



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Expressão do fator de transcrição Haa1 em *Komagataella phaffii*: efeito na tolerância a ácido acético e na produção de ácido xilônico

Letícia Maria Mallmann Ferreira

Brasília

2022

LETÍCIA MARIA MALLMANN FERREIRA

Expressão do fator de transcrição Haa1 em *Komagataella phaffii*: efeito na tolerância a ácido acético e na produção de ácido xilônico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília para a obtenção de título de mestre em Biologia Microbiana.

Orientador: Prof. Dr. João Ricardo M. de Almeida

Brasília

2022

## RESUMO

A biomassa lignocelulósica é a matéria-prima renovável mais abundante no planeta e o seu máximo aproveitamento é fundamental para uma economia mais sustentável. Entre os desafios da sua utilização por microrganismos, estão a assimilação dos açúcares que a compõem e a tolerância desses organismos aos compostos inibitórios derivados das etapas de pré-tratamento e hidrólise da lignocelulose. O ácido acético é o principal ácido liberado durante a despolimerização da lignocelulose e exerce forte efeito inibitório ao crescimento microbiano, consequentemente comprometendo seu metabolismo e a produção de compostos de interesse. O fator de transcrição Haa1 previamente descrito em *Saccharomyces cerevisiae* é o principal regulador da resposta celular ao estresse fisiológico causado pela presença de ácido acético e portanto a sua superexpressão apresenta potencial para favorecer o desempenho de outras leveduras na presença desse inibidor. Neste trabalho, o desempenho de linhagens recombinantes de *Komagataella phaffii* superexpressando o fator de transcrição Haa1 homólogo foi avaliado na presença de ácido acético e hidrolisado lignocelulósico. Adicionalmente, também foi avaliado o efeito da superexpressão de Haa1 sobre a produção de ácido xilônico por *K. phaffii*. A superexpressão de Haa1 conferiu à levedura maior tolerância ao ácido acético entre  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  reduzindo o tempo de destoxificação em até seis horas e aumentando a produção de biomassa pela levedura em até 20%. O efeito da superexpressão de Haa1 não demonstrou, no entanto, efeito significativo na produção de ácido xilônico por *K. phaffii* quando essa foi cultivada em batelada alimentada com glicose e xilose. Os resultados obtidos demonstram a eficiência do fator de transcrição Haa1 no aumento da tolerância de *K. phaffii* ao ácido acético e abrem caminho para melhorar o desempenho da levedura na produção de ácido xilônico.

Palavras-chave: Engenharia genética, *Komagataella phaffii*, *Pichia pastoris*, hidrolisado lignocelulósico, inibidor, tolerância, ácido acético, xilose, ácido xilônico, Haa1.

## ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is the most abundant renewable resource hence its utilization is fundamental to achieving a sustainable economy. Two of the main challenges in lignocellulose utilization by microorganisms are the efficient assimilation of its sugars and microbial tolerance towards inhibitory molecules formed and released during pretreatment and hydrolysis of the material. Acetic acid is the main acid released by hemicellulose deacetylation and exerts strong inhibitory effect on microbial growth, consequently hampering sugar assimilation and bioproducts yield. Transcriptional factor Haa1 previously described in *Saccharomyces cerevisiae* is the main regulator of cellular response to physiological stress caused by acetic acid and therefore its overexpression is a potential strategy to improve yeast tolerance in the presence of such inhibitor. In this work, the performance of recombinant *Komagataella phaffii* strains overexpressing homologous Haa1 transcription factor was evaluated in the presence of acetic acid and lignocellulosic hydrolysate. Additionally, the effect of Haa1 overexpression on xylonic acid by *K. phaffii* was also evaluated. Haa1 overexpression allowed higher tolerance to *K. phaffii* under  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  acetic acid reducing time for detoxification in six hours and increasing biomass production in 20%. The effect of Haa1 overexpression did not show significant improvement in xylonic acid production by *K. phaffii* when this was cultivated in fed batch with glucose and xylose. Results demonstrate efficiency of Haa1 overexpression towards acetic acid tolerance in *K. phaffii* and open possibilities to enhance the yeast performance on xylonic acid production.

Keywords: Genetic engineering, *Komagataella phaffii*, *Pichia pastoris*, lignocellulosic hydrolysate, inhibitor tolerance, xylose, acetic acid, xylonic acid, Haa1.

## LISTA DE ABREVIACOES

**°C** Graus Celsius

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**DO600nm** Densidade óptica a 600nm

**NADH** Nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NADPH** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*

**pb** Pares de bases

**p/v** peso/volume

**RNA** Ácido ribonucleico

**v/v** volume/volume

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química de diferentes fontes de biomassa lignocelulósica ..	15
Tabela 2. Composição dos polissacarídeos de diferentes fontes de biomassa lignocelulósica .....	17
Tabela 3. Composição química de hidrolisados lignocelulósicos após diferentes pré-tratamentos .....	20
Tabela 4. Linhagens de <i>K. phaffii</i> utilizadas neste trabalho .....	34
Tabela 5. Reagentes utilizados no preparo da digestão do vetor pGAPZB-XDH-HL. ....	36
Tabela 6. Média da produção de biomassa, consumo de açúcar e consumo de ácido acético pelas linhagens de <i>K. phaffii</i> cultivadas em ácido acético a 0 g.L <sup>-1</sup> e 2 g.L <sup>-1</sup> após 8 horas.....	45
Tabela 7. Média da produção de biomassa, consumo de açúcar e consumo de ácido acético pelas linhagens de <i>K. phaffii</i> cultivadas em ácido acético a 0 g.L <sup>-1</sup> e 2 g.L <sup>-1</sup> após 24 horas.....	45
Tabela 8. Média da produção de biomassa, consumo de açúcar e consumo de ácido acético pelas linhagens de <i>K. phaffii</i> cultivadas em ácido acético a 0 g.L <sup>-1</sup> , 2 g.L <sup>-1</sup> , 4 g.L <sup>-1</sup> e 6 g.L <sup>-1</sup> após 8 horas .....	49
Tabela 9. Média da produção de biomassa, consumo de açúcar e consumo de ácido acético pelas linhagens de <i>K. phaffii</i> cultivadas em ácido acético a 0 g.L <sup>-1</sup> , 2 g.L <sup>-1</sup> , 4 g.L <sup>-1</sup> e 6 g.L <sup>-1</sup> após 24 horas .....	49
Tabela 10. Produção e rendimento de ácido xilônico pelas linhagens <i>K. phaffii</i> após 72 horas .....	53
Tabela 11. Produção de ácido xilônico pelas linhagens de <i>K. phaffii</i> em biorreator em diferentes intervalos de tempo .....	56
Tabela 12. Produção e rendimento de ácido xilônico pelas linhagens de <i>K. phaffii</i> em hidrolisado após 72 horas .....	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção anual de etanol por países ou regiões de 2007 a 2020 em bilhões de galões .....	12
Figura 2. Principais fontes de biomassa lignocelulósica .....	13
Figura 3. Representação da organização da parede celular vegetal .....	14
Figura 4. Principais açúcares constituintes da hemicelulose. Fonte: autor. ....	14
Figura 5. Esquema dos processos básicos de uma biorrefinaria desde a biomassa lignocelulósica até seus produtos finais .....	16
Figura 6. Compostos inibitórios presentes no hidrolisado lignocelulósico.....	19
Figura 7. Efeitos inibitórios do acúmulo de ácidos orgânicos na célula.....	21
Figura 8. Esquema simplificado do catabolismo de xilose em microrganismos ....	25
Figura 9. Plasmídeo para superexpressão de Haa1 em <i>K. phaffii</i> .....	33
Figura 10. Plasmídeo para superexpressão de XDH em <i>K. phaffii</i> .....	35
Figura 11. Perfil das linhagens de <i>K. phaffii</i> superexpressando Haa1 na presença de ácido acético a 0 g.L <sup>-1</sup> , 2 g.L <sup>-1</sup> e 6 g.L <sup>-1</sup> .....	44
Figura 12. Perfil das linhagens de <i>K. phaffii</i> superexpressando Haa1 na presença de ácido acético a 0 g.L <sup>-1</sup> , 2 g.L <sup>-1</sup> , 4 g.L <sup>-1</sup> e 6 g.L <sup>-1</sup> .....	47
Figura 13. Consumo de ácido acético pelas linhagens de <i>K. phaffii</i> superexpressando Haa1 na presença do inibidor a 2 g.L <sup>-1</sup> , 4 g.L <sup>-1</sup> e 6 g.L <sup>-1</sup> .....	48
Figura 14. Produção de ácido xilônico pelas linhagens <i>K. phaffii</i> X33-XDH-Haa1 após 24 horas e 48 horas .....	51
Figura 15. Produção de ácido xilônico pelas linhagens <i>K. phaffii</i> X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 após 24, 48 e 72 horas .....	52
Figura 16. Produção de ácido xilônico pelas linhagens de <i>K. phaffii</i> em meio mineral em biorreator .....	54
Figura 17. Produção de ácido xilônico pelas linhagens de <i>K. phaffii</i> na presença de hidrolisado.....	58
Figura 18. Perfil das linhagens de <i>K. phaffii</i> na presença de hidrolisado lignocelulósico em biorreator .....	60

# SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.1. Biomassa como matéria-prima.....	11
1.2. Biomassa lignocelulósica.....	11
1.2.1. Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	13
1.2.3. Pré-tratamento e hidrólise da biomassa lignocelulósica.....	15
1.3. Desafios na utilização de biomassa lignocelulósica.....	17
1.3.1. Tolerância a compostos inibitórios presentes em hidrolisado lignocelulósico.....	17
1.3.1.2. O fator de transcrição Haa1.....	22
1.3.2. Metabolismo de xilose.....	24
1.3.2.1. Produção de biocompostos a partir de xilose.....	24
1.4. A levedura <i>Komagataella phaffii</i> .....	27
2. Objetivos.....	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. Material e métodos.....	30
3.1. Microrganismos.....	30
3.2. Meios de cultura e soluções.....	30
3.3. Avaliação da superexpressão do fator Haa1 em <i>K. phaffii</i> .....	33
3.3.1. Construção das linhagens de <i>K. phaffii</i> superexpressando o fator Haa1 ..	33
3.3.2. Avaliação do efeito da superexpressão do fator Haa1 em <i>K. phaffii</i> na presença de ácido acético.....	34
3.4. Construção de linhagem de <i>K. phaffii</i> produtora de ácido xilônico superexpressando o fator de transcrição Haa1.....	35
3.4.1. Propagação do vetor em <i>E. coli</i> .....	35
3.4.2. Extração do DNA plasmidial.....	36
3.4.3. Linearização do DNA plasmidial.....	36



3.4.4.	Precipitação do DNA plasmidial .....	37
3.4.5.	Transformação de pGAPZB-XDH-HL em <i>K. phaffii</i> .....	37
3.4.6.	Confirmação da produção de ácido xilônico nas linhagens recombinantes de <i>K. phaffii</i> superexpressando o fator Haa1 .....	38
3.4.7.	Avaliação do efeito da superexpressão de Haa1 em <i>K. phaffii</i> na produção de ácido xilônico .....	38
3.4.8.	Avaliação do efeito da superexpressão de Haa1 em <i>K. phaffii</i> na produção de ácido xilônico em biorreator .....	39
3.4.9.	Avaliação do efeito da superexpressão de Haa1 em <i>K. phaffii</i> na produção de ácido xilônico na presença de hidrolisado lignocelulósico.....	40
3.4.10.	Avaliação do efeito da superexpressão de Haa1 em <i>K. phaffii</i> na produção de ácido xilônico na presença de hidrolisado lignocelulósico em biorreator .....	41
3.4.11.	Determinação de biomassa celular.....	41
3.4.12.	Quantificação de metabólitos.....	42
4.	Resultados.....	43
4.1.	Desempenho de <i>K. phaffii</i> superexpressando Haa1 na presença de ácido acético	43
4.2.	Efeito da superexpressão de Haa1 em <i>K. phaffii</i> na produção de ácido xilônico	50
4.2.1.	Construção de linhagens de <i>K. phaffii</i> produtoras de ácido xilônico superexpressando o fator de transcrição Haa1 .....	50
4.2.2.	Desempenho das linhagens de <i>K. phaffii</i> na produção de ácido xilônico.	50
4.2.3.	Desempenho das linhagens de <i>K. phaffii</i> na produção de ácido xilônico em biorreator .....	53
4.2.4.	Desempenho das linhagens de <i>K. phaffii</i> na produção de ácido xilônico na presença de hidrolisado lignocelulósico.....	56
4.2.5.	Desempenho das linhagens de <i>K. phaffii</i> na produção de ácido xilônico na presença de hidrolisado lignocelulósico em biorreator .....	59
5.	Discussão .....	61

6.	Conclusões .....	68
7.	Perspectivas .....	69
8.	Bibliografia .....	71

# 1. Introdução

## 1.1. Biomassa como matéria-prima

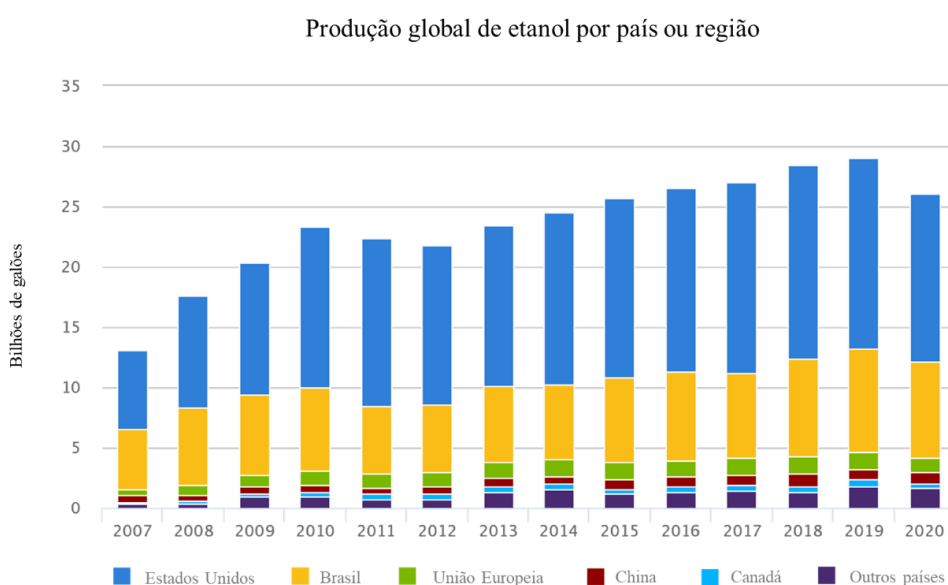
A utilização de recursos renováveis, isto é, recursos capazes de se regenerarem a curto prazo, representa uma alternativa mais sustentável para o meio ambiente e também para a economia internacional (Fatma et al. 2018). Somente no ano de 2020, a demanda global por energia cresceu em 3%, fazendo com que a parcela de energia renovável na matriz energética mundial saltasse de 27% em 2019 para 29% (Stichnothe et al. 2020). Tendo em vista a substituição de materiais fósseis para geração de energia e combustíveis, a biomassa vegetal – matéria orgânica proveniente de plantas – destaca-se como um dos recursos biológicos mais abundantes no planeta, com uma produção anual estimada em 170 bilhões de toneladas (Chandel et al. 2020). Diferentemente dos combustíveis fósseis, que reintroduzem na atmosfera toneladas de carbono antes enterradas sob a superfície terrestre (van Maris et al. 2006), a biomassa de plantas é um material naturalmente biodegradável e sua utilização libera na atmosfera a mesma quantidade de carbono outrora fixada pela própria planta (Puppán 2001).

Entre os biocombustíveis gerados a partir de biomassa, destacam-se os álcoois (etanol, metanol, butanol), o biodiesel e o biogás. O etanol de primeira geração é produzido a partir dos açúcares extraídos de vegetais ricos em sacarose (cana-de-açúcar, beterraba) ou amido (milho, trigo, arroz) por microrganismos fermentadores (Nielsen et al. 2013; Zabed et al. 2017). A combustão de bioetanol a partir do milho, bastante comum nos Estados Unidos, libera até 50% menos gases de efeito estufa comparada à combustão de gasolina comum (Scully et al. 2021). Segundo dados de 2021 da Agência Internacional de Energia Renovável (IRENA), o Brasil é um dos países com a maior capacidade de geração de biocombustíveis e bioenergia. Juntos, os Estados Unidos e o Brasil lideram a produção mundial de biocombustíveis (Figura 1).

## 1.2. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é o principal componente estrutural das plantas, também chamada de matéria seca (“*dry matter*”). Suas principais fontes são resíduos de colheitas agrícolas – plantações não florestais, em especial o bagaço-de-cana, resíduos florestais – galhos, folhas e fragmentos provenientes da coleta de arbustos e gramíneas –

e lixo orgânico urbano (Zabed et al. 2017), como ilustrado na Figura 2. Além de ser um recurso extremamente abundante no planeta, a utilização de biomassa lignocelulósica como matéria-prima dispensa o aumento de áreas de plantio e não oferece competição com a produção de alimentos (Brethauer e Studer 2015). O aproveitamento de resíduos de biomassa vegetal também favorece o funcionamento da economia circular, cujo fundamento é o reaproveitamento, de forma a diminuir a geração de novos resíduos e a liberação de carbono na atmosfera, evitando o uso de recursos naturais até a sua escassez (Galvão et al. 2018).



**Figura 1. Produção anual de etanol por países ou regiões de 2007 a 2020 em bilhões de galões.** Fonte: *Alternative Fuels Data Center* (2021).

Além de biocombustíveis, a biomassa lignocelulósica pode ser empregada para a geração de outros compostos químicos, como álcoois (como xilitol, arabinitol e sorbitol), precursores de biopolímeros (ácido acrílico, ácido polilático, polihidroxialcanoato, etilenoglicol, n-butanol, ácido tereftálico, entre outros), e ácidos orgânicos (como ácido succínico, ácido málico, ácido levulínico, ácido sacárico, ácido itacônico, ácido lático e ácido xilônico) com aplicações em diversas indústrias, desde a química, civil e de materiais até a cosmética e farmacêutica (Stichnothe et al. 2020; Braga et al. 2021).



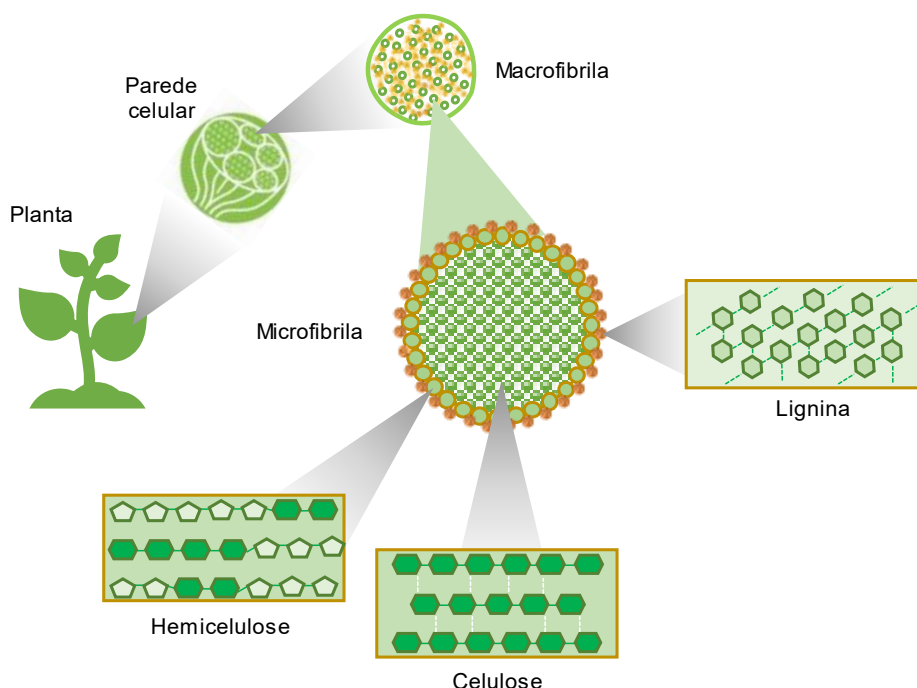
**Figura 2. Principais fontes de biomassa lignocelulósica.** Imagens retiradas de repositório virtual livre de direitos autorais.

### 1.2.1. Estrutura da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta basicamente por polímeros de celulose (38-50%) e hemicelulose (23-32%) e pela macromolécula lignina (15-25%) (Chandel et al. 2020) como representado na Figura 3. Esses polímeros se encontram firmemente entrelaçados, o que garante a estabilidade da parede celular vegetal e a resistência da planta contra danos mecânicos, também dificultando o acesso de microrganismos e enzimas (Liu et al. 2019).

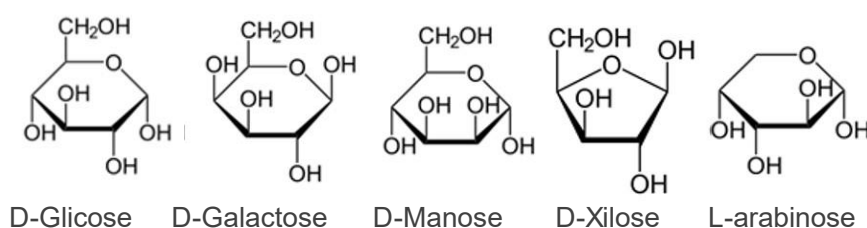
A porção celulósica é um polissacarídeo homogêneo linear formado por cadeias de monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. Sua disposição em cadeias lineares firmemente conectadas por pontes de hidrogênio tornam essa porção bastante resistente e recalcitrante, ou seja, de difícil despolimerização (Gupta et al. 2019).

A hemicelulose é um polímero heterogêneo composto por cadeias ramificadas contendo hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urônicos (ácido D-glicurônico e ácido D-galacturônico) (Gírio et al. 2010), podendo haver também ramificações laterais de grupos metil, feruloil e acetil (Höfte e Voxeur 2017). Devido à sua estrutura ramificada e heterogênea, a hemicelulose não se dispõe em conformação cristalina como a celulose, sendo portanto menos recalcitrante (Chen et al. 2017). Os principais açúcares constituintes da hemicelulose estão representados na Figura 4.



**Figura 3. Representação da organização da parede celular vegetal.** A complexa estrutura tridimensional da parede é disposta em macrofibrilas compostas por microfibrilas de celulose, hemicelulose e lignina. Fonte: autor.

A lignina é uma estrutura complexa e amorfa, formada por três álcoois de fenilpropanóides (p-cumarílico, guaiacílico e sinapílico) unidos por ligações covalentes do tipo éter e carbono-carbono (Li et al. 2015).



**Figura 4. Principais açúcares constituintes da hemicelulose.** Fonte: autor.

A proporção de cada polímero que compõe a lignocelulose pode variar bastante a depender da taxonomia vegetal, das condições de plantio e dos nutrientes presentes no solo (Höfte e Voxeur 2017; Galvão et al. 2018; Liu et al. 2019; Zhou et al. 2021). Por exemplo, em arbustos, a lignina compõe até 30% da massa vegetal, enquanto em

gramíneas, esse valor cai para menos de 20% (Li et al. 2015; Kim 2018), como exemplificado na Tabela 1.

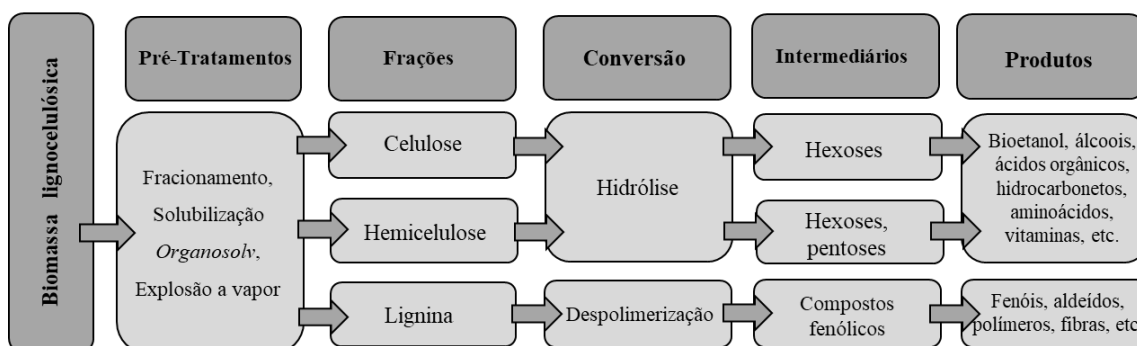
**Tabela 1. Composição química de diferentes fontes de biomassa lignocelulósica.**  
Adaptado de Kim (2018).

<b>Biomassa</b>	<b>Celulose</b>	<b>Hemicelulose</b>	<b>Lignina</b>	<b>Referência</b>
<b>Bagaço de cana</b>	43,1%	31,1%	11,4%	Martín et al. 2007
<b>Palha de milho</b>	37%	22,7%	18,6%	Kim et al. 2016
<b>Fibra de milho</b>	14,3%	16,8%	8,4%	Mosier 2005
<b>Palha de arroz</b>	31,1%	22,3%	13,3%	Chen et al. 2011
<b>Madeira de coníferas</b>	43,8%	6,3%	28,3%	Du et al. 2010
<b>Capim (Poaceae)</b>	39,5%	20,3%	17,8%	Li et al. 2010

### 1.2.3. Pré-tratamento e hidrólise da biomassa lignocelulósica

Como consequência da sua estrutura complexa e alta recalcitrância, a biomassa lignocelulósica precisa ser submetida a etapas de pré-tratamento antes que os açúcares possam ser convertidos em biocombustíveis e outros compostos químicos (Gilna et al. 2017; Baruah et al. 2018; Seibert-Ludwig et al. 2019). De maneira geral, a biomassa é primeiramente submetida a um fracionamento físico como moagem, calor ou irradiação. O material segue então para tratamentos biológicos, físicos e/ou químicos que separam as frações de celulose, hemicelulose e lignina (Zabed et al. 2017). Entre os tratamentos químicos mais comuns estão a solubilização – ou deslignificação – da biomassa com o uso de meio alcalino, solventes orgânicos (“*organosolv*”) e soluções iônicas. Um método físico-químico bastante integrado em biorrefinarias é a explosão a vapor de água, que é eficiente por combinar alta temperatura e pressão permitindo a separação das fibras pela agitação e escape das moléculas de água no material (Singh et al. 2015; Baruah et al. 2018).

Após a separação das frações de lignina, celulose e hemicelulose, estes últimos seguem para a etapa de hidrólise que tem como objetivo a separação dos polissacarídeos constituintes em monômeros e oligômeros de açúcares. Esta etapa pode ser feita com a adição de ácidos, bases, ou ainda pela ação enzimática de celulases e hemicelulases (Brethauer e Studer 2015; Baruah et al. 2018). Os principais processos de refinamento da biomassa lignocelulósica estão esquematizados na Figura 5.



**Figura 5. Esquema dos processos básicos de uma biorrefinaria desde a biomassa lignocelulósica até seus produtos finais.** A biomassa é fracionada e exposta a tratamentos que separam as frações de celulose, hemicelulose e lignina. As frações ricas em carboidratos seguem então para hidrólise para a disponibilização dos açúcares. Fonte: autor.

O líquido rico em açúcares resultante da hidrólise é chamado hidrolisado lignocelulósico e contém uma mistura de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose, galactose) em sua forma monomérica ou em pequenas cadeias (xilana, arabinana, glucana, manana e galactana) e poderão finalmente ser utilizadas como substrato por microrganismos para a produção de diferentes biocompostos (Zabed et al. 2017; Kohli et al. 2019; Liu et al. 2019; Stichnothe et al. 2020).

Além de diferentes proporções de celulose, hemicelulose e lignina, diferentes fontes de biomassa lignocelulósica também podem conter diferentes proporções de açúcares na composição da hemicelulose, como exemplificado na Tabela 2.



**Tabela 2. Composição dos polissacarídeos de diferentes fontes de biomassa lignocelulósica.** Os valores estão representados em g / 100 g de matéria orgânica seca. Adaptado de Almeida et al. (2011).

<b>Biomassa</b>	<b>Glucana</b>	<b>Manana</b>	<b>Galactana</b>	<b>Xilana</b>	<b>Arabinana</b>	<b>Referência</b>
Bagaço-de-cana	43,3	n.d.	n.d.	24,3	2,0	Carrasco et al. 2010
Palha de milho americano	36,1	1,8	2,5	21,4	3,5	Ohgren et al. 2007
Palha de milho italiano	36,8	0,3	2,9	22,2	5,5	Ohgren et al. 2007
Palha de trigo	41,2	n.d.	n.d.	26,1 <sup>1</sup>	-	Rémond et al. 2010
Capim (Poaceae)	34,2	0,5	1,5	23,3	2,0	Faga et al. 2010

n.d.: não determinado; <sup>1</sup>: inclui arabinana.

### **1.3. Desafios na utilização de biomassa lignocelulósica**

A produção de biocompostos a nível comercializável a partir de biomassa lignocelulósica requer microrganismos capazes de ( I ) tolerar a presença de compostos inibitórios no hidrolisado e ( II ) metabolizar tanto pentoses quanto hexoses.

#### **1.3.1. Tolerância a compostos inibitórios presentes em hidrolisado lignocelulósico**

Durante as etapas de pré-tratamento e hidrólise da biomassa lignocelulósica descritas anteriormente, além da liberação dos açúcares constituintes da celulose e hemicelulose, também são formados ou liberados no hidrolisado compostos que afetam negativamente o crescimento microbiano e impactam na sua atividade, sendo considerados assim compostos inibitórios aos microrganismos fermentadores (Almeida et al. 2011; Kim 2018).

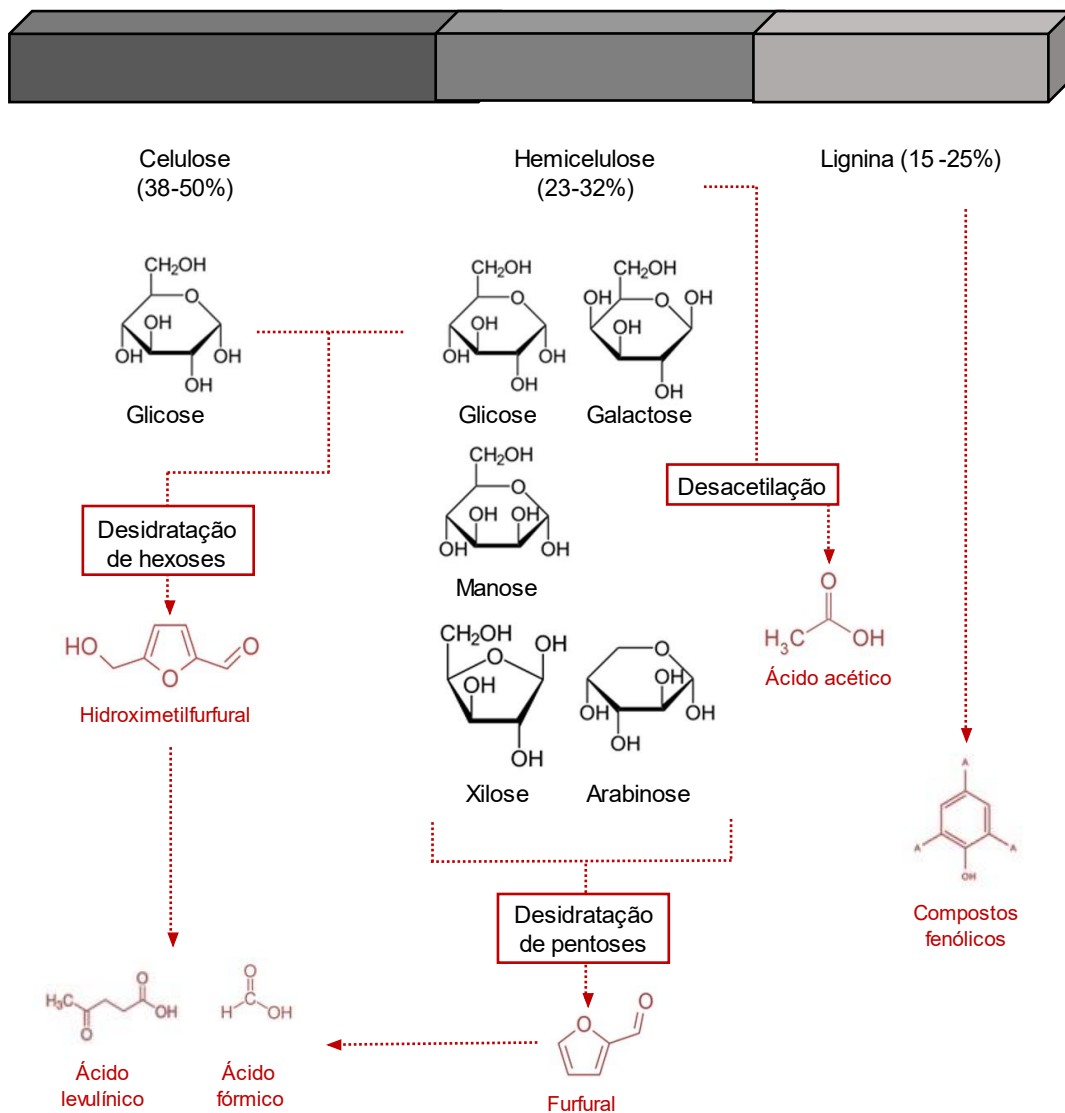
Os compostos inibitórios mais comuns podem ser classificados em três grandes grupos: furaldeídos – como 2-furaldeído (furfural) e 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF), ácidos orgânicos – como ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico – e compostos fenólicos – como vanilina, siringaldeído, coniferil aldeído e outros (Kim 2018). A formação e concentração desses compostos depende da fonte de biomassa, do pré-

tratamento utilizado (físico, ácido, básico, hidrotérmico, solvente, biológico) e da severidade dos métodos (temperatura, pressão, pH, reatividade) (Kim 2018), como exemplificado na Tabela 3.

Furfural e HMF são formados pela desidratação das pentoses e hexoses respectivamente (Figura 6). Durante a sua formação, uma fração desses compostos pode ainda ser decomposta em ácidos orgânicos como ácido fórmico e ácido levulínico (Hayes et al. 2005; Almeida et al. 2007). Uma vez dentro das células, estes compostos geram espécies reativas de oxigênio (ROS) que se acumulam no citoplasma, causando danos à membrana plasmática, organelas e à molécula de DNA (Allen et al. 2010). Além disso, a conversão de furfural e HMF a compostos menos tóxicos pela própria célula, como álcool furfurílico e ácido furoico, gera desbalanço redox devido à alta demanda de NAD(P)H e formação de NAD(P)<sup>+</sup>, o que acarreta a inibição do fluxo metabólico e da síntese proteica, conseqüentemente diminuindo o metabolismo respiratório, causando o prolongamento da fase *lag* de crescimento celular e também a diminuição do metabolismo fermentativo (Horváth et al. 2003; Almeida et al. 2011).

Compostos fenólicos são gerados pela quebra de lignina (Almeida et al. 2007). Alguns desses compostos, como ácido ferúlico e vanilina podem ter efeito tóxico às células, causando perda da integridade da membrana plasmática, impedindo seu funcionamento como barreira seletiva e o transporte de açúcar para o interior da célula, dentre outras funções (Kim 2018). Devido ao seu baixo peso molecular, esses compostos adentram facilmente à célula e podem danificar também estruturas internas e o DNA. Como conseqüência, pode ocorrer a inibição da formação de RNA e síntese proteica (Klinke et al. 2004; Jönsson e Martín 2016; Kim 2018; Fletcher e Baetz 2020).

O ácido acético é um ácido orgânico lipofílico classificado como ácido fraco, assim como o ácido levulínico e o ácido fórmico. Ácidos fracos são assim classificados por sua característica de fácil dissociação. A força de um ácido é descrita pela sua constante de acidez ( $K_a$ ) expressa pelo negativo do seu logaritmo ( $pK_a$ ), que significa o valor de pH no qual a concentração de sua forma dissociada e não dissociada serão iguais. O  $pK_a$  do ácido acético é 4,75 à temperatura ambiente (25°C). Valores de pH abaixo desse valor acarretam a predominância da sua forma não dissociada, que também devido ao seu baixo peso molecular, adentra facilmente as células por difusão passiva ou facilitada através da membrana plasmática (Mira et al. 2010a).



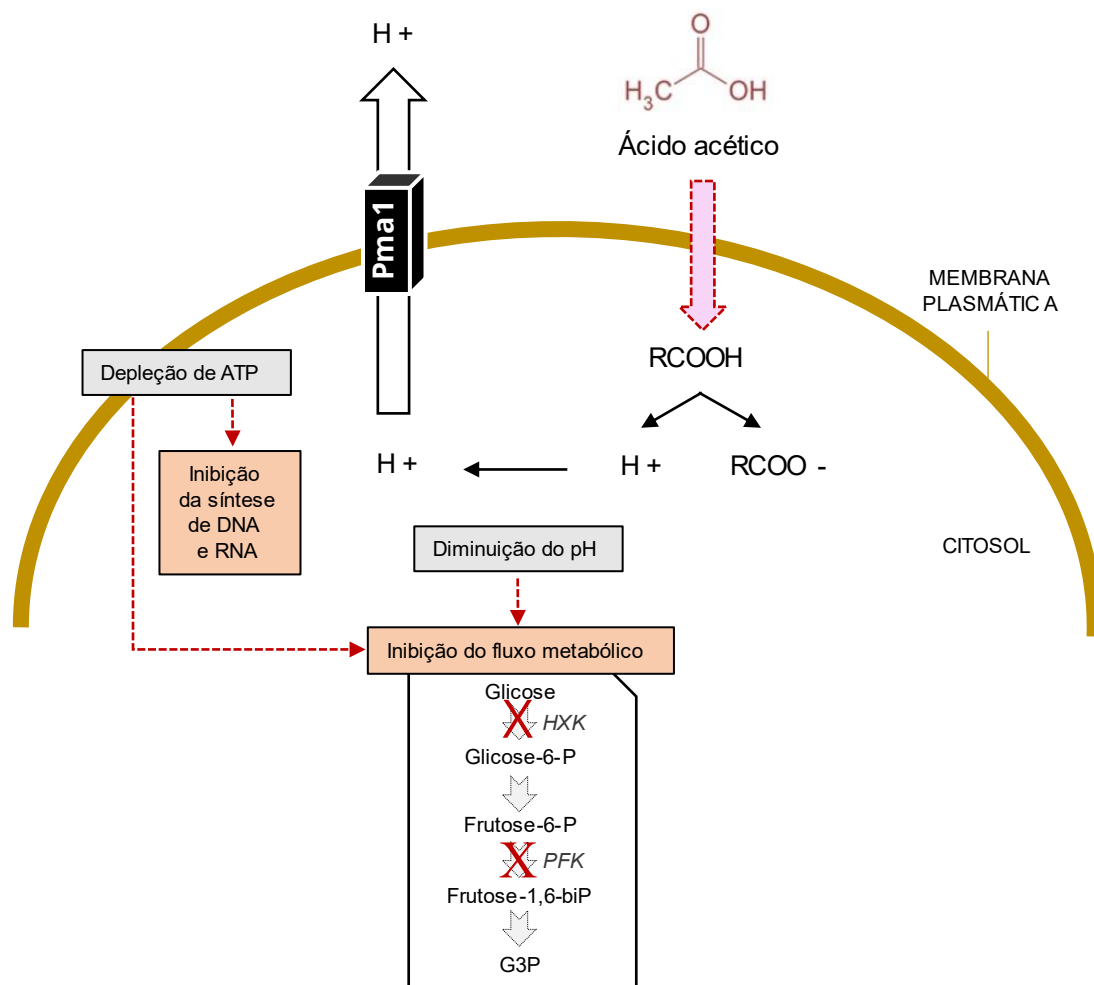
**Figura 6. Compostos inibitórios presentes no hidrolisado lignocelulósico.** Os furaldeídos são formados pela desidratação de hexoses (HMF) e pentoses (furfural) e podem ser decompostos em ácido levulínico e ácido fórmico. O ácido acético é liberado a partir da desacetilação dos carboidratos que acontece durante a hidrólise da hemicelulose. Compostos fenólicos são provenientes da solubilização da lignina. Adaptado de Almeida et al. (2007).

Uma vez no citosol, em pH próximo ao neutro, sua molécula é dissociada liberando prótons  $H^+$  e seus correspondentes ânions (Figura 7), que se acumulam no citosol e causam a acidificação do pH intracelular (Guldfeldt e Arneborg 1998; Fernandes et al. 2005).

**Tabela 3. Composição química de hidrolisados lignocelulósicos após diferentes pré-tratamentos.**

Biomassa sólida	Pré- tratamento	Composição				Compostos inibitórios (g.L <sup>-1</sup> )			Referências
		Glucana	Xilana	Arabinana	Lignina	Ácido acético	Furanos	Fenóis	
Bagaço de cana	Hidrotermal	37,5%	22,6%	1,4%	25,3%	1,1-3,4	0,5-5,1	1,4-2,4	Michelin et al. 2016
Palha de milho	Hidrotermal	37%	22,7%	n.d.	18,6%	2,0-2,8	0,74-8,37	181-246 AU <sup>1</sup>	Kim et al. 2016
<i>Maple</i> (árvore)	Hidrotermal	40,9%	14,7%	0%	29,1%	13,1	4,1	1,3	Kim et al. 2011
Cavaco	Explosão a vapor	41,4%	15,0%	1,2%	26,4%	≥7,5	0,5-3,2	n.d.	Sassner et al. 2008
Palha de trigo	Explosão a vapor	32,6%	20,1%	3,3%	26,5%	0,04-1,01	0,16-2,14	n.d.	Linde et al. 2008
Bagaço de cana	Explosão a vapor e hidrólise ácida	7,1 g.L <sup>-1</sup>	80,6 g.L <sup>-1</sup>	n.d.	n.d.	19,62	2,56	n.d.	Morais Junior et al. 2019

n.d.: não determinado; AU<sup>1</sup>: unidade de absorvância (280nm).



**Figura 7. Efeitos inibitórios do acúmulo de ácidos orgânicos na célula.** Os ácidos orgânicos (aqui representados pela fórmula “RCOOH”) permeiam facilmente pela membrana celular e rapidamente se dissociam no citosol devido à diferença de pH. O acúmulo de prótons é compensado pela célula pela atividade da bomba de prótons Pma1 ATPase, causando a depleção de ATP celular e a consequente diminuição de atividades essenciais, como a divisão celular e a síntese proteica, e atividade enzimática de hexoquinase (HXK) e fosfofrutoquinase (PFK). Fonte: autor.

A acidificação do citosol causada pela dissociação do ácido acético e acúmulo de prótons  $H^+$  causa desbalanço no gradiente de prótons da membrana plasmática, prejudica a síntese de DNA e RNA e inibe o funcionamento de enzimas essenciais ao metabolismo de carbono, como a hexoquinase e a fosfofrutoquinase (Figura 7), consequentemente prejudicando a produção de biomassa (Pampulha e Loureiro-Dias 1990; Mira et al. 2010a). Na tentativa de restabelecer o pH intracelular, a levedura responde ao estresse estimulando a atividade de bomba de prótons  $H^+$ -ATPase (PM- $H^+$ -ATPase) Pma1 (Figura 7), que promove a extrusão de prótons  $H^+$  com gasto de energia obtida pela hidrólise de

ATP (Carmelo et al. 1997). Esta resposta celular é observada não apenas na presença de ácido acético mas também de outros ácidos fracos que se dissociam pela membrana celular, como ácido sórbico (Holyoak et al. 1996), ácido cáprico (Alexandre et al. 1996) e succínico (Carmelo et al. 1997). Análises genômicas também indicam que a ativação de bomba de prótons  $H^+$ -ATPase de membrana vacuolar, V-ATPase, também é essencial para o restabelecimento da homeostase dentro da célula em resposta a ácidos fracos uma vez que contribui para a realocação de prótons  $H^+$  (Carmelo et al. 1997; Mira et al. 2010a).

Como consequência da atividade de  $H^+$ -ATPase, acontece a depleção de ATP, o que compromete o funcionamento do metabolismo celular (Pampulha e Loureiro-Dias 1990). Além disso, a acidificação do citosol também promove impacto na organização dos lipídios que constituem a membrana plasmática, impedindo o funcionamento de suas proteínas e portanto sua capacidade de permeabilização seletiva. Isso permite a difusão passiva de prótons e pequenas moléculas presentes no meio externo para o interior da célula, intensificando o desequilíbrio de pH causado pelo acúmulo de ácido no citosol. (Piper et al. 2001; Fernandes et al. 2005).

Os efeitos inibitórios causados pelo ácido acético e outros ácidos fracos, e pela resposta celular ao estresse, levam o crescimento celular da levedura a uma fase de latência, proporcional ao estresse causado (Mira et al. 2010a; Palma et al. 2018; Ndukwe et al. 2020).

Estratégias de adaptação e melhoramento genético têm sido desenvolvidas a fim de aumentar a tolerância microbiana aos compostos inibitórios presentes em hidrolisado lignocelulósico. Ferramentas de *screening* de DNA, RNAs, proteínas e metabólitos (metagenoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma, respectivamente) possibilitaram a identificação de genes envolvidos na resposta adaptativa de microrganismos. Dessa forma, diversos trabalhos foram desenvolvidos com a construção de linhagens de microrganismos tolerantes utilizadas em processos biotecnológicos a partir de biomassa lignocelulósica (Wang et al. 2018; Kim 2018).

#### **1.3.1.2. O fator de transcrição Haa1**

O metabolismo microbiano pode ser redirecionado em resposta a compostos inibitórios através da expressão gênica induzindo atividades de detoxificação (Pettersson et al. 2006; Almeida et al. 2009; Mira et al. 2010b; Brandt et al. 2019). Vias regulatórias

da resposta celular ao estresse causado por ácidos fracos dependentes de fatores de transcrição foram identificadas, entre eles, Haa1 (Fernandes et al. 2005; Mira et al. 2010b), Rim101 (Mira et al. 2009), Msn2/Msn4 (Schüller et al. 2004) e War1 (Kren et al. 2003; Schüller et al. 2004). O fator de transcrição Haa1 foi inicialmente incluído na família de fatores de transcrição de fungos regulados por cobre, que inclui outros fatores como Ace1 e Mac1 em *S. cerevisiae*, Amt1 em *Candida glabrata* e Cuf1 em *Schizosaccharomyces pombe*. Porém, diferentemente desses, a atividade do fator Haa1 não depende da concentração de cobre na célula (Keller et al. 2001; Rutherford et al. 2004).

Em ensaios com *S. cerevisiae*, a expressão de Haa1 reduziu a duração da fase de adaptação das células expostas a concentrações tóxicas de ácido acético, reduzindo a perda da viabilidade celular causada por este inibidor (Fernandes et al. 2005). O mapeamento de genes transcritos pela levedura na presença de diferentes ácidos de cadeia curta revelou que o fator Haa1 está envolvido na expressão de mais de 80% dos genes relacionados à resposta celular à presença de ácido acético (Mira et al. 2011). Esses genes estão relacionados a diversas funções como o metabolismo de nutrientes (carboidratos, lipídios, aminoácidos), processamento de ácidos nucleicos, transporte *multidrug resistance* (MDR), modificações na parede celular, dobramento de proteínas, entre outros (Keller et al. 2001; Fernandes et al. 2005; Simões et al. 2006; Abbott et al. 2008; Mira et al. 2010). Entre eles, pode-se citar *SAP30*, *HRK1*, *TPO2*, *TPO3* e *YGPI* (Mira et al. 2010b).

Recentemente, o transcriptoma de *K. phaffii* na presença de ácido acético também revelou uma maior expressão de diversos genes relacionados a esses mecanismos, como o processamento de ácidos nucleicos, metilação de RNA, processo de oxido-redução e regulação metabólica e principalmente transporte transmembrana de íons e aminoácidos (Paes et al. 2021), incluindo *TPO3*, que codifica para transportador do tipo MDR responsáveis por mediar o efluxo de íons  $\text{RCOO}^-$  pela membrana celular realizando o antiporte de prótons  $\text{H}^+$  (Fernandes et al. 2005), sugerindo semelhanças entre a regulação das respostas ao estresse celular causado por esse inibidor entre as leveduras.

### 1.3.2. Metabolismo de xilose

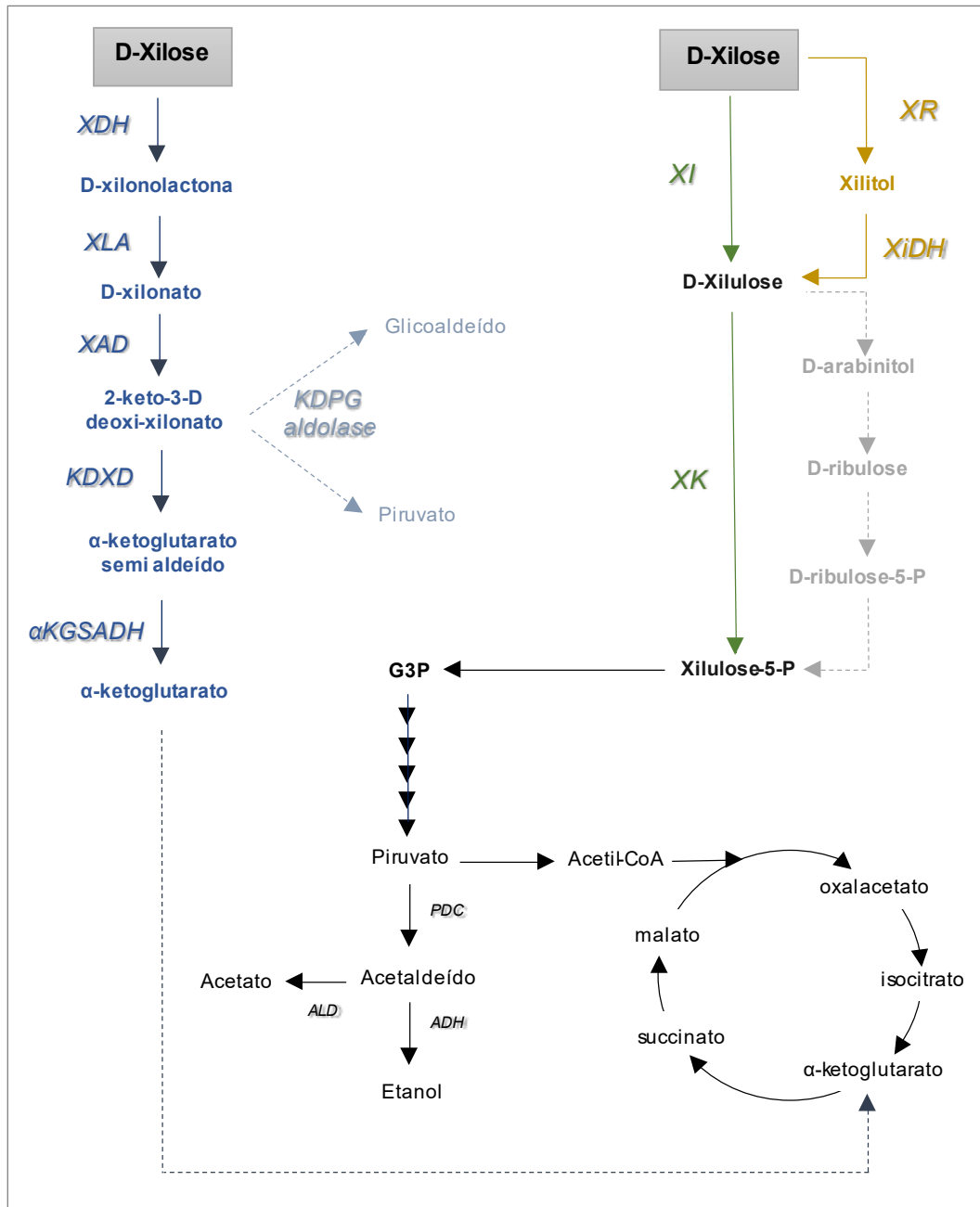
A xilose é a pentose mais abundante na biomassa lignocelulósica (Trichez et al. 2022). A assimilação de xilose por microrganismos depende da presença de enzimas capazes de convertê-la, o que não é uma característica comum a todos os microrganismos. De forma geral, fungos filamentosos e algumas leveduras capazes de utilizarem xilose o fazem por uma via oxidorrredutora, que envolve a redução de xilose a xilitol pela ação de xilose redutase (XR) e a oxidação de xilitol a xilulose via xilitol desidrogenase (XiDH). Em seguida, a xilulose é fosforilada a xilulose-5-P pela ação da xilulokinase (XK) (Zhao et al. 2020). Em algumas leveduras, como *Scheffersomyces stipitis*, a conversão de xilulose a xilulose-5-P pode acontecer através de uma via alternativa que envolve diversas outras enzimas – arabinitol desidrogenase, ribulose redutase, ribulokinase e ribulokinase-5-P epimerase (François et al. 2020). A maioria das bactérias, por sua vez, é capaz de converter xilose diretamente a xilulose através da xilose isomerase (XI). Em ambas as vias, a xilulose-5-P será metabolizada a piruvato na forma de gliceraldeído-3-P (Moysés et al. 2016; François et al. 2020).

O domínio Archaea e algumas bactérias possuem uma via alternativa, descrita pela primeira vez por (Weimberg 1961) em *Pseudomonas fragi*, onde a xilose é oxidada a xilonolactona pela xilose desidrogenase (XDH) e esta é convertida a ácido xilônico de forma espontânea ou catalisada pela ação da xilonolactonase (XLA). Em seguida, ocorre sua desidratação a 2-keto-3-deoxi-D-xilonato, subseqüentemente a  $\alpha$ -ketoglutarato semialdeído e finalmente a  $\alpha$ -ketoglutarato, composto intermediário do ciclo do ácido cítrico. O 2-keto-3-deoxi-D-xilonato pode ainda ser convertido em glicolaldeído e piruvato, pela 2-desidro-3-deoxi-fosfogluconate aldolase (KDPG), pela chamada via de Dahms (Dahms 1974; Moysés et al. 2016; François et al. 2020). As vias de catabolismo de xilose descritas estão esquematizadas na Figura 8.

#### 1.3.2.1. Produção de biocompostos a partir de xilose

O conhecimento das vias de assimilação de xilose e seus compostos intermediários permitiu a construção de microrganismos para a produção de diferentes biocompostos a partir deste açúcar, como xilitol (Cheng et al. 2014; Jagtap e Rao 2018), ácido xilônico (Toivari et al. 2012; Ramos et al. 2021; Trichez et al. 2022), etilenoglicol (Wang et al. 2018), ácido glicólico (Lachaux et al. 2019), entre outros.





**Figura 8. Esquema simplificado do catabolismo de xilose em microrganismos.** A conversão de xilose em xilulose acontece pela via oxidorrredutora (em amarelo) através da xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XiDH) ou diretamente (em verde) através da xilose isomerase (XI). A xilulose é então fosforilada a xilulose-5-P por ação da xilulokinase (XK) ou ainda por via alternativa envolvendo a formação de arabinitol (em cinza). Na via de Weimberg (em azul), a xilose é oxidada a xilonolactona pela xilose desidrogenase (XDH) e convertida em xilonato, 2-keto-3-D-deoxi-xilonato e  $\alpha$ -ketoglutarato semialdeído até  $\alpha$ -ketoglutarato pela ação de xilonolactonase (XLA), xilonato desidrogenase (XAD), 2-keto-deoxi-D-xilonato desidratase (KDXD) e  $\alpha$ -ketoglutarato semialdeído desidrogenase ( $\alpha$ KGSADH). G3P: gliceraldeído-3-P. PDC: piruvato desidrogenase complexo quinase. ADH: álcool desidrogenase. ALD: aldeído desidrogenase. Fonte: autor.

O ácido xilônico ( $C_5H_{10}O_6$ ) foi identificado pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos (US DOE) como um dos trinta compostos químicos promissores de alto valor agregado para produção a partir de biomassa (Werpy e Petersen 2004), com diversas aplicações como na indústria civil como aditivo de cimento (Chun et al. 2006), na fabricação de copolímeros como poliamidas, poliésteres e hidrogeis (Zamora et al. 2000; Sundar e Nampoothiri 2022), como plastificante (Jin et al. 2022) e como precursor na síntese de outros compostos de alto valor agregado como etilenoglicol e ácido glicólico (Salusjärvi et al. 2019). A síntese de ácido xilônico por via biológica acontece através da oxidação de xilose via xilose desidrogenase e conversão da xilonolactona de forma espontânea ou catalisada por xilonolactonase (Figura 8). Bactérias como *P. fragi*, *Gluconobacter oxydans* e *Parabukholderia sacchari* são capazes de produzir ácido xilônico naturalmente com rendimento comparável ao máximo teórico (Trichez et al. 2022).

Diversas estratégias foram desenvolvidas para promover a assimilação de xilose a ácido xilônico em organismos como *Escherichia coli* (Liu et al. 2012; Zhang et al. 2019), *Klebsiella pneumoniae* (Wang et al. 2016), *Corynebacterium glutamicum* (Sundar et al. 2020), *Zymomonas mobilis* (Herrera et al. 2021), *Saccharomyces cerevisiae* (Toivari et al. 2012), *Pichia kudriavzevii* (Toivari et al. 2013) e *Candida glycerinogenes* (Qiao et al. 2021) através da expressão heteróloga de XDH (*xyl*) provenientes de organismos naturalmente consumidores de xilose. Recentemente, a produção de ácido xilônico foi descrita pela primeira vez em *K. phaffii* por Ramos et al. (2021) através de expressão heteróloga de XDH de origem bacteriana pela integração de *xylB-HL*, com a obtenção de um rendimento de até  $0,96 \text{ g.g}^{-1}$  em meio definido e  $0,43 \text{ g.g}^{-1}$  em hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar.

O acúmulo de ácido xilônico no meio também pode exercer certa toxicidade aos organismos modificados com a via de Weimberg quando este é o seu produto final ou intermediário (Bañares et al. 2021). O ácido xilônico produzido em grande quantidade pelo microrganismo pode acidificar rapidamente o meio intracelular, ou o meio externo, caso seja secretado para fora da célula, tornando o ambiente desfavorável à fisiologia do mesmo (Bañares et al. 2019). Como descrito anteriormente no caso do ácido acético, o ácido xilônico em alta concentração no meio também apresenta a propriedade de se difundir facilmente pela membrana plasmática e se dissociar no citosol, liberando prótons e ânions, diminuindo drasticamente o pH intracelular e assim causando prejuízos à

viabilidade celular e à atividade catalítica da XDH tanto em bactérias (Warnecke e Gill 2005; Kanjee e Houry 2013) quanto em leveduras (Toivari et al. 2012; 2013). Uma das estratégias desenvolvidas em *E. coli* para controlar o efeito da acidificação do meio intracelular pelo acúmulo de ácido xilônico no meio foi a utilização de sensores moleculares capazes de cessar temporariamente a expressão de XDH uma vez que haja queda no pH (Bañares et al. 2020).

#### **1.4. A levedura *Komagataella phaffii***

*K. phaffii* é uma levedura metilotrófica, portanto capaz de assimilar metanol como fonte de carbono. Na via de utilização de metanol, este é oxidado a formaldeído e peróxido de hidrogênio nos peroxissomos pela ação de álcool oxidase (AOX), que em *K. phaffii* é codificada por *AOX1* e *AOX2* (Cregg et al. 1989). A molécula de peróxido de hidrogênio é separada em água e oxigênio por ação da catalase e o formaldeído pode ser direcionado a duas diferentes vias, sendo decomposto em ácido fórmico e gás carbônico ou condensado à xilulose-5-fosfato dando origem a diidroxiacetona e gliceraldeído-3-fosfato, que serão metabolizados no citosol (Bernauer et al. 2021). *K. phaffii* foi descrita pela primeira vez em 1920 como *Zygosaccharomyces pastori* (Guilliermond 1920) e renomeada *Pichia pastoris* três décadas depois por Phaff et al. (1965). A descoberta da alta expressão de genes induzidos por metanol, como *AOX1* (aldeído oxidase), possibilitou o design de sistemas de expressão regulados por esse composto ainda na década de 1980 (Cregg et al. 1985). Somente em 1995 a então *Pichia pastoris* foi reclassificada ao gênero *Komagataella* (Yamada et al. 1995) que hoje totaliza sete espécies descritas: *K. phaffii*, *K. pastoris*, *K. ulmi*, *K. kurtzmanii*, *K. mondaviorum*, *K. populi* e *K. pseudopastoris* (Naumov et al. 2018).

A levedura *K. phaffii* recebeu bastante atenção nas últimas décadas devido à variedade de fontes de carbono que consegue assimilar, sendo atualmente utilizada no campo da engenharia metabólica e para a expressão de enzimas heterólogas (Macauley-Patrick et al. 2005; Peña et al. 2018) e mais recentemente para produtos químicos a partir de glicerol (Melo et al. 2020; Fina et al. 2021), glicose (Siripong et al. 2018; Yang e Zhang 2018), metanol (Yamada et al. 2019; Guo et al. 2021) e xilose (Ramos et al. 2021; Louie et al. 2021). Diversos promotores responsivos a glicose, glicerol e metanol são ferramentas na expressão heteróloga em *K. phaffii* (Prieholfer et al. 2017), com destaque para o promotor constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ( $P_{GAP}$ ) que é um dos

mais utilizados em *Komagataella* (Vogl e Glieder 2013) e permite alto nível de expressão gênica em glicose, glicerol, metanol e ácido oleico como fonte de carbono (Waterham et al. 1997).

Entre as vantagens da utilização de *K. phaffii* em aplicações biotecnológicas a partir da biomassa lignocelulósica estão a sua capacidade de crescer em baixo pH (~3.0) (Macauley-Patrick et al. 2005) e assim manter atividade metabólica na presença de hidrolisado lignocelulósico, tolerando até 6 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético (Paes et al. 2021). Além disso, a levedura *K. phaffii* é capaz de atingir alta produção de biomassa (>100 g.L<sup>-1</sup>) mesmo expressando genes heterólogos (Liu et al. 2019b), o que pode facilitar a obtenção de altas densidades celulares para processos fermentativos.

Outra característica de *K. phaffii* é que, diferentemente de *S. cerevisiae*, *K. phaffii* não é suscetível ao efeito "crabtree", fenômeno que acontece quando o excesso de glicose disponível direciona o metabolismo central de carbono da levedura para a fermentação alcoólica, mesmo em condição aeróbia (Hagman et al. 2014).

Neste trabalho, será avaliado se a superexpressão de Haa1 em *K. phaffii* é capaz de favorecer a tolerância da levedura à presença de ácido acético e hidrolisado lignocelulósico, dado o seu importante papel na regulação da resposta celular à presença de ácido acético em *S. cerevisiae*, bem como o efeito da superexpressão do fator de transcrição Haa1 sobre a produção de ácido xilônico em linhagem recombinante de *K. phaffii*, visto o potencial efeito tóxico do acúmulo de ácido xilônico no meio sobre organismos modificados para a produção desse composto.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Obter novas linhagens de *K. phaffii* com maior tolerância ao ácido acético presente em hidrolisado lignocelulósico para a produção de ácido xilônico

### **2.2. Objetivos específicos**

- 2.2.1. Avaliar o efeito da superexpressão homóloga do fator de transcrição Haa1 na tolerância de *K. phaffii* ao ácido acético
- 2.2.2. Avaliar o efeito da superexpressão homóloga do fator de transcrição Haa1 na produção de ácido xilônico em linhagem recombinante de *K. phaffii*

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Microrganismos**

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de levedura *Komagataella phaffii* X33 (Invitrogen). Para clonagem e propagação de DNA plasmidial foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen).

#### **3.2. Meios de cultura e soluções**

##### **3.2.1. Meio LB (Luria-Bertani) low salt**

0,5% (p/v) Cloreto de Sódio (NaCl)

0,5% (p/v) Extrato de Levedura

1% (p/v) Triptona

pH ajustado para 7,5 com NaOH

2% (p/v) Ágar Bacteriológico em caso de meio sólido

Suplementação com zeocina para 25 µg/mL quando necessário

##### **3.2.2. Meio YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose)**

1% (p/v) de Extrato de Levedura

2% (p/v) de Peptona

2% (p/v) de D-glicose

2% (p/v) de Ágar Bacteriológico em caso de meio sólido

Suplementação com zeocina para 100 µg/mL quando necessário

Suplementação com geneticina para 200 µg/mL quando necessário

### 3.2.3. Meio YPDS (Yeast Extract-Peptone-D-Sorbitol)

1% (p/v) de Extrato de Levedura

2% (p/v) de Peptona

2% (p/v) de D-glicose

1 M de Sorbitol

2% (p/v) de Ágar Bacteriológico em caso de meio sólido

Suplementação com zeocina para 100 ou 200 µg/mL quando necessário

### 3.2.4. Meio mineral FM22

4,29% (p/v) de Fosfato de Potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

1,43% (p/v) de Sulfato de Potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ )

1,17% (p/v) de Sulfato de Magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

0,5% (p/v) de Sulfato de Amônio ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

0,2% (p/v) de Cloreto de Cálcio diidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

4,35 mL/L Solução de elementos-traços para FM22

### 3.2.5. Solução de elementos-traços para FM22

2,2% (p/v) de Sulfato de Ferro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

0,7% (p/v) de Cloreto de Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ )

0,2% (p/v) de Sulfato de Cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

0,3% (p/v) de Sulfato de Manganês monoidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

0,05% (p/v) de Sulfato de Cálcio diidratado ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

0,05% (p/v) de Cloreto de Cobalto hexahidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

0,02% (p/v) de Molibdato de Sódio diidratado ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )

0,02% (p/v) de Biotina

0,01% (p/v) de Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

0,008% (p/v) de Iodeto de Sódio (NaI)

0,002% (p/v) de Ácido Bórico ( $H_3BO_3$ )

3.2.6. Tampão Hidrogenoftalato de Potássio

25,5 g de Hidrogenoftalato de Potássio ( $C_8H_5KO_4$ )

5,5 g de Hidróxido de Potássio (KOH)

Completar com dH<sub>2</sub>O para volume final de 500 mL

pH ajustado para 5,5 com 1 M NaOH

3.2.7. Solução Acetato de Sódio 3M

12,305 g de Acetato de Sódio ( $NaO_2CCH_3$ )

Completar com dH<sub>2</sub>O para volume final de 50 mL

3.2.8. Tampão de Corrida SB (Borato de sódio) 20X

0,8 g de NaOH

4,5 g de  $H_3BO_3$

Completar com dH<sub>2</sub>O para volume final de 1 L

pH ajustado para 8,0 com 1 M NaOH

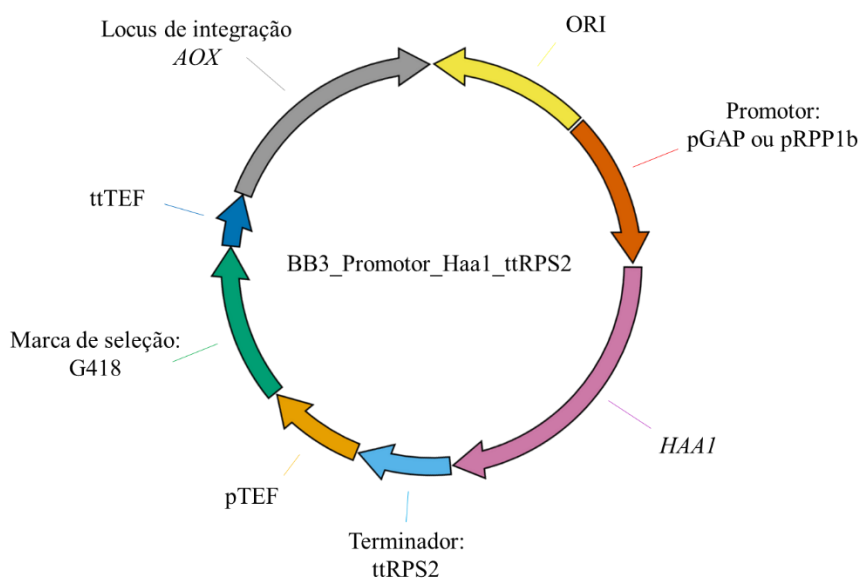


### 3.3. Avaliação da superexpressão do fator Haa1 em *K. phaffii*

Foi avaliado o desempenho de *K. phaffii* X33 sob a superexpressão do fator de transcrição Haa1 sob a regulação de dois promotores constitutivos diferentes – P<sub>GAP</sub> e P<sub>RPP1b</sub> – na presença de ácido acético e hidrolisado lignocelulósico.

#### 3.3.1. Construção das linhagens de *K. phaffii* superexpressando o fator Haa1

A construção das linhagens de *K. phaffii* X33 superexpressando o gene *HAA1* foi realizada por Paes, B. G. (2021). A sequência de aminoácidos correspondente ao gene *HAA1* em *S. cerevisiae* foi alinhada com o genoma de *K. phaffii* CBS 7435 (*Genome ID*: NCBI:txid 981350) e o gene PP7435\_Chr3-0991 foi selecionado para amplificação. A sequência amplificada e arranjada em plasmídeo BB3 (Figura 9) por *Golden Gate Assembly* sob controle de dois promotores diferentes – P<sub>GAP</sub> ou P<sub>RPP1b</sub> – para a análise de dois diferentes níveis de expressão. As linhagens obtidas estão nomeadas neste trabalho como descrito na Tabela 4.



**Figura 9. Plasmídeo para superexpressão de Haa1 em *K. phaffii*.** O gene *HAA1* (1567 pb) foi inserido no vetor GoldenPiCS BB3 (2931 pb) sob controle dos promotores P<sub>GAP</sub> (493 pb) ou P<sub>RPP1b</sub> (994 pb) e terminador ttRPS2 (472 pb). Adaptado de Paes, B. G. (2021).

**Tabela 4. Linhagens de *K. phaffii* utilizadas neste trabalho.**

<b>Linhagem</b>	<b>Vetor de superexpressão</b>	<b>Referência</b>
X33	-	-
X33-P <sub>GAP</sub> -Haa1	BB3_pGAP_HAA1_ttRPS2	Paes, B. G. (2021)
X33-P <sub>RPP1b</sub> -Haa1	BB3_pRPP1b_HAA1_ttRPS2	Paes, B. G. (2021)
X33-XDH-HL	pGAPZB_XDH-HL_ttAOX1	Ramos et al. (2021)
X33-XDH-Haa1	BB3_pRPP1b_HAA1_ttRPS2 e pGAPZB_XDH-HL_ttAOX1	Este trabalho

### **3.3.2. Avaliação do efeito da superexpressão do fator Haa1 em *K. phaffii* na presença de ácido acético**

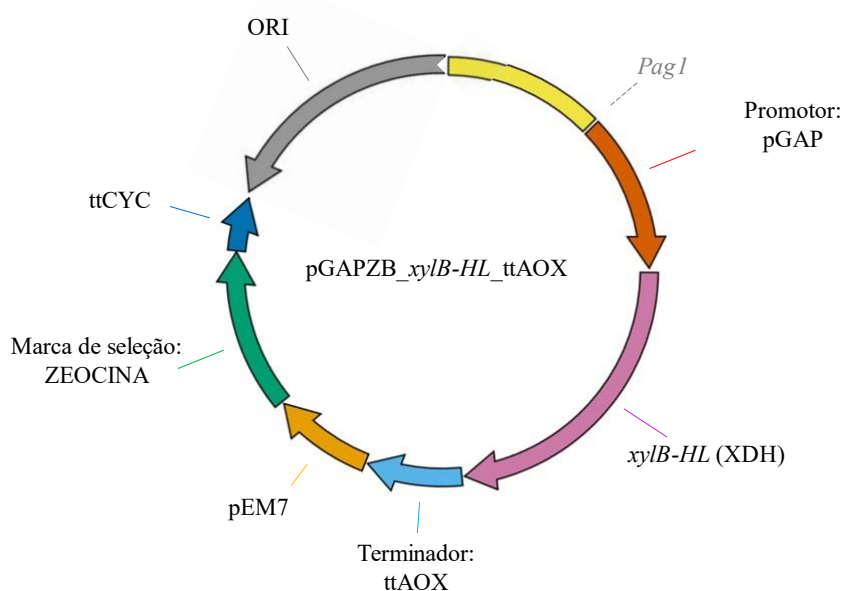
Células das linhagens de *K. phaffii* X33, X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1 e X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1 (Tabela 4) foram recuperadas em meio sólido seletivo YPD contendo geneticina a 200 µg/mL e incubadas a 30 °C por 48 horas. Uma colônia de cada cultura foi inoculada em 5 mL de meio YDP em tubos estéreis de 50 mL e os inóculos foram incubados a 30 °C sob agitação de 200 rotações por minuto (rpm) por 16 horas. As células foram centrifugadas a 1500 x g por 1 minuto, lavadas com água destilada estéril e inoculadas em frascos do tipo Erlenmeyer de 1 L contendo 100 mL de meio YPD tamponado com solução tampão KPH pH 5,5. Os inóculos foram incubados novamente a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. As células foram centrifugadas a 1500 x g por 5 minutos, lavadas com água destilada estéril e inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de meio YPD tamponado com solução tampão KPH pH 5,5 e suplementado ou não com ácido acético nas concentrações de 2 g.L<sup>-1</sup>, 6 g.L<sup>-1</sup> e 10 g.L<sup>-1</sup>, para uma DO<sub>600nm</sub> inicial igual a 0,5. As culturas foram incubadas por 30 °C e 200 rpm por até 48 horas. Alíquotas de 1 mL foram coletadas para quantificação de DO<sub>600nm</sub> e metabólitos.

Para avaliar também o efeito da superexpressão de Haa1 em *K. phaffii* em maior densidade celular, um ensaio foi realizado nas mesmas condições, suplementado ou não com ácido acético nas concentrações de 2 g.L<sup>-1</sup>, 4 g.L<sup>-1</sup> e 6 g.L<sup>-1</sup> e as células foram

inoculadas para uma  $DO_{600nm}$  inicial igual a 5,0. As culturas foram incubadas a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 48 horas. Alíquotas de 1 mL foram coletadas para quantificação de  $DO_{600nm}$  e metabólitos.

### 3.4. Construção de linhagem de *K. phaffii* produtora de ácido xilônico superexpressando o fator de transcrição Haa1

A construção de linhagens de *K. phaffii* superexpressando o gene *HAA1* produtoras de ácido xilônico foi realizada através da adição de gene codificante para a enzima xilose desidrogenase (XDH) inserido em plasmídeo de expressão constitutiva pGAPZB (Figura 11), previamente descrito em Ramos et al. (2021).



**Figura 10. Plasmídeo para superexpressão de XDH em *K. phaffii*.** O gene *xylB-HL* (781 pb) foi inserido no vetor pGAPZB (3605 pb) sob controle do promotor pGAP (493 pb) e terminador ttAOX (340 pb).

#### 3.4.1. Propagação do vetor em *E. coli*

Para a obtenção de alto número de cópias dos plasmídeos, foi empregada a bactéria *E. coli* DH10B (*Invitrogen*). A transformação foi realizada a partir do protocolo de eletroporação de Maranhão (2016). Foram adicionados 150 ng do plasmídeo pGAPZB-XDH-HL (Ramos et al. 2021) a células de *E. coli* eletrocompetentes e as misturas foram transferidas para cubetas de eletroporação de 0,1 cm (*Bio-Rad Laboratories*) previamente resfriadas em gelo. As cubetas foram então submetidas ao

choque no equipamento *Gene Pulser* (Bio-Rad Laboratories) com os parâmetros de 1800 V, 25  $\mu$ F e 200 Ohms. Imediatamente após o choque, foi adicionado 1 mL de meio LB *low salt* e a suspensão foi passada para microtubo de 1,5 mL e incubada a 37 °C por 60 minutos. Passado o tempo de incubação, as células foram plaqueadas em meio seletivo LB *low salt* contendo zeocina a 100  $\mu$ g/mL e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas.

### 3.4.2. Extração do DNA plasmidial

Colônias de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pGAPZB-XDH-HL foram transferidas para 5 mL de meio LB *low salt* contendo zeocina a 100  $\mu$ g/mL em tubos estéreis de 50 mL e incubadas a 37 °C sob agitação de 180 rpm 16 horas. Os plasmídeos foram extraídos por meio de mini preparação com o kit *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific) seguindo as recomendações do fabricante. A inserção do vetor nas células bacterianas foi confirmada por eletroforese. Colônias de *E. coli* carregando o vetor foram inoculadas novamente em meio LB *low salt* nas mesmas condições para repetir a extração de DNA plasmidial a fim de multiplicar a quantidade de material genético para a transformação em *K. phaffii*.

### 3.4.3. Linearização do DNA plasmidial

Para prosseguir com a transformação do vetor pGAPZB-XDH-HL em *K. phaffii*, uma alíquota de 12  $\mu$ g de DNA plasmidial extraído de *E. coli* foi linearizada com a enzima *PagI* (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante para um volume final de 60  $\mu$ L de reação (Tabela 5). A reação ocorreu por 16 horas a 37 °C seguida de 5 minutos a 80 °C para inativação da enzima. A linearização do DNA plasmidial foi confirmada por eletroforese.

**Tabela 5. Reagentes utilizados no preparo da digestão do vetor pGAPZB-XDH-HL.**

Reagente	Volume ( $\mu$ L)
DNA	8 (12 ng)
10X Buffer	6
Enzima <i>PagI</i>	2
Água Milli-Q	44

#### 3.4.4. Precipitação do DNA plasmidial

O DNA linearizado foi purificado pelo protocolo de precipitação por acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa) de Zeugin (1985). Foram adicionados ao conteúdo da reação 2,5 volumes de etanol 100% gelado e acetato de sódio para concentração final de 0,3 M. O conteúdo foi vertido duas vezes e incubado a -20 °C durante 16 horas. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e repetiu-se a centrifugação e o descarte do sobrenadante. Os pellets secaram naturalmente em temperatura ambiente por 5 horas e foram ressuspensos em 20 µL de água Milli-Q estéril para armazenamento a -20 °C.

#### 3.4.5. Transformação de pGAPZB-XDH-HL em *K. phaffii*

A transformação de *K. phaffii* foi realizada por protocolo de eletroporação adaptado a partir do manual *Invitrogen* (Catálogo n. V200-20, Rev. 28 Junho 2010). Células de *K. phaffii* X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haal foram recuperadas em meio sólido seletivo YPD contendo geneticina a 200 µg/mL e incubadas a 30 °C por 48 horas. Uma colônia foi inoculada em 5 mL de meio YPD e cultivada a 30 °C sob agitação de 180 rpm por 16 horas. As células foram baixadas por centrifugação a 1500 x g por 5 minutos, lavadas com água destilada estéril e inoculadas em frascos do tipo Erlenmeyer de 1 L contendo 100 mL de meio YPD fresco. A cultura foi incubada a 30 °C sob agitação de 180 rpm.

Quando o inóculo atingiu DO<sub>600nm</sub> = 1,3 as células foram baixadas por centrifugação a 1500 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 mL de água destilada estéril gelada. Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições e o descarte do sobrenadante. As células foram ressuspensas em 50 mL de água destilada estéril gelada. Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições e o descarte do sobrenadante. As células então foram ressuspensas em 8 mL de sorbitol 1M estéril gelado. Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições pela última vez e as células foram ressuspensas em 400 µL de sorbitol 1M estéril gelado.

Para a eletroporação, 80 µL de células foram adicionadas a cubetas de 0,2 cm (*Bio-Rad Laboratories*) previamente resfriadas em gelo, acrescidas de 350 µL de sorbitol 1M. Foram adicionados 20 µL de DNA (10 µg) linearizado e purificado e a mistura foi incubada por 5 minutos no gelo. As cubetas foram então submetidas ao choque no

equipamento *Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories)* com os parâmetros de 2000 V, 25  $\mu$ F e 200 Ohms. Imediatamente após o choque, 1mL de Sorbitol 1M gelado foi adicionado às cubetas. O conteúdo foi misturado lentamente com a pipeta e transferido para tubos estéreis de 15 mL. Os tubos foram incubados a 30 °C por 3 horas, sem agitação. Após esse período, alíquotas foram semeadas em meio sólido seletivo YPDS contendo zeocina na concentração final de 100  $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 72 horas.

#### **3.4.6. Confirmação da produção de ácido xilônico nas linhagens recombinantes de *K. phaffii* superexpressando o fator Haa1**

Catorze colônias de *K. phaffii* X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1 resultantes da transformação com o vetor pGAPZB-XDH-HL foram transferidas para meio sólido seletivo YPD contendo zeocina na concentração final de 200  $\mu$ g/mL e incubadas a 30 °C por 48 horas. Dessas, sete colônias foram transferidas para 10 mL de meio YNB suplementado com glicerol a 40 g.L<sup>-1</sup> e incubadas a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 24 horas. As células foram baixadas por centrifugação a 1500 g por 2 minutos e transferidas para 100 mL de meio YNB suplementado com glicerol a 40 g.L<sup>-1</sup> e incubados a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 24 horas. As células foram baixadas por centrifugação a 1500 x g por 5 minutos, lavadas com água destilada estéril e inoculadas em 30 mL de meio YNB suplementado com xilose a 40 g.L<sup>-1</sup> e glicerol a 2 g.L<sup>-1</sup> em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, para uma DO<sub>600nm</sub> inicial igual a 12. As culturas foram incubadas a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 48 horas. Alíquotas de 1 mL foram coletadas para quantificação de DO<sub>600nm</sub> e metabólitos.

#### **3.4.7. Avaliação do efeito da superexpressão de Haa1 em *K. phaffii* na produção de ácido xilônico**

Três linhagens de *K. phaffii* X33-XDH-Haa1 de maior produção de ácido xilônico foram selecionadas para novo ensaio em meio mineral FM22 (Stratton et al. 1998). Células de cada linhagem foram recuperadas em meio seletivo YPD e incubadas a 30 °C por 48 horas. Uma colônia de cada linhagem foi transferida para 10 mL de meio FM22 suplementado com glicerol a 40 g.L<sup>-1</sup> em tubos de 50 mL e os inóculos foram incubados sob agitação de 200 rpm por 24 horas. As células foram baixadas por centrifugação a 1500 g por 1 minuto, transferidas para 100 mL meio FM22 suplementado com glicerol a

40 g.L<sup>-1</sup> e incubadas a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 24 horas. As células foram baixadas por centrifugação a 1500 x g por 5 minutos, lavadas com água destilada estéril e inoculadas em 50 mL de meio FM22 suplementado com xilose a 40 g.L<sup>-1</sup> e glicerol a 2 g.L<sup>-1</sup> em frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL. As culturas foram incubadas a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 72 horas. Alíquotas de 1 mL foram coletadas para quantificação de DO<sub>600nm</sub> e metabólitos.

#### **3.4.8. Avaliação do efeito da superexpressão de Haa1 em *K. phaffii* na produção de ácido xilônico em biorreator**

Para investigar o efeito da superexpressão de Haa1 na produção de ácido xilônico em *K. phaffii*, a linhagem recombinante X33-XDH-Haa1 de maior produção de ácido xilônico foi selecionada para fermentação em biorreator e a linhagem X33-XDH-HL foi utilizada como controle negativo para a superexpressão de Haa1. Células das linhagens X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 foram recuperadas em meio sólido seletivo YPD contendo zeocina a 100 µg/mL para ambas e também geneticina a 200 µg/mL para a última. As células foram incubadas a 30 °C por 48 horas. Uma colônia de cada linhagem foi transferida para 10 mL de YPD em tubos do tipo falcon de 50 mL e os inóculos foram incubados a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. As células foram baixadas por centrifugação a 1500 g por 2 minutos e transferidas para 150 mL de YP suplementado com 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose em frascos do tipo Erlenmeyer de 1 L e os inóculos foram incubados a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 24 horas. As células foram baixadas por centrifugação a 1500 g por 5 minutos e transferidas para 300 mL meio FM22 suplementado com aproximadamente 80 g.L<sup>-1</sup> de xilose e glicose em biorreatores de 1 L. A fermentação correu por 136 horas a 30 °C com agitação de 500 rpm e fluxo de O<sub>2</sub> de 1,2 L/min. O pH foi mantido a 5,5 com adição automática de KOH 3M. Os reatores foram alimentados em três intervalos de oito horas (entre 40 h e 48 h, entre 64 h e 72 h e entre 88 h e 96 h) com 160 mL de solução de açúcares contendo aproximadamente 28 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 270 g.L<sup>-1</sup> de xilose. Alíquotas de 1 mL foram coletadas para quantificação de DO<sub>600nm</sub> e metabólitos.

### 3.4.9. Avaliação do efeito da superexpressão de Haa1 em *K. phaffii* na produção de ácido xilônico na presença de hidrolisado lignocelulósico

Para avaliar o efeito da superexpressão de Haa1 na produção de ácido xilônico em hidrolisado, a linhagem de *K. phaffii* X33-XDH-Haa1 foi cultivada em meio mineral FM22 com adição de hidrolisado lignocelulósico nas concentrações de 10% e 20% (v/v). A linhagem X33-XDH-HL foi utilizada como controle negativo para a superexpressão de Haa1. Células das linhagens X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 foram recuperadas em meio seletivo YPD contendo zeocina a 100 µg/mL para ambas e também geneticina a 200 µg/mL para a última. As células foram incubadas a 30 °C por 48 horas. Uma colônia de cada linhagem foi transferida para 10 mL de YPD em tubos do tipo falcon de 50 mL e os inóculos foram incubados a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 24 horas. As células foram baixadas por centrifugação a 1500 g por 2 minutos e transferidas para 150 mL de YPD em frascos do tipo Erlenmeyer de 1 L e os inóculos foram incubados a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 24 horas. As células foram baixadas por centrifugação a 1500 x g por 5 minutos e transferidas para 50 mL de meio FM22 suplementado com hidrolisado de bagaço e cana-de-açúcar para 10% e 20% (v/v). Os meios foram complementados com xilose e glicose a fim de que a concentração desses açúcares fosse a mesma no início do ensaio – 40 g.L<sup>-1</sup> e 10 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. As culturas foram incubadas a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 72 horas. Alíquotas de 1 mL foram coletadas para quantificação de DO<sub>600nm</sub> e metabólitos.

O hidrolisado lignocelulósico utilizado neste experimento foi obtido através de explosão a vapor de bagaço-de-cana, cuja fração líquida foi posteriormente submetida a hidrólise ácida com 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 130 °C, cedido à EMBRAPA Agroenergia pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). O conteúdo foi filtrado em gaze e posteriormente em membrana de celulose 0,22 µM e teve seu pH ajustado para 5,5 com adição de pellets de KOH antes de ser adicionado aos meios de cultura. A composição do hidrolisado sem diluição está descrita na tabela 6.

**Tabela 6. Composição do hidrolisado lignocelulósico utilizado neste trabalho.**

Glicose	Xilose	Ácido acético	Furfural	HMF
9 g.L <sup>-1</sup>	96 g.L <sup>-1</sup>	22 g.L <sup>-1</sup>	1,26 g.L <sup>-1</sup>	0,4 g.L <sup>-1</sup>



### **3.4.10. Avaliação do efeito da superexpressão de Haa1 em *K. phaffii* na produção de ácido xilônico na presença de hidrolisado lignocelulósico em biorreator**

Para avaliar o efeito da superexpressão de Haa1 na produção de ácido xilônico em hidrolisado em biorreator, as linhagens de *K. phaffii* X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 foram cultivadas em meio mineral FM22 com 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose como única fonte de carbono em reatores de 1 L. Após 20 horas, os reatores foram alimentados com 180 ml de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar adicionado de 20 mL de xilose totalizando 600 mL de cultura nos reatores com a presença de hidrolisado a 30% (v/v) e 40 g.L<sup>-1</sup> de xilose. A linhagem X33-XDH-HL foi utilizada como controle negativo para a superexpressão de Haa1. O hidrolisado utilizado foi o mesmo descrito no item (3.4.9) e preparado da mesma forma. A fermentação correu por 72 horas a 30 °C com agitação de 400 rpm e fluxo de O<sub>2</sub> de 0,8 L/min. O pH foi mantido a 5,5 com adição automática de KOH 3M. Alíquotas de 1 mL foram coletadas para quantificação de DO<sub>600nm</sub> e metabólitos.

### **3.4.11. Determinação de biomassa celular**

A determinação da produção de biomassa celular por densidade óptica foi feita por espectrofotômetro (*SpectraMax M2, Molecular Devices, USA*). Para quantificar a produção de biomassa celular em gramas, foram então separados 5 mL de cada frasco ao final dos experimentos, em duplicata, em tubos de 15 mL. O conteúdo foi centrifugado a 4000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com água destilada e centrifugadas novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de água destilada e transferidas para tubos de ensaio de vidro previamente pesados. Os tubos foram condicionados em estufa a 60 °C por sete dias para obtenção de peso seco celular.

As células secas foram pesadas em balança de precisão e a média dos valores em duplicata (X) foi usada nas Equações 1 e 2, a seguir:

$$(1) PS_{1mL} = X / 5$$

PS<sub>1mL</sub> = Peso seco de 1 mL de células;

X = Peso seco de 5 mL de células.

$$(2) FC = PS_{1mL} / DO_F$$

FC = Fator de conversão de  $DO_{600nm}$  para massa seca em  $g.L^{-1}$ ;

$DO_F$  =  $DO_{600nm}$  final obtida.

Logo, para os valores obtidos de  $DO_{600nm}$  durante os experimentos, a biomassa de células foi determinada pela Equação 3:

$$(3) B_{CEL} = DO_F \cdot FC$$

$B_{CEL}$  = Biomassa celular, em g/L.

#### 3.4.12. Quantificação de metabólitos

Glicose, xilose, ácido acético, furfural, HMF e ácido xilônico extracelular foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC-UPLC) a partir das amostras coletadas em diferentes períodos durante os experimentos. Todas as alíquotas foram centrifugadas a  $14000 \times g$  por 15 minutos e o sobrenadante foi diluído em água milliQ estéril. Os compostos glicose, xilose, glicerol, ácido acético, furfural e HMF foram analisados por cromatógrafo líquido de alta eficiência (*HPLC Infinity, Agilent Technologies*) equipado com detector de Índice de Refração (RID) e coluna HPX 87H (*Bio-Rad Laboratories*) em fase móvel de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 5 mM com fluxo de 0,6 mL por minuto. O composto ácido xilônico foi analisado por cromatógrafo líquido de alta eficiência (*Acquity UPLC H-Class, Waters*) equipado com detector *Photodiode Array* (PDA) e coluna C18 HSS T3 aquecida, em fase móvel de tampão fosfato de potássio ( $KH_2PO_4$ ) a 10 mM pH 2 e metanol 100 % com fluxo de 0,3 mL por minuto. As concentrações foram determinadas por comparação com o espectro obtido em curva-padrão.

## 4. Resultados

### 4.1. Desempenho de *K. phaffii* superexpressando Haa1 na presença de ácido acético

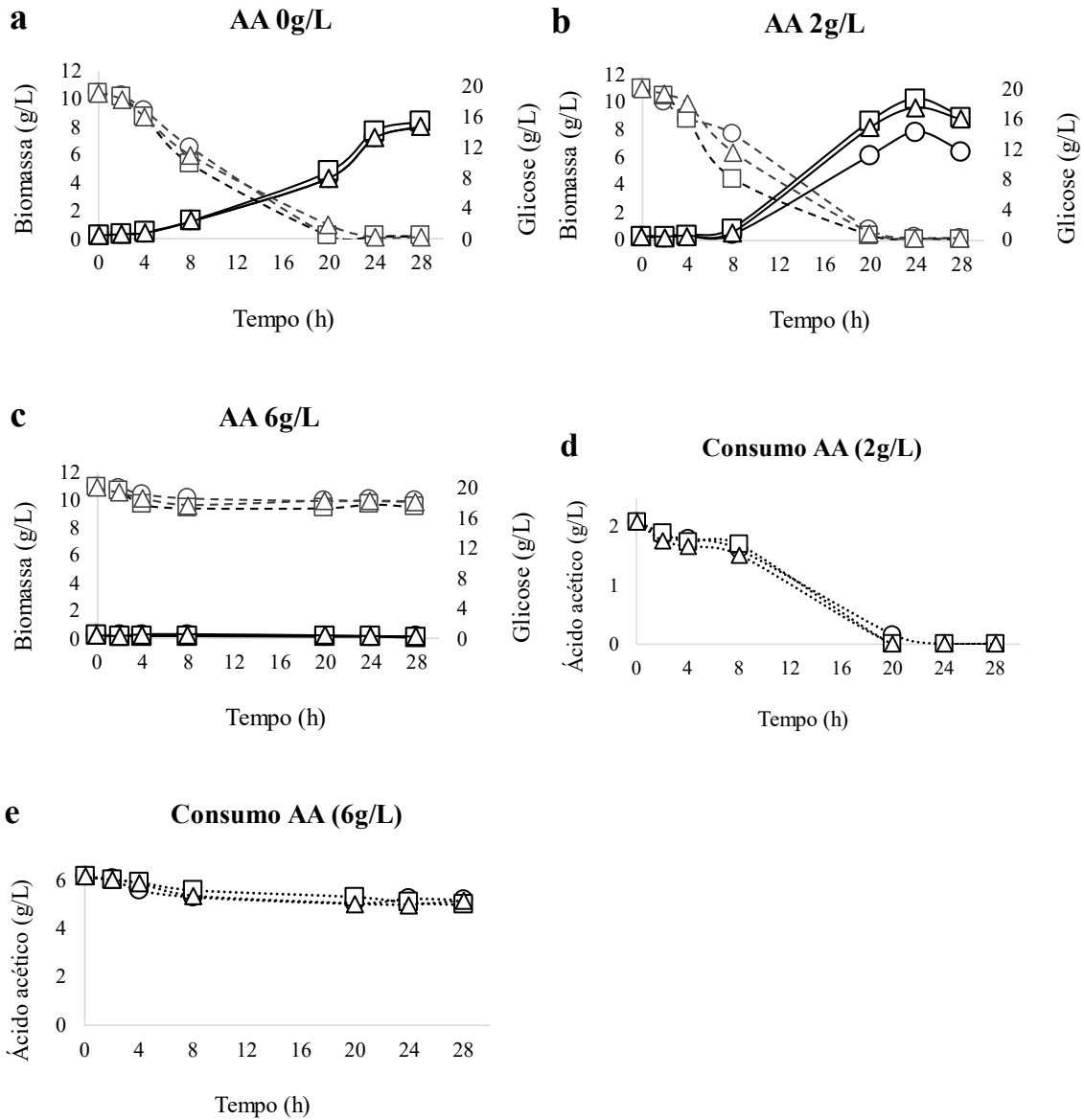
Para avaliar o efeito da superexpressão do fator de transcrição Haa1 em *K. phaffii* em ácido acético, linhagens de *K. phaffii* X33 superexpressando o gene *HAA1* sob controle dos promotores pRPP1b (X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1) e pGAP (X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1) foram cultivadas na presença de ácido acético nas concentrações de 0 g.L<sup>-1</sup>, 2 g.L<sup>-1</sup>, 6 g.L<sup>-1</sup> e 10 g.L<sup>-1</sup> em meio YPD pH 5,5 tamponado, em duplicata.

Na ausência do inibidor (Figura 11 a), as três linhagens apresentaram o mesmo perfil de crescimento, produzindo em torno de 8 g.L<sup>-1</sup> de biomassa em 28 horas. Na presença de ácido acético a 2 g.L<sup>-1</sup> (Figura 11 b), a produção de biomassa das linhagens sofreu uma redução nas primeiras horas, principalmente a linhagem X33, que em oito horas havia produzido apenas 25% da biomassa produzida na ausência de inibidor (de 1,37 g.L<sup>-1</sup> para 0,35 g.L<sup>-1</sup>). Já a linhagem X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1 teve a melhor adaptação nessa condição, produzindo 45% da biomