. Artificial cell-cell communication in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using signaling elements from *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 23, n. 12, p. 1551-1555, 2005.

CHEN, Y. *et al.* Identification and manipulation of a novel locus to improve cell tolerance to short-chain alcohols in *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 45, n. 7, p. 589-598, 2018.

CHEN, Y. *et al.* Systems and synthetic biology tools for advanced bioproduction hosts. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 64, p. 101-109, 2020.

CHENG, F.; TANG, X. L.; KARDASHLIEV, T. Transcription factor-based biosensors in high-throughput screening. Advances and applications. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 13, n. 7, [art.] e1700648, 2018.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, Amsterdam, v. 51, n. 7, p. 1412-1421, 2010.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 167, n. 3, p. 201-214, 2013.

CHOVAU, S.; DEGRAUWE, D.; VAN DER BRUGGEN, B. Critical analysis of techno-economic estimates for the production cost of lignocellulosic bio-ethanol. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 26, p. 307-321, 2013.

CHOWDHURY, H.; LOGANATHAN, B. Third-generation biofuels from microalgae: a review. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, Amsterdam, v. 20, p. 39-44, 2019.

CHOWNK, M. *et al.* Applications and future perspectives of synthetic biology systems. In: SINGH, S. P. *et al.* (ed.). **Current developments in biotechnology and bioengineering**. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 393-412.

- CHRISTIAN, M. *et al.* Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. **Genetics**, Baltimore, v. 186, n. 2, p. 757-761, 2010.
- CHUBUKOV, V. *et al.* Synthetic and systems biology for microbial production of commodity chemicals. **NPJ Systems Biology and Applications**, London, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2016.
- CICOGNA, M. P. V.; KHANNA, M.; ZILBERMAN, D. Prospects for biofuel production in Brazil: role of market and policy uncertainties. *In*: KHANNA, M.; ZILBERMAN, D. **Handbook of bioenergy economics and policy**. New York: Springer, 2017. v. 2, p. 89-117.
- CLARKE, L. J.; KITNEY, R. I. Synthetic biology in the UK—an outline of plans and progress. **Synthetic and Systems Biotechnology**, Beijing, v. 1, n. 4, p. 243-257, 2016.
- CLARKE, L. J. Synthetic biology—pathways to commercialisation. **Engineering Biology**, New York, v. 3, n. 1, p. 2-5, 2019.
- CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Biofuel production in Escherichia coli: the role of metabolic engineering and synthetic biology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 86, n. 2, p. 419–434, 2010.
- COLEMAN, M. A.; GOOLD, H. D. Harnessing synthetic biology for kelp forest conservation. **Journal of Phycology**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 745-751, 2019.
- CONG, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, Washington, DC, v. 339, n. 6121, p. 819-823, 2013.
- CONNOR, M. R.; ATSUMI, S. Synthetic biology guides biofuel production. **BioMed Research International**, New York, v. 2010, [art.] ID 541698, [p. 1-9], 2010.
- CRAVENS, A.; PAYNE, J.; SMOLKE, C. D. Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products. **Nature Communications**, London, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2019.
- CUELLAR-BERMUDEZ, S. P. *et al.* Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 98, p. 53-65, 2015.
- CUNHA, J. T. *et al.* Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 12, [art.] 20, [p. 1-14], 2019.
- DAHMEN, N. *et al.* Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: status quo and perspectives. **GCB Bioenergy**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 107-117, 2019.
- DARVISHI, F. *et al.* Advances in synthetic biology of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for producing non-native chemicals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 102, n. 14, p. 5925–5938, 2018.

- DARVISHI, F. *et al.* *Yarrowia lipolytica* as a workhorse for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 127, p. 87-96, 2017.
- DAS, M.; PATRA, P.; GHOSH, A. Metabolic engineering for enhancing microbial biosynthesis of advanced biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 119, [art.] 109562, [p. 1-19], 2020.
- DASGUPTA, C. N. *et al.* Dual uses of microalgal biomass: an integrative approach for biohydrogen and biodiesel production. **Applied Energy**, Amsterdam, v. 146, p. 202-208, 2015.
- DAVIS, R. W. *et al.* Growth of mono- and mixed cultures of *Nannochloropsis salina* and *Phaeodactylum tricornutum* on struvite as a nutrient source. **Bioresource Technology**, Barking, v. 198, p. 577-585, 2015.
- DE LORENZO, V.; SCHMIDT, M. Biological standards for the knowledge-based bioeconomy: what is at stake. **New Biotechnology**, New York, v. 40, p. 170-180, 2018.
- DE RASSENFOSSE, G. *et al.* The worldwide count of priority patents: a new indicator of inventive activity. **Research Policy**, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 720-737, 2013.
- DEGHANI MADVAR, M. *et al.* Current status and future forecasting of biofuels technology development. **International Journal of Energy Research**, New York, v. 43, n. 3, p. 1142-1160, 2019.
- DELEBECQUE, C.; PHILP, J. Training for synthetic biology jobs in the new bioeconomy. **Science**, Washington, DC, 2 June 2015. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/careers/2015/06/training-synthetic-biology-jobs-new-bioeconomy>. Acesso em: 5 dez. 2019.
- DELLOMONACO, C. *et al.* Engineered reversal of the β -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals. **Nature**, London, v. 476, n. 7360, p. 355-359, 2011.
- DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**, Amsterdam, v. 88, n. 10, p. 3473-3480, 2011.
- DEVARAPALLI, P.; DESHPANDE, N.; HIRWANI, R. R. Xylose utilization in ethanol production: a patent landscape. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 10, n. 5, p. 534-541, 2016.
- DILEKLI, N.; DUCHIN, F. Prospects for cellulosic biofuel production in the northeastern united states: a scenario analysis. **Journal of Industrial Ecology**, Cambridge, v. 20, n. 1, p. 120-131, 2016.
- DOSSANI, Z. Y. *et al.* A combinatorial approach to synthetic transcription factor-promoter combinations for yeast strain engineering. **Yeast**, Davis, v. 35, n. 3, p. 273-280, 2018.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, Washington, DC, v. 346, n. 6213, [art.] 1258096, 2014.

DRAGONE, G. *et al.* Third generation biofuels from microalgae. *In*: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed.). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Badajoz, Spain: Formatex Research Cente, 2010. p. 1355-1366.

DU, C. *et al.* The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 103, n. 6, p. 2845-2855, 2019.

DUAN, G. *et al.* Replacing water and nutrients for ethanol production by ARTP derived biogas slurry tolerant *Zymomonas mobilis* strain. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 12, [art.] 124, [p. 1-12], 2019.

DUPONT-INGLIS, J.; BORG, A. Destination bioeconomy – The path towards a smarter, more sustainable future. **New Biotechnology**, New York, v. 40, p. 140-143, 2018.

DUTTA, K.; DAVEREY, A.; LIN, J. G. Evolution retrospective for alternative fuels: first to fourth generation. **Renewable Energy**, Oxford, v. 69, p. 114-122, 2014.

EAUCLAIRE, S. F. *et al.* Combinatorial metabolic pathway assembly in the yeast genome with RNA-guided Cas9. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 43, n. 7, p. 1001-1015, 2016.

EGGERT, H.; GREAKER, M. Promoting second generation biofuels: does the first generation pave the road? **Energies**, Torrance, v. 7, n. 7, p. 4430-4445, 2014.

EL-DALATONY, M. M. *et al.* Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, Barking, v. 219, p. 98-105, 2016.

ELKINS, J. G.; RAMAN, B.; KELLER, M. Engineered microbial systems for enhanced conversion of lignocellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 21, n. 5, p. 657-662, 2010.

ELOWITZ, M. B.; LEIBIER, S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. **Nature**, London, v. 403, n. 6767, p. 335-338, 2000.

ENAMALA, M. K. *et al.* Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 94, p. 49-68, 2018.

ENRIQUEZ, J. Genomics and the world's economy. **Science**, Washington, DC, v. 281, n. 5379, p. 925-926, 1998.

ÉRDI, P. *et al.* Prediction of emerging technologies based on analysis of the US patent citation network. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 95, n. 1, p. 225-242, 2013.

ERFANMANESH, M.; ROHANI, V. A.; ABRIZAH, A. Co-authorship network of scientometrics research collaboration. **Malaysian Journal of Library and Information Science**, Kuala Lumpur, v. 17, n. 3, p. 73-93, 2017.

ERLICH, H. A. Polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Immunology**, Amsterdam, v. 9, n. 6, p. 437-447, 1989.

EUROPEAN COMMISSION. **Innovating for sustainable growth: a bioeconomy for Europe**. Luxembourg: Official Journal of the European Union, 2012.

FANG, X. *et al.* Screening of a microbial consortium for selective degradation of lignin from tree trimmings. **Bioresource Technology**, Barking, v. 254, p. 247-255, 2018.

FANG, Y. Visualizing the structure and the evolving of digital medicine: a scientometrics review. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 5-21, 2015.

FARIAS, D.; MAUGERI FILHO, F. Co-culture strategy for improved 2G bioethanol production using a mixture of sugarcane molasses and bagasse hydrolysate as substrate. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 147, p. 29-38, 2019.

FISCHER, C. R.; KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; STEPHANOPOULOS, G. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 10, n. 6, p. 295-304, 2008.

FITZHERBERT, E. B. *et al.* How will oil palm expansion affect biodiversity? **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 23, n. 10, p. 538-545, 2008.

FLORES BUESO, Y.; TANGNEY, M. Synthetic biology in the driving seat of the bioeconomy. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 35, n. 5, p. 373-378, 2017.

FREEMAN, L. C. Centrality in social networks conceptual clarification. **Social Networks**, New York, v. 1, n. 3, p. 215-239, 1978.

FRENCH, K. E. **Harnessing synthetic biology to meet the 2030 UN sustainable development goals**. Preprints. 3 Jan. 2019a. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/330313863_Harnessing_Synthetic_Biology_to_Meet_the_2030_UN_Sustainable_Development_Goals. Acesso em: 8 out. 2019.

FRENCH, K. E. Harnessing synthetic biology for sustainable development. **Nature Sustainability**, London, v. 2, n. 4, p. 250-252, 2019b.

FU, Y. *et al.* Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. **Nature Biotechnology**, New York, v. 32, n. 3, p. 279-284, 2014.

FUNG, E. *et al.* A synthetic gene-metabolic oscillator. **Nature**, London, v. 435, n. 7038, p. 118-122, 2005.

- GAO, D. *et al.* Dual CRISPR-Cas9 cleavage mediated gene excision and targeted integration in *yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 13, n. 9, [art.] 1700590, [p. 1-8], 2018.
- GAO, X. *et al.* Cyanobacterial chassis engineering for enhancing production of biofuels and chemicals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 100, n. 8, p. 3401-3413, 2016.
- GARCIA-GOMEZ, D. *et al.* Production of farnesene from agro-industrial waste by synthetic biology. *In: 2016 IEEE CENTRAL AMERICAN AND PANAMA CONVENTION*, 36., 2016, San Jose. **Proceedings** [...]. San Jose: IEEE, 2016.
- GARDNER, T. S.; CANTOR, C. R.; COLLINS, J. J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. **Nature**, London, v. 403, n. 6767, p. 339-342, 2000.
- GARFIELD, E. Citation indexes for science. **Science**, New York, v. 122, n. 3159, p. 108-111, 1955.
- GEORGIANNA, D. R.; MAYFIELD, S. P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. **Nature**, London, v. 488, n. 7411, p. 329–335, 2012.
- GHIM, C. M. *et al.* Synthetic biology for biofuels: building designer microbes from the scratch. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Seoul, v. 15, n. 1, p. 11-21, 2010.
- GHOSH, P.; WESTHOFF, P.; DEBNATH, D. Biofuels, food security, and sustainability. *In: DEBNATH, D.; BABU, S. C. Biofuels, bioenergy and food security*. London: Elsevier, 2019. p. 211–229.
- GIBSON, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, New York, v. 6, n. 5, p. 343-345, 2009.
- GIMPEL, J. A. *et al.* Advances in microalgae engineering and synthetic biology applications for biofuel production. **Current Opinion in Chemical Biology**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 489-495, 2013.
- GIONATA, S. *et al.* Combined metabolic engineering of precursor and co-factor supply to increase α -santalene production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 11, [art.] 117, [p. 1-16], 2012.
- GOMAA, M. A.; AL-HAJ, L.; ABED, R. M. M. Metabolic engineering of Cyanobacteria and microalgae for enhanced production of biofuels and high-value products. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 121, n. 4, p. 919–931, 2016.
- GOMES, J.; DEWES, H. Disciplinary dimensions and social relevance in the scientific communications on biofuels. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 110, n. 3, p. 1173-1189, 2017.

- GÓMEZ, A. *et al.* The technical potential of first-generation biofuels obtained from energy crops in Spain. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 2143-2155, 2011.
- GONÇALVES, F. A.; SANTOS, E. S.; DE MACEDO, G. R. Alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichiastipitis* and *Zymomonasmobilis* in the presence of inhibitory compounds and seawater. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 55, n. 6, p. 695-708, 2015.
- GONZÁLEZ-GARCÍA, S.; GULLÓN, P.; GULLÓN, B. Bio-compounds production from agri-food wastes under a biorefinery approach: exploring environmental and social sustainability. *In*: MUTHU, S. S. **Quantification of sustainability indicators in the food sector**. Singapore: Springer, 2019. p. 25-53.
- GOOLD, H. D.; WRIGHT, P.; HAILSTONES, D. Emerging opportunities for synthetic biology in agriculture. **Genes**, Basel, v. 9, n. 7, [art.] 341, [p. 1-17], 2018.
- GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 36, n. 2, p. 269-274, 2009.
- GRINDLEY, P. C.; TEECE, D. J. Managing intellectual capital: licensing and cross-licensing in semiconductors and electronics. **California Management Review**, Berkeley, v. 39, n. 2, p. 8-41, 1997.
- GRONVALL, G. K. US Competitiveness in synthetic biology. **Health Security**, New Rochelle, v. 13, n. 6, p. 378-389, 2015.
- GUANGFEN, Y.; DONGKE, Z. An analysis based on citespace III knowledge maps of chinese vocational education research. **Chinese Education & Society**, Armonk, v. 50, n. 5/6, p. 499-519, 2017.
- GUARAGNELLA, N. *et al.* Mitochondria-cytosol-nucleus crosstalk: learning from *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 18, n. 8, [art.] foy088, [p. 1-15], 2018.
- GUERRIERO, G. *et al.* Lignocellulosic biomass: biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2016.
- GUJJALA, L. K. S. *et al.* Biodiesel from oleaginous microbes: opportunities and challenges. **Biofuels**, London, v. 10, n. 1, p. 45-59, 2019.
- GUO, M.; SONG, W. The growing US bioeconomy: drivers, development and constraints. **New Biotechnology**, New York, v. 49, p. 48-57, 2019.
- GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: history, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 42, p. 712-725, 2015.

- GUO, X. W. *et al.* Improved xylose tolerance and 2,3-butanediol production of *Klebsiella pneumoniae* by directed evolution of *rpoD* and the mechanisms revealed by transcriptomics. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 11, [art.] 307, [p. 1-18], 2018.
- GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, Oxford, v. 41, p. 550-567, 2015.
- GUSTAFSSON, R.; KUUSI, O.; MEYER, M. Examining open-endedness of expectations in emerging technological fields: the case of cellulosic ethanol. **Technological Forecasting and Social Change**, New York, v. 91, p. 179-193, 2015.
- HAGEMANN, M.; HESS, W. R. Systems and synthetic biology for the biotechnological application of cyanobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 49, p. 94-99, 2018.
- HAGEN, L. H. *et al.* Quantitative metaproteomics highlight the metabolic contributions of uncultured phylotypes in a thermophilic anaerobic digester. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 2, [art.] e01955-16, [p. 1-15], 2017.
- HALL, B. H.; JAFFE, A. B.; TRAJTENBERG, M. **The NBER patent citation data file: lessons, insights and methodological tools**. Cambridge: National Bureau of Economic Research, 2001.
- HAMMAR, P. *et al.* Single-cell screening of photosynthetic growth and lactate production by cyanobacteria. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 8, [art.] 193, [p. 1-8], 2015.
- HASTY, J.; MCMILLEN, D.; COLLINS, J. J. Engineered gene circuits. **Nature**, London, v. 420, n. 6912, p. 224-230, 2002.
- HASUNUMA, T. *et al.* Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 10, [art.] 2, [p. 1-13], 2011.
- HAUPT, R.; KLOYER, M.; LANGE, M. Patent indicators for the technology life cycle development. **Research Policy**, Amsterdam, v. 36, n. 3, p. 387-398, 2007.
- HAVLÍK, P. *et al.* Global land-use implications of first and second generation biofuel targets. **Energy Policy**, Surrey, v. 39, n. 10, p. 5690-5702, 2011.
- HE, Q. *et al.* Mapping the managerial areas of Building Information Modeling (BIM) using scientometric analysis. **International Journal of Project Management**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 670-685, 2017.
- HEERES, A. S. *et al.* Microbial advanced biofuels production: overcoming emulsification challenges for large-scale operation. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 32, n. 4, p. 221-229, 2014.

HIGGINS, B. T.; KENDALL, A. Life cycle environmental and cost impacts of using an algal turf scrubber to treat dairy wastewater. **Journal of Industrial Ecology**, Cambridge, v. 16, n. 3, p. 436-447, 2012.

HILLMAN, E. T.; READNOUR, L. R.; SOLOMON, K. V. Exploiting the natural product potential of fungi with integrated-omics and synthetic biology approaches. **Current Opinion in Systems Biology**, London, v. 5, p. 50-56, 2017.

HIMMEL, M. E. *et al.* Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, Washington, DC, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HOLLINSHEAD, W.; HE, L.; TANG, Y. J. Biofuel production: an odyssey from metabolic engineering to fermentation scale-up. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, [art.] 344, [p. 1-8], 2014.

HOU, J.; YANG, X.; CHEN, C. Emerging trends and new developments in information science: a document co-citation analysis (2009–2016). **Scientometrics**, Amsterdam, v. 115, n. 2, p. 869-892, 2018.

HU, C. P. *et al.* A journal co-citation analysis of library and information science in China. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 86, n. 3, p. 657-670, 2011.

HU, Y. *et al.* A scientometric study of global electric vehicle research. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 1269-1282, 2014.

HU, Y. *et al.* Engineering *Saccharomyces cerevisiae* cells for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. **Open Biology**, Cambridge, v. 9, n. 5, [art.] 190049, [p. 1-10], 2019.

HU, Z.; LIN, A.; WILLETT, P. Identification of research communities in cited and uncited publications using a co-authorship network. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 118, n. 1, p. 1-19, 2019.

HUANG, M. H.; CHIANG, L. Y.; CHEN, D. Z. Constructing a patent citation map using bibliographic coupling: a study of Taiwan's high-tech companies. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 489-506, 2003.

HUCCEOGULLARI, D.; LUO, Z. W.; LEE, S. Y. Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds. **Microbial Cell Factories**, London, v. 18, n. 1, [art.] 41, [p. 1-29], 2019.

HUGHES, S. R.; MOSER, B. R.; GIBBONS, W. R. Moving toward energy security and sustainability in 2050 by reconfiguring biofuel production. *In*: SONGSTAD, D. D.; HATFIELD, J. L.; TOMES, D. T. **Convergence of food security, energy security and sustainable agriculture**. Berlin: Springer, 2014. p. 15-29.

HUNKAPILLER, T. *et al.* Large-scale and automated DNA sequence determination. **Science**, Washington, DC, v. 254, n. 5028, p. 59-67, 1991.

- HUTCHISON, C. A. *et al.* Design and synthesis of a minimal bacterial genome. **Science**, Washington, DC, v. 351, n. 6280, 2016.
- HWANG, H. J.; LEE, S. Y.; LEE, P. C. Engineering and application of synthetic nar promoter for fine-tuning the expression of metabolic pathway genes in *Escherichia coli*. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 11, [art.] 103, [p. 1-13], 2018.
- INGLE, A. P. *et al.* Socioeconomic impacts of biofuel production from lignocellulosic biomass. *In*: RAI, M.; INGLE, A. P. (ed.). **Sustainable bioenergy: advances and impacts**. Amsterdam: Elsevier, 2019. cap. 13, p. 347-366.
- ISAACS, F. J.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. RNA synthetic biology. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, n. 5, p. 545-554, 2006.
- JACOB, F.; MONOD, J. General conclusions: teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *In*: **COLD spring harbor symposia on quantitative biology**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1961. p. 389-401.
- JAGADEVAN, S. *et al.* Recent developments in synthetic biology and metabolic engineering in microalgae towards biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 11, n. 1, [art. 185], [p. 1-21], 2018.
- JARBOE, L. R. *et al.* Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: contributions of synthetic biology. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cuyahoga Falls, v. 2010, [art.] 761042, [p. 1-18], 2010.
- JAVED, M. R. *et al.* Current situation of biofuel production and its enhancement by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of microbial cells. **Microbiological Research**, Jena, v. 219, p. 1-11, 2019.
- JAYAKODY, L. N. *et al.* Thermochemical wastewater valorization: via enhanced microbial toxicity tolerance. **Energy & Environmental Science**, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 1625-1638, 2018.
- JEONG, H. *et al.* The large-scale organization of metabolic networks. **Nature**, London, v. 407, n. 6804, p. 651-654, 2000.
- JETTI, K. D. *et al.* Improved ethanol productivity and ethanol tolerance through genome shuffling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. **International Microbiology**, Berlin, v. 22, n. 2, p. 247-254, 2019.
- JIN, Y.; LI, X. Visualizing the hotspots and emerging trends of multimedia big data through scientometrics. **Multimedia Tools and Applications**, Norwell, v. 78, n. 2, p. 1289-1313, 2019.
- JOSEPH, R. C.; KIM, N. M.; SANDOVAL, N. R. Recent developments of the synthetic biology toolkit for *Clostridium*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, [art.] 154, [p. 1-13], 2018.

- JULLESSON, D. *et al.* Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. **Biotechnology Advances**, New York, v. 33, n. 7, p. 1395-1402, 2015.
- KALOS, M.; JUNE, C. H. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. **Immunity**, Cambridge, v. 39, n. 1, p. 49-60, 2013.
- KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, n. 2, p. 137-145, 2004.
- KANG, J. S.; KHOLOD, T.; DOWNING, S. Analysis of Russia's biofuel knowledge base: a comparison with Germany and China. **Energy Policy**, Surrey, v. 85, p. 182-193, 2015.
- KANG, M. K.; NIELSEN, J. Biobased production of alkanes and alkenes through metabolic engineering of microorganisms. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 44, n. 4/5, p. 613-622, 2017.
- KARATAY, S. E.; DÖNMEZ, G. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. **Applied Energy**, Amsterdam, v. 88, n. 11, p. 3632-3635, 2011.
- KARVONEN, M.; KLEMOLA, K. Identifying bioethanol technology generations from the patent data. **World Patent Information**, New York, v. 57, p. 25-34, 2019.
- KASTANIOTIS, A. J. *et al.* Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v. 1862, n. 1, p. 39-48, 2017.
- KATZ, L. *et al.* Synthetic biology advances and applications in the biotechnology industry: a perspective. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 45, n. 7, p. 449-461, July 2018.
- KAWAHARA, A. *et al.* Free fatty acid production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is enhanced by deletion of the cyAbrB2 transcriptional regulator. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 220, p. 1-11, 2016.
- KAZNESSIS, Y. N. Models for synthetic biology. **BMC Systems Biology**, London, v. 1, [art.] 47, [p. 1-14], 2007.
- KEASLING, J. D. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 14, n. 3, p. 189-195, 2012.
- KELWICK, R. *et al.* Developments in the tools and methodologies of synthetic biology. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 2, [art.] 60, [p. 1-21], 2014.
- KESSLER, J.; SPERLING, D. Tracking U.S. biofuel innovation through patents. **Energy Policy**, Surrey, v. 98, p. 97-107, 2016.

- KHALIL, A. S.; COLLINS, J. J. Synthetic biology: applications come of age. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, n. 5, p. 367-379, 2010.
- KHETKORN, W. *et al.* Microalgal hydrogen production—A review. **Bioresource Technology**, Barking, v. 243, p. 1194-1206, 2017.
- KIM, J. *et al.* Systems metabolic engineering of Escherichia coli improves coconversion of lignocellulose-derived sugars. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 14, n. 9, [art.] 1800441, [p. 1-11], 2019.
- KIM, M. C.; CHEN, C. A scientometric review of emerging trends and new developments in recommendation systems. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 104, n. 1, p. 239-263, 2015.
- KIM, N. M.; SINNOTT, R. W.; SANDOVAL, N. R. Transcription factor-based biosensors and inducible systems in non-model bacteria: current progress and future directions. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 64, p. 39-46, 2020.
- KIM, Y. G.; CHA, J.; CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 93, n. 3, p. 1156-1160, 1996.
- KITANO, H. Perspectives on systems biology. **New Generation Computing**, New York, v. 18, n. 3, p. 199-216, 2000.
- KITCHENER, R. L.; GRUNDEN, A. M. Methods for enhancing cyanobacterial stress tolerance to enable improved production of biofuels and industrially relevant chemicals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 102, n. 4, p. 1617-1628, 2018.
- KITNEY, R. *et al.* Enabling the advanced bioeconomy through public policy supporting biofoundries and engineering biology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 37, n. 9, p. 917-920, 2019.
- KIZAWA, A. *et al.* The LexA transcription factor regulates fatty acid biosynthetic genes in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. **The Plant Journal**, Oxford, v. 92, n. 2, p. 189-198, 2017.
- KLEINBERG, J. Bursty and hierarchical structure in streams. **Data Mining and Knowledge Discovery**, Boston, v. 7, p. 373–397, 2003.
- KNIGHT, T. **Idempotent vector design for standard assembly of Biobricks**. Cambridge, MA: MIT Libraries, 2003.
- KNOCKE, C.; VOGT, J. Biofuels—challenges & chances: how biofuel development can benefit from advanced process technology. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 9, n. 2, p. 96-99, 2009.
- KNOTT, G. J.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. **Science**, Washington, DC, v. 361, n. 6405, p. 866-869, 2018.

- KO, J. K. *et al.* Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway. **Bioresource Technology**, Barking, v. 209, p. 290-296, 2016.
- KO, J. K.; LEE, S. M. Advances in cellulosic conversion to fuels: engineering yeasts for cellulosic bioethanol and biodiesel production. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 50, p. 72–80, 2018.
- KO, S. S. *et al.* Analyzing technology impact networks for R&D planning using patents: combined application of network approaches. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 917-936, 2014.
- KOCH, B.; SCHMIDT, C.; DAUM, G. Storage lipids of yeasts: a survey of nonpolar lipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 38, n. 5, p. 892-915, 2014.
- KODAMA, Y. *et al.* Effects of inactivation of the cyA_{brB2} transcription factor together with glycogen synthesis on cellular metabolism and free fatty acid production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 115, n. 12, p. 2974-2985, 2018.
- KOIZUMI, T. Biofuels and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 52, p. 829-841, 2015.
- KONG, F. *et al.* Molecular genetic tools and emerging synthetic biology strategies to increase cellular oil content in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 60, n. 6, p. 1184-1196, 2019.
- KOPPOLU, V.; VASIGALA, V. K. Role of *Escherichia coli* in biofuel production. **Microbiology Insights**, Thousand Oaks, v. 9, [art.] MBI. S10878, p. 29-35, 2016.
- KRIMSKY, S. Social responsibility in an age of synthetic biology. **Environment: Science and Policy for Sustainable Development**, Washington, DC, v. 24, n. 6, p. 2-5, 1982.
- KUHAD, R. C. *et al.* Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 55, p. 249–272, 2016.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.
- KWON, S. *et al.* Enhancement of biomass and lipid productivity by overexpression of a bZIP transcription factor in *Nannochloropsis salina*. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 115, n. 2, p. 331–340, 2018.
- LACKNER, M. 3rd-generation biofuels: bacteria and algae as sustainable producers and converters. In: CHEN, W-Y.; SUZUKI, T.; LACKNER, L. **Handbook of climate change mitigation and adaptation**. Cham: Springer, 2017. p. 1201-1230.

- LALMAN, J. A. *et al.* Biofuels production from renewable feedstocks. *In:* LAU, P. C. K. **Quality living through chemurgy and green chemistry**. Berlin: Springer, 2016. p. 193-220.
- LAMSEN, E. N.; ATSUMI, S. Recent progress in synthetic biology for microbial production of C3-C10 alcohols. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, [art.] 196, [p. 1-13], 2012.
- LANDHUIS, E. Technologies to watch in 2020. **Nature**, London, v. 577, n. 7791, p. 585–587, Jan. 2020.
- LARA-FLORES, A. A. *et al.* Bioeconomy and biorefinery: valorization of hemicellulose from lignocellulosic biomass and potential use of avocado residues as a promising resource of bioproducts. *In:* SINGHANIA, R. R. *et al.* (ed). **Waste to wealth**. Springer, Singapore: Springer, 2018. p. 141-170.
- LAZAR, Z.; LIU, N.; STEPHANOPOULOS, G. Holistic approaches in lipid production by *Yarrowialipolytica*. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 36, n. 11, p. 1157-1170, 2018.
- LEE, S. J.; LEE, S. J.; LEE, D. W. Design and development of synthetic microbial platform cells for bioenergy. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, [art.] 92, [p. 1-13], 2013.
- LEE, S. K. *et al.* Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 19, n. 6, p. 556-563, 2008.
- LEE, W. H.; JIN, Y. S. Evaluation of ethanol production activity by engineered *Saccharomyces cerevisiae* fermenting cellobiose through the phospholytic pathway in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 27, n. 9, p. 1649-1656, 2017.
- LEU, H. J.; WU, C. C.; LIN, C. Y. Technology exploration and forecasting of biofuels and biohydrogen energy from patent analysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 37, n. 20, p. 15719-15725, 2012.
- LEWANDOWSKI, I. Securing a sustainable biomass supply in a growing bioeconomy. **Global Food Security**, Amsterdam, v. 6, p. 34-42, 2015.
- LI, H.; LIAO, J. C. A Synthetic anhydrotetracycline-controllable gene expression system in *Ralstonia eutropha* H16. **ACS Synthetic Biology**, Washington, DC, v. 4, n. 2, p. 101–106, 2015.
- LI, M.; BORODINA, I. Application of synthetic biology for production of chemicals in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2015.

- LI, T. *et al.* Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 39, n. 14, p. 6315-6325, 2011.
- LIANG, F. *et al.* Engineered cyanobacteria with enhanced growth show increased ethanol production and higher biofuel to biomass ratio. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 46, p. 51-59, 2018.
- LIAO, J. C. *et al.* Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 14, n. 5, p. 288-304, 2016.
- LIN, B. W.; CHEN, W. C.; CHU, P. Y. Mergers and acquisitions strategies for industry leaders, challengers, and niche players: interaction effects of technology positioning and industrial environment. **IEEE Transactions on Engineering Management**, New York, v. 62, n. 1, p. 80-88, 2015.
- LIN, P. C.; PAKRASI, H. B. Engineering cyanobacteria for production of terpenoids. **Planta**, Berlin, v. 249, n. 1, p. 145-154, 2019.
- LIU, C. G. *et al.* Cellulosic ethanol production: progress, challenges and strategies for solutions. **Biotechnology Advances**, New York, v. 37, n. 3, p. 491-504, 2019a.
- LIU, C. Q. *et al.* Genome mining of 2-phenylethanol biosynthetic genes from *Enterobacter* sp. CGMCC 5087 and heterologous overproduction in *Escherichia coli*. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 11, [art.] 305, [p. 1-15], 2018a.
- LIU, G. *et al.* Increasing protein content and digestibility in sorghum grain with a synthetic biology approach. **Journal of Cereal Science**, London, v. 85, p. 27-34, 2019b.
- LIU, H. *et al.* L-arabonate and D-galactonate production by expressing a versatile sugar dehydrogenase in metabolically engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, Barking, v. 159, p. 455–459, 2014.
- LIU, Y. *et al.* A co-citation and cluster analysis of scientometrics of geographic information ontology. **ISPRS International Journal of Geo-Information**, Basel, v. 7, n. 3, [art.] 120, [p. 1-14], 2018b.
- LIU, Y.; WANG, P. China network public opinion guidance research hotspots and development situation analysis-quantitative analysis based on citespace knowledge map. *In: ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE ON MATERIAL SCIENCE AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING*, 7., 2019, Wuhan, China. [**Proceedings...**]. Bristol: IOP Publishing, 2020. p. 012009.
- LIU, Z. *et al.* Engineering of a novel cellulose-adherent cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic biofuel production. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

- LOKKO, Y. *et al.* Biotechnology and the bioeconomy—Towards inclusive and sustainable industrial development. **New Biotechnology**, New York, v. 40, p. 5-10, 2018.
- LOUHASAKUL, Y. *et al.* Enhanced valorization of industrial wastes for biodiesel feedstocks and biocatalyst by lipolytic oleaginous yeast and biosurfactant-producing bacteria. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v. 148, [art.] 104911, [p. 1-7], 2020.
- LÜ, J.; SHEAHAN, C.; FU, P. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. **Energy & Environmental Science**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 2451-2466, 2011.
- LYND, L. R. *et al.* Cellulosic ethanol: status and innovation. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 45, p. 202-211, 2017.
- MA, S.; YU, X.; CHEN, Q. Hotspots analysis and its applications in vocational education with citespace. *In: 2019 INTERNATIONAL CONFERENCE ON INFORMATION TECHNOLOGY IN MEDICINE AND EDUCATION*, 10., 2019, Qingda. [**Proceedings...**]. [*S.l.*]: IEEE, 2019. p. 394-398.
- MA, Y. H. *et al.* Antisense knockdown of pyruvate dehydrogenase kinase promotes the neutral lipid accumulation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 13, [art.] 100, [p. 1-9], 2014.
- MACHADO, I. M. P.; ATSUMI, S. Cyanobacterial biofuel production. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 162, n. 1, p. 50–56, 2012.
- MADHAVAN, A. *et al.* Synthetic biology and metabolic engineering approaches and its impact on non-conventional yeast and biofuel production. **Frontiers in Energy Research**, Lausanne, v. 5, [art.] 8, [p. 1-12], 2017.
- MAEDA, Y. *et al.* Marine microalgae for production of biofuels and chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 50, p. 111-120, 2018.
- MAHESHWARI, N. V. Agro-industrial lignocellulosic waste: an alternative to unravel the future bioenergy. *In: KUMAR, A.; SHINJIRO, O.; YAU, Y.-Y. (ed.). Biofuels: greenhouse gas mitigation and global warming*. New Delhi: Springer, 2018. p. 291-305.
- MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. R. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, Amsterdam, v. 1, p. 44-49, 2015.
- MALI, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**, Washington, DC, v. 339, n. 6121, p. 823-826, 2013.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Harbor: Cold Spring, 1988.

- MARKHAM, K. A.; ALPER, H. S. Synthetic biology expands the industrial potential of *Yarrowia lipolytica*. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 36, n. 10, p. 1085-1095, 2018.
- MARTINS-SANTANA, L. *et al.* Systems and synthetic biology approaches to engineer fungi for fine chemical production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 6, [art.] 117, [p. 1-18], 2018.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.
- MATSU-URA, T. *et al.* Synthetic gene network with positive feedback loop amplifies cellulase gene expression in *Neurospora crassa*. **ACS Synthetic Biology**, Washington, DC, v. 7, n. 5, p. 1395–1405, 2018.
- MCADAMS, H. H.; ARKIN, A. Gene regulation: towards a circuit engineering discipline. **Current Biology**, London, v. 10, n. 8, p. R318-R320, 2000.
- MCLEOD, C.; NERLICH, B.; MOHR, A. Working with bacteria and putting bacteria to work: the biopolitics of synthetic biology for energy in the United Kingdom. **Energy Research & Social Science**, Amsterdam, v. 30, p. 35-42, 2017.
- MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, J. E. *et al.* Fungal pretreatment of corn stover by *Fomes* sp. EUM1: simultaneous production of readily hydrolysable biomass and useful biocatalysts. **Waste and Biomass Valorization**, Dordrecht, v. 10, n. 9, p. 2637-2650, 2019.
- MENDEZ-PEREZ, D. *et al.* Production of jet fuel precursor monoterpeneoids from engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 114, n. 8, p. 1703–1712, 2017.
- MILANO, J. *et al.* Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 58, p. 180-197, 2016.
- MITSUI, R.; YAMADA, R.; OGINO, H. Improved stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by CRISPR-Cas-mediated genome evolution. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 189, n. 3, p. 810-821, 2019.
- MOGOUTOV, A.; KAHANE, B. Data search strategy for science and technology emergence: a scalable and evolutionary query for nanotechnology tracking. **Research Policy**, Amsterdam, v. 36, n. 6, p. 893-903, 2007.
- MOLINO, A.; CHIANESE, S.; MUSMARRA, D. Biomass gasification technology: the state of the art overview. **Journal of Energy Chemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 10-25, 2016.

MORENO, A. D. *et al.* Production of ethanol from lignocellulosic biomass. *In*: FANG, Z. **Production of platform chemicals from sustainable resources**. Singapore: Springer, 2017. p. 375-410.

MORTIMER, J. C. Plant synthetic biology could drive a revolution in biofuels and medicine. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 244, n. 4, p. 323-331, 2019.

MOYSÉS, D. N. *et al.* Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 3, p. 207, 2016.

MUKHERJI, S.; VAN OUDENAARDEN, A. Synthetic biology: understanding biological design from synthetic circuits. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, n. 12, p. 859-871, 2009.

MUÑOZ, R.; GONZALEZ-FERNANDEZ, C. **Microalgae-based biofuels and bioproducts: from feedstock cultivation to end-products**. Oxford: Woodhead Publishing, 2017.

NAIR, S. K.; JEZ, J. M. Natural product biosynthesis: what's next? An introduction to the JBC Reviews Thematic Series. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 295, n. 2, p. 335-336, 2020.

NAKANISHI, S. C. *et al.* Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 114, n. 10, p. 2211-2221, 2017.

NANDAL, P.; SHARMA, S.; ARORA, A. Bioprospecting non-conventional yeasts for ethanol production from rice straw hydrolysate and their inhibitor tolerance. **Renewable Energy**, Oxford, v. 147, p. 1694-1703, 2020.

NARNOLIYA, L. K.; JADAUN, J. S.; SINGH, S. P. Management of agro-industrial wastes with the aid of synthetic biology. *In*: VARJANI, S. J. *et al.* (ed.). **Biosynthetic technology and environmental challenges**. Singapore: Springer, 2018. p. 11-28.

NEWMAN, M. E. J.; GIRVAN, M. Finding and evaluating community structure in networks. **Physical Review-Section E-Statistical Nonlinear and Soft Matter Physics**, College Park, v. 69, n. 2, p. 26113-26113, 2004.

NG, I.; KESKIN, B. B.; TAN, S. A critical review of genome editing and synthetic biology applications in metabolic engineering of microalgae and cyanobacteria. **Biotechnology Journal**, Weinheim, [art.] 1900228, [p. 1-17], 2020.

NG, P. C.; HENIKOFF, S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 3812-3814, 2003.

- NIAZI, M.; HUSSAIN, A. Agent-based computing from multi-agent systems to agent-based models: a visual survey. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 89, n. 2, [art.] 479, [p. 479-499], 2011.
- NIELSEN, J.; KEASLING, J. D. Synergies between synthetic biology and metabolic engineering. **Nature Biotechnology**, New York, v. 29, n. 8, p. 693-695, 2011.
- NOZZI, N. E.; OLIVER, J. W. K.; ATSUMI, S. Cyanobacteria as a platform for biofuel production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 1, [art.] 7, [p. 1-6], 2013.
- OECD. Measuring the technological and economic value of patents. *In*: OECD. **Enquires into intellectual property's economic impact**. [Paris]: OECD, 2015. cap. 2, p. 85-126.
- OH, E. J. *et al.* Gene amplification on demand accelerates cellobiose utilization in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 82, n. 12, p. 3631–3639, 2016.
- OLAWUMI, T. O.; CHAN, D. W. M. A scientometric review of global research on sustainability and sustainable development. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 183, p. 231-250, 2018.
- OLIVER, J. W. K. *et al.* Cyanobacterial conversion of carbon dioxide to 2,3-butanediol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 110, n. 4, p. 1249-1254, 2013.
- OLIVER, N. J. *et al.* Cyanobacterial metabolic engineering for biofuel and chemical production. **Current Opinion in Chemical Biology**, Oxford, v. 35, p. 43-50, 2016.
- OLMEDA-GÓMEZ, C.; OVALLE-PERANDONES, M. A.; PERIANES-RODRÍGUEZ, A. Co-word analysis and thematic landscapes in Spanish information science literature, 1985–2014. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 195-217, 2017.
- ORT, D. R. *et al.* Redesigning photosynthesis to sustainably meet global food and bioenergy demand. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 112, n. 28, p. 8529-8536, 2015.
- OTOUPAL, P. B.; CHATTERJEE, A. CRISPR gene perturbations provide insights for improving bacterial biofuel tolerance. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 6, [art.] 122, [p. 1-15], 2018.
- OZTURK, I. Utilizing biofuels for sustainable development in the panel of 17 developed and developing countries. **GCB Bioenergy**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 826-836, 2016.
- PADDON, C. J.; KEASLING, J. D. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 12, n. 5, p. 355-367, 2014.

PADELLA, M.; O'CONNELL, A.; PRUSSI, M. What is still limiting the deployment of cellulosic ethanol? Analysis of the current status of the sector. **Applied Sciences - en access journal**, Basel, v. 9, n. 21, [art.] 4523, [p. 1-13], 2019.

PANDEY, S. Prospects of metagenomic cellulases for converting lignocellulosic biomass into bio-ethanol. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, Bhopal, v. 11, n. 2, p. 1079-1091, 2017.

PARK, J. M.; RATHNASINGH, C.; SONG, H. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* based on in silico analysis and its pilot-scale application for 1,3-propanediol and 2,3-butanediol co-production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 44, n. 3, p. 431–441, 2017.

PARTOW, S. *et al.* Reconstruction and evaluation of the synthetic Bacterial MEP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 12, [art.] e52498, [p. 1-12], 2012.

PAUL, S.; DUTTA, A. Challenges and opportunities of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. **Resources, Conservation and Recycling**, New York, v. 130, p. 164-174, 2018.

PEDROLI, D. B. *et al.* Engineering microbial living therapeutics: the synthetic biology toolbox. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 100-115, 2019.

PENG, B. *et al.* Coupling gene regulatory patterns to bioprocess conditions to optimize synthetic metabolic modules for improved sesquiterpene production in yeast. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 10, n. 1, [art.] 43, [p. 1-16], 2017a.

PENG, B. Y. *et al.* A squalene synthase protein degradation method for improved sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 39, p. 209–219, 2017b.

PERALTA-YAHYA, P. P. *et al.* Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Nature**, London, v. 488, n. 7411, p. 320–328, 2012.

PHELAN, R. M. *et al.* Development of next generation synthetic biology tools for use in *Streptomyces venezuelae*. **ACS Synthetic Biology**, Washington, DC, v. 6, n. 1, p. 159-166, 2017.

PHILP, J. Balancing the bioeconomy: supporting biofuels and bio-based materials in public policy. **Energy and Environmental Science**, Cambridge, v. 8, n. 11, p. 3063-3068, 2015.

PHILP, J. The bioeconomy, the challenge of the century for policy makers. **New Biotechnology**, New York, v. 40, p. 11-19, 2018.

PIMENTEL, D.; PATZEK, T. W. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood. **Natural Resources Research**, New York, v. 14, n. 1, p. 65-76, 2005.

- PIXLEY, K. V. *et al.* Genome editing, gene drives, and synthetic biology: will they contribute to disease-resistant crops, and who will benefit? **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 57, p. 165-188, 2019.
- POLLACK, J.; ADLER, D. Emergent trends and passing fads in project management research: a scientometric analysis of changes in the field. **International Journal of Project Management**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 236-248, 2015.
- POPKO, J. *et al.* Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricornutum*. **PloS One**, San Francisco, v. 11, n. 10, [art.] e016467, [p. 1-23], 2016.
- PORTUGAL-PEREIRA, J. *et al.* Agricultural and agro-industrial residues-to-energy: techno-economic and environmental assessment in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 81, p. 521-533, 2015.
- PRASAD, S. *et al.* Global climate change and biofuels policy: Indian perspectives. *In*: PRASAD, S. **Global climate change and environmental policy**. Singapore: Springer, 2020. p. 207-226.
- QIAO, K. *et al.* Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism. **Nature Biotechnology**, New York, v. 35, n. 2, p. 173-177, 2017.
- RADECKA, D. *et al.* Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 15, n. 6, [art.] fov053, [p. 1-13], 2015.
- RAHMAN, Z. *et al.* A critical analysis of bio-hydrocarbon production in bacteria: current challenges and future directions. **Energies**, Torrance, v. 11, n. 10, p. 2663, 2018.
- RAHMAN, Z. *et al.* *Escherichia coli* as a fatty acid and biodiesel factory: current challenges and future directions. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 23, n. 12, p. 12007–12018, 2016.
- RAIMBAULT, B.; COINTET, J. P.; JOLY, P. B. Mapping the emergence of synthetic biology. **PloS One**, San Francisco, v. 11, n. 9, [art.] e0161522, [p. 1-19], 2016.
- KUMAR, U. *et al.* Synthetic biology: a novel approach for pharmaceutically important compounds. *In*: YADAV, A. N. *et al.* **Recent advancement in white biotechnology through fungi**. Cham: Springer, 2019. p. 475-491.
- RAVIKUMAR, S.; AGRAHARI, A.; SINGH, S. N. Mapping the intellectual structure of scientometrics: a co-word analysis of the journal scientometrics (2005–2010). **Scientometrics**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 929-955, 2015.
- RAWLS, R. L. 'Synthetic biology' makes its debut. **Chemical & Engineering News**, New York, v. 78, n. 17, p. 49-49, 2000.

RAZZAK, S. A. In situ biological CO₂ fixation and wastewater nutrient removal with *Neochloris oleoabundans* in batch photobioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 42, n. 1, p. 93-105, 2019.

REN, J.; LEE, J.; NA, D. Recent advances in genetic engineering tools based on synthetic biology. **The Journal of Microbiology**, Heidelberg, v. 58, n. 1, p. 1-10, 2020.

RHIE, M. N. *et al.* Recent advances in the metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae*: a potential platform microorganism for biorefineries. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Seoul, v. 24, n. 1, p. 48-64, 2019.

RIBEIRO, B.; SHAPIRA, P. Private and public values of innovation: a patent analysis of synthetic biology. **Research Policy**, Amsterdam, v. 49, n. 1, [art.] 103875, [p. 1-11], 2020.

RIGOUIN, C. *et al.* Increasing medium chain fatty acids production in *Yarrowia lipolytica* by metabolic engineering. **Microbial Cell Factories**, London, v. 17, [art.] 142, [p. 1-12], 2018.

RO, D. K. *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. **Nature**, London, v. 440, n. 7086, p. 940-943, 2006.

ROELL, M. S.; ZURBRIGGEN, M. D. The impact of synthetic biology for future agriculture and nutrition. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 61, p. 102-109, 2020.

ROLZ, C.; DE LEÓN, R.; DE MONTENEGRO, A. L. M. Co-production of ethanol and biodiesel from sweet sorghum juice in two consecutive fermentation steps. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 41, p. 13-21, 2019.

ROUILLY, V. *et al.* Registry of biobricks models using CellML. **BMC Systems Biology**, London, v. 1, [art.] P79, [p. 1-2], 2007.

ROUSSEEUW, P. J. Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, Amsterdam, v. 20, p. 53-65, 1987.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, London, v. 454, n. 7206, p. 841-845, 2008.

RUDE, M. A.; SCHIRMER, A. New microbial fuels: a biotech perspective. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 274-281, 2009.

RUDORFF, B. F. T. *et al.* Studies on the rapid expansion of sugarcane for ethanol production in São Paulo state (Brazil) using Landsat data. **Remote Sensing**, Basel, v. 2, n. 4, p. 1057-1076, 2010.

RUFFING, A. M.; JONES, H. D. T. Physiological effects of free fatty acid production in genetically engineered *Synechococcus elongatus* PCC 7942. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 109, n. 9, p. 2190-2199, 2012.

RUIZ AMORES, G. *et al.* Recent progress on systems and synthetic biology approaches to engineer fungi as microbial cell factories. **Current Genomics**, Sharjah, v. 17, n. 2, p. 85-98, 2016.

RULLI, M. C. *et al.* The water-land-food nexus of first-generation biofuels. **Scientific Reports**, London, v. 6, [art.] 22521, [p. 1-10], 2016.

RUNGUPHAN, W.; KEASLING, J. D. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 21, p. 103–113, 2014.

RYDZAK, T. *et al.* Deletion of type I glutamine synthetase deregulates nitrogen metabolism and increases ethanol production in *Clostridium thermocellum*. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 41, p. 182–191, 2017.

SCHNEIDER, R. C. S. *et al.* Potential production of biofuel from microalgae biomass produced in wastewater. In: FANG, Z. (ed.). **Biodiesel: feedstocks, production and applications**. London: IntechOpen, 2013.

SADALAGE, P. S. *et al.* Formulation of synthetic bacterial consortia and their evaluation by principal component analysis for lignocellulose rich biomass degradation. **Renewable Energy**, Oxford, v. 148, p. 467-477, 2020.

SADHUKHAN, J. *et al.* A critical review of integration analysis of microbial electrosynthesis (MES) systems with waste biorefineries for the production of biofuel and chemical from reuse of CO₂. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 56, p. 116-132, 2016.

SAHA, B. C. *et al.* Biological pretreatment of corn stover with *Phlebia brevispora* NRRL-13108 for enhanced enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production. **Biotechnology Progress**, Washington, DC, v. 33, n. 2, p. 365-374, 2017.

SAHA, B. C. *et al.* Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 109, p. 29-35, 2016.

SALVACHÚA, D. *et al.* Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 16, p. 7500-7506, 2011.

SANDA, T. *et al.* Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 17, p. 7917–7924, 2011.

SANTOS-MERINO, M.; GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; DE LA CRUZ, F. Engineering the fatty acid synthesis pathway in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 improves omega-3 fatty acid production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 11, [art.] 239, [p. 1-13], 2018.

SANTOS-MERINO, M.; SINGH, A. K.; DUCAT, D. C. New applications of synthetic biology tools for cyanobacterial metabolic engineering. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 7, [art.] 33, [p. 1-24], 2019.

SARITHA, M. *et al.* Biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility. **Indian Journal of Microbiology**, Calcutta, v. 52, n. 2, p. 122-130, 2012.

SARSEKEYEVA, F. *et al.* Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria. Reality and perspectives. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 125, n. 1/2, p. 329-340, 2015.

SCAIFE, M. A. *et al.* Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. **The Plant Journal**, Oxford, v. 82, n. 3, p. 532-546, 2015.

SCHULTZ, J. C.; CAO, M.; ZHAO, H. Development of a CRISPR/Cas9 system for high efficiency multiplexed gene deletion in *Rhodospiridium toruloides*. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 116, n. 8, p. 2103-2109, 2019.

SCHWARTZ, C. M. *et al.* Synthetic RNA polymerase iii promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*. **ACS Synthetic Biology**, Washington, DC, v. 5, n. 4, p. 356-359, 2016.

SEKUROVA, O. N.; SCHNEIDER, O.; ZOTCHEV, S. B. Novel bioactive natural products from bacteria via bioprospecting, genome mining and metabolic engineering. **Microbial Biotechnology**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 828-844, 2019.

SENGUPTA, A.; PAKRASI, H. B.; WANGIKAR, P. P. Recent advances in synthetic biology of cyanobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 102, n. 13, p. 5457-5471, 2018.

SHANMUGAM, S.; NGO, H. H.; WU, Y. R. Advanced CRISPR/Cas-based genome editing tools for microbial biofuels production: a review. **Renewable Energy**, Oxford, v. 149, p. 1107-1119, 2020.

SHAPIRA, P.; KWON, S.; YOUTIE, J. Tracking the emergence of synthetic biology. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 112, n. 3, p. 1439-1469, 2017.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. **Waste and Biomass Valorization**, Dordrecht, v. 10, n. 2, p. 235-251, 2019.

SHEN, C. R. *et al.* Driving forces enable high-titer anaerobic 1-Butanol synthesis in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 77, n. 9, p. 2905-2915, 2011.

SHEN, W. *et al.* Establishment and application of a CRISPR-Cas12a assisted genome-editing system in *Zymomonas mobilis*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 18, n. 1, [art.] 162, [p. 1-11], 2019.

- SHERKHANOV, S. *et al.* Production of FAME biodiesel in *E. coli* by direct methylation with an insect enzyme. **Scientific Reports**, v. 6, [art.] 24239, [p. 1-10], 2016.
- SHI, T. Q. *et al.* Advancing metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* using the CRISPR/Cas system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 102, n. 22, p. 9541–9548, 2018.
- SHIFFRIN, R. M.; BÖRNER, K. **Mapping knowledge domains**. Washington, DC: National Academy Sciences, 2004.
- SHIN, S. E. *et al.* CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2016.
- SI, T.; ZHAO, H. A brief overview of synthetic biology research programs and roadmap studies in the United States. **Synthetic and Systems Biotechnology**, Beijing, v. 1, n. 4, p. 258-264, 2016.
- SIDDIQUI, M. R.; MIRANDA, A.; MOURADOV, A. Microalgae as bio-converters of wastewater into biofuel and food. *In*: PANNIRSELVAM, M. **Water scarcity and ways to reduce the impact**. Cham: Springer, 2019. p. 75-94.
- SILVA, C. E. F.; BERTUCCO, A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: a review and technological outlook. **Process Biochemistry**, Watford, v. 51, n. 11, p. 1833-1842, 2016.
- SILVA, J. E. *et al.* Energetic characterization and evaluation of briquettes produced from naturally colored cotton waste. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 26, n. 14, p. 14259-14265, 2019.
- SILVEIRA, M. H. L. *et al.* Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. **ChemSusChem**, Weinheim, v. 8, n. 20, p. 3366-3390, 2015.
- SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. **Bioresource Technology**, Barking, v. 199, p. 76-82, 2016.
- SINGH, B. K.; TRIVEDI, P. Microbiome and the future for food and nutrient security. **Microbial Biotechnology**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 50-53, 2017.
- SINGH, K. India's bioenergy policy. **Energy, Ecology and Environment**, Stuttgart, v. 4, n. 5, p. 253-260, 2019.
- SINHA, S. K. *et al.* Progressive trends in bio-fuel policies in India: targets and implementation strategy. **Biofuels**, London, v. 10, n. 1, p. 155-166, 2019.
- SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Utilization of microalgae feedstock for concomitant production of bioethanol and biodiesel. **Fuel**, New York, v. 217, p. 458-466, 2018.

- SMANSKI, M. J. *et al.* Synthetic biology to access and expand nature's chemical diversity. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 14, n. 3, p. 135-149, 2016.
- SOMERVILLE, C. *et al.* Feedstocks for lignocellulosic biofuels. **Science**, Washington, DC, v. 329, n. 5993, p. 790-792, 2010.
- SOUZA, S. P.; SEABRA, J. E. A.; NOGUEIRA, L. A. H. Feedstocks for biodiesel production: Brazilian and global perspectives. **Biofuels**, London, v. 9, n. 4, p. 455-478, 2018.
- SPAGNUOLO, M.; YAGUCHI, A.; BLENNER, M. Oleaginous yeast for biofuel and oleochemical production. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 57, p. 73-81, 2019.
- SPEDA, J. *et al.* Metaproteomics-guided selection of targeted enzymes for bioprospecting of mixed microbial communities. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, [art.] 128, [p. 1-17], 2017.
- SRIVASTAVA, A.; VILLALOBOS, M. B.; SINGH, R. K. Engineering photosynthetic microbes for sustainable bioenergy production. *In*: SINGH, P.; SINGH, R. P.; SRIVASTAVA, V. **Contemporary environmental issues and challenges in era of climate change**. Singapore: Springer, 2020. p. 183-198.
- STEGE, J. T. *et al.* Controlling gene expression in plants using synthetic zinc finger transcription factors. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 1077-1086, 2002.
- STEPHANOPOULOS, G. Synthetic biology and metabolic engineering. **ACS Synthetic Biology**, Washington, DC, v. 1, n. 11, p. 514-525, 2012.
- STREBKOV, D. S. Biofuels and food security. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, Beijing, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2015.
- STRELTSOVA, E.; LINTON, J. D. Biotechnology patenting in the BRICS countries: strategies and dynamics. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 36, n. 7, p. 642-645, 2018.
- STRONG, P. J.; XIE, S.; CLARKE, W. P. Methane as a resource: can the methanotrophs add value? **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 49, n. 7, p. 4001-4018, 2015.
- SUN, J. *et al.* A novel strategy for production of ethanol and recovery of xylose from simulated corn cob hydrolysate. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 40, n. 5, p. 781-788, 2018a.
- SUN, J. *et al.* Improved ethanol productivity from lignocellulosic hydrolysates by *Escherichia coli* with regulated glucose utilization. **Microbial Cell Factories**, London, v. 17, [art.] 66, [p. 1-8], 2018b.
- SUN, T. *et al.* A novel small RNA CoaR regulates coenzyme A biosynthesis and tolerance of *Synechocystis* sp. PCC6803 to 1-butanol possibly via promoter-directed

transcriptional silencing. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 10, [art.] 42, [p. 1-14], 2017.

SUN, T. *et al.* Re-direction of carbon flux to key precursor malonyl-CoA via artificial small RNAs in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 11, [art.] 26, [p. 1-16], 2018c.

SUN, Y. *et al.* Fermentation performance and mechanism of a novel microbial consortium DUT08 for 1,3-propanediol production from biodiesel-derived crude glycerol under non-strictly anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, Watford, v. 83, p. 27-34, 2019.

SUN, Y.; ZHAI, Y. Mapping the knowledge domain and the theme evolution of appropriability research between 1986 and 2016: a scientometric review. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 116, n. 1, p. 203-230, 2018.

SUSASTRIAWAN, A. A. P.; SAPTOADI, H.; PURNOMO. Small-scale downdraft gasifiers for biomass gasification: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 76, p. 989-1003, 2017.

SYNNESTVEDT, M. B.; CHEN, C.; HOLMES, J. H. CiteSpace II: visualization and knowledge discovery in bibliographic databases. *In: ANNUAL SYMPOSIUM, 2005. Proceedings [...]*. Bethesda: American Medical Informatics Association, 2005. p. 724-728, 2005.

TAI, M.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 15, p. 1-9, 2013.

TALAMINI, E. *et al.* Scanning the macro-environment for liquid biofuels: a comparative analysis from public policies in Brazil, United States and Germany. **Journal of Strategy and Management**, Bingley, v. 6, n. 1, [p. 40-60], 2013.

TALAMINI, E. *et al.* The composition and impact of stakeholders' agendas on US ethanol production. **Energy Policy**, Surrey, v. 50, p. 647-658, 2012.

TAN, K. W. M.; LEE, Y. K. The dilemma for lipid productivity in green microalgae: importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 9, [art.] 255, [p. 1-14], 2016.

THORENZ, A. *et al.* Assessment of agroforestry residue potentials for the bioeconomy in the European Union. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 176, p. 348-359, 2018.

TIAN, H. *et al.* Synthetic Biology approaches for the production of isoprenoids in *Escherichia coli*. *In: SINGH, S. P. (ed.). Current developments in biotechnology and bioengineering: synthetic biology, cell engineering and bioprocessing technologies.* Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 311-329.

- TOIVANEN, H.; NOVOTNY, M. The emergence of patent races in lignocellulosic biofuels, 2002–2015. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 77, p. 318-326, 2017.
- TOMEI, J.; HELLIWELL, R. Food versus fuel? Going beyond biofuels. **Land Use Policy**, Guildford, v. 56, p. 320-326, 2016.
- TRAJTENBERG, M.; HENDERSON, R.; JAFFE, A. University versus corporate patents: a window on the basicness of invention. **Economics of Innovation and new Technology**, Newark, v. 5, n. 1, p. 19-50, 1997.
- TYAGI, A. *et al.* Synthetic biology: applications in the food sector. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 56, n. 11, p. 1777-1789, 2016.
- TYE, Y. Y. *et al.* The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 60, p. 155-172, 2016.
- VALDEHUESA, K. N. G. *et al.* Direct bioconversion of D-xylose to 1,2,4-butanetriol in an engineered Escherichia coli. **Process Biochemistry**, Watford, v. 49, n. 1, p. 25–32, 2014.
- VAN DOREN, D.; KOENIGSTEIN, S.; REISS, T. The development of synthetic biology: a patent analysis. **Systems and Synthetic Biology**, Heidelberg, v. 7, n. 4, p. 209-220, 2013.
- VAN RAAN, A. F. J. Scientometrics: state-of-the-art. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 205-218, 1997.
- WALLINGTON, T. J. *et al.* When comparing alternative fuel-vehicle systems, life cycle assessment studies should consider trends in oil production. **Journal of Industrial Ecology**, Cambridge, v. 21, n. 2, p. 244-248, 2017.
- WANG, C. *et al.* Metabolic engineering and synthetic biology approaches driving isoprenoid production in Escherichia coli. **Bioresource Technology**, Barking, v. 241, p. 430-438, 2017a.
- WANG, C.; PFLEGER, B. F.; KIM, S. W. Reassessing Escherichia coli as a cell factory for biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 45, p. 92-103, 2017.
- WANG, L. *et al.* Simultaneous fermentation of biomass-derived sugars to ethanol by a co-culture of an engineered Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae. **Bioresource Technology**, Barking, v. 273, p. 269-276, 2019.
- WANG, M. M. *et al.* CRISPRi based system for enhancing 1-butanol production in engineered Klebsiella pneumoniae. **Process Biochemistry**, Watford, v. 56, p. 139–146, 2017b.

WANG, R. *et al.* Recent advances in modular co-culture engineering for synthesis of natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 62, p. 65-71, 2020a.

WANG, S. *et al.* Genome editing in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 with the CRISPR-Cas9 system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 83, n. 10, [art.] e00233-17, [p. 1-16], 2017c.

WANG, S. *et al.* Microbial production of hydrogen by mixed culture technologies: a review. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 15, n. 1, [art.] 190097, [p. 1-8], 2020b.

WANG, X. *et al.* Heterogeneous expression of human PNPLA3 triggers algal lipid accumulation and lipid droplet enlargement. **Algal Research**, Amsterdam, v. 31, p. 276–281, 2018a.

WANG, X. *et al.* Dual expression of plastidial GPAT1 and LPAT1 regulates triacylglycerol production and the fatty acid profile in *Phaeodactylum tricornutum*. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 11, [art.] 318, [p. 1- 14], 2018b.

WANG, X. *et al.* Advances and prospects in metabolic engineering of *Zymomonas mobilis*. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 50, p. 57-73, 2018c.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, London, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.

WEHRS, M. *et al.* Engineering robust production microbes for large-scale cultivation. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 27, n. 6, p. 524-537, 2019.

WEI, N. *et al.* Simultaneous utilization of cellobiose, xylose, and acetic acid from lignocellulosic biomass for biofuel production by an engineered yeast platform. **ACS Synthetic Biology**, Washington, DC, v. 4, n. 6, p. 707-713, 2015.

WENG, Y. *et al.* Exploring the impacts of biofuel expansion on land use change and food security based on a land explicit CGE model: a case study of China. **Applied Energy**, Amsterdam, v. 236, p. 514-525, 2019.

WENNING, L. *et al.* Increasing jojoba-like wax ester production in *Saccharomyces cerevisiae* by enhancing very long-chain, monounsaturated fatty acid synthesis. **Microbial Cell Factories**, London, v. 18, [art.], 49, [p. 1-17], 2019.

WESSELER, J.; VON BRAUN, J. Measuring the bioeconomy: economics and policies. **Annual Review of Resource Economics**, Palo Alto, v. 9, p. 275-298, 2017.

WILKEN, P. H. *et al.* Toward a metric of science: the advent of science indicators. **Social Forces**, v. 57, n. 4, p. 1419–1421, 1979.

WOO, H. M. Solar-to-chemical and solar-to-fuel production from CO₂ by metabolically engineered microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 45, p. 1-7, 2017.

- WU, L. *et al.* Comparing nanotechnology landscapes in the US and China: a patent analysis perspective. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 21, n. 8, p. 1-20, 2019.
- WURTZEL, E. T. *et al.* Revolutionizing agriculture with synthetic biology. **Nature Plants**, London, v. 5, p. 1207-1210, 2019.
- XIANG, C.; WANG, Y.; LIU, H. A scientometrics review on nonpoint source pollution research. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 99, p. 400-408, 2017.
- XU, G. *et al.* Enhancing butanol tolerance of *Escherichia coli* reveals hydrophobic interaction of multi-tasking chaperone SecB. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 12, [art.] 164, [p. 1-13], 2019.
- XU, N.; WEI, L.; LIU, J. Recent advances in the applications of promoter engineering for the optimization of metabolite biosynthesis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 35, n. 2, p. 33, 2019.
- XU, X. *et al.* Microbial chassis development for natural product biosynthesis. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 38, n. 7, p. 779-796, 2020.
- XUE, C. *et al.* Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process engineering for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology Advances**, New York, v. 35, n. 2, p. 310–322, 2017.
- YAGHOUBI, E. *et al.* The effect of different operational parameters on hydrogen rich syngas production from biomass gasification in a dual fluidized bed gasifier. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, Amsterdam, v. 126, p. 210-221, 2018.
- YAMADA, R. *et al.* Enhanced D-lactic acid production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* following optimization of the global metabolic pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 114, n. 9, p. 2075–2084, 2017a.
- YAMADA, R. *et al.* Efficient production of 2,3-butanediol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through modulation of gene expression by cocktail Δ -integration. **Bioresource Technology**, Barking, v. 245, p. 1558-1566, 2017b.
- YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 2, n. 1, p. 26-40, 2008.
- YANG, S. *et al.* *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. **Microbial Biotechnology**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 699-717, 2016.
- YANG, Y. *et al.* Progress and perspective on lignocellulosic hydrolysate inhibitor tolerance improvement in *Zymomonas mobilis*. **Bioresources and Bioprocessing**, Heidelberg, v. 5, n. 1, p. 6, 2018.

- YAO, Y. *et al.* Glycerol and neutral lipid production in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* promoted by overexpression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 7, [art.] 110, [p. 1- 9], 2014.
- YE, S. *et al.* Deletion of PHO13 improves aerobic l-arabinose fermentation in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 46, n. 12, p. 1725-1731, 2019.
- YOKOBAYASHI, Y.; WEISS, R.; ARNOLD, F. H. Directed evolution of a genetic circuit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 99, n. 26, p. 16587-16591, 2002.
- YOON, J.; KIM, K. An analysis of property-function based patent networks for strategic R&D planning in fast-moving industries: the case of silicon-based thin film solar cells. **Expert Systems with Applications**, Oxford, v. 39, n. 9, p. 7709-7717, 2012.
- YOON, J.; PARK, H.; KIM, K. Identifying technological competition trends for R&D planning using dynamic patent maps: SAO-based content analysis. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 94, n. 1, p. 313-331, 2013.
- YU, A. Q. *et al.* An oleaginous yeast platform for renewable 1-butanol synthesis based on a heterologous CoA-dependent pathway and an endogenous pathway. **Microbial Cell Factories**, London, v. 17, [art.] 166, [p. 1-10], 2018.
- YU, D. A scientometrics review on aggregation operator research. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 115-133, 2015.
- ZABED, H. M. *et al.* Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 105, p. 105-128, 2019.
- ZHANG, B. *et al.* Microalgal-bacterial consortia: from interspecies interactions to biotechnological applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 118, [art.] 109563, [p. 1-20], 2020.
- ZHANG, F.; CAROTHERS, J. M.; KEASLING, J. D. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, n. 4, p. 354-359, 2012.
- ZHANG, K. *et al.* New technologies provide more metabolic engineering strategies for bioethanol production in *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 103, n. 5, p. 2087-2099, 2019.
- ZHANG, L. *et al.* Development of a high-throughput, in vivo selection platform for NADPH-dependent reactions based on redox balance principles. **ACS Synthetic Biology**, Washington, DC, v. 7, n. 7, p. 1715–1721, July 2018.
- ZHANG, S. *et al.* Global geographical and scientometric analysis of tourism-themed research. **Scientometrics**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 385-401, 2015.

ZHANG, S. Y. *et al.* Engineering *Rhodospiridium toruloides* for increased lipid production. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 113, n. 5, p. 1056–1066, 2016.

ZHAO, N. *et al.* Synthetic biology approaches to access renewable carbon source utilization in *Corynebacterium glutamicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 102, n. 22, p. 9517-9529, 2018a.

ZHAO, X. A scientometric review of global BIM research: analysis and visualization. **Automation in Construction**, Amsterdam, v. 80, p. 37-47, 2017.

ZHAO, X. Q. *et al.* Metabolic engineering of fungal strains for efficient production of cellulolytic enzymes. *In*: FANG, X.; QU, Y. (ed.). **Fungal cellulolytic enzymes**. Singapore: Springer, 2018b. p. 27-41.

ZHOU, S. *et al.* The application of powerful promoters to enhance gene expression in industrial microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 33, n. 2, p. 23, 2017.

ZHOU, Y. J. *et al.* Fatty acid-derived biofuels and chemicals production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 2, [art.] 32, [p. 1-6], 2014.

ZHU, M. *et al.* Establishment of a transient CRISPR-Cas9 genome editing system in *Candida glycerinogenes* for co-production of ethanol and xylonic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Oxford, v. 128, n. 3, p. 283-289, 2019.

ZILBERMAN, D. *et al.* Technology and the future bioeconomy. **Agricultural Economics**, Amsterdam, v. 44, p. 95-102, 2013. Suplemento.

ZOU, X. *et al.* Genome engineering and modification toward synthetic biology for the production of antibiotics. **Medicinal Research Reviews**, New York, v. 38, n. 1, p. 229-260, 2018.

Apêndices

A

TOPIC: (biofuel* OR ethanol OR biogas OR "alcohol fuel" OR bioenergy OR "microbial oil" OR "microbial biofuel" OR biodiesel OR biobutanol OR butanol OR bioethanol OR biohydrogen OR methanol OR bioalcohol OR "fatty acid esters" OR farnesene OR "bio-diesel" OR "bio diesel" OR bioóleo OR "bio-oil") AND TOPIC: ("synthetic biology" OR "synthetic pathways" OR "metabolic engineering" OR "metabolic pathways" OR "synthetic circuits" OR "synthetic systems" OR "synthetic genomics" OR "synthetic genome" OR "synthetic genes" OR "synthetic nets").

B

((synthetic 2D (biolog+ OR genom+ OR nets)) OR (metabolic 2D (engineer+ OR pathway+))) AND (ethanol OR bioethanol OR second generation OR 2G OR Bio alcohol) AND (lignocellulosic 2D (biomas+)) AND (xylose OR hemicellulose OR pentose OR residue OR corn stover OR switchgrass OR rice straw) AND (sugar 2D (cane bagasse OR fermentation)).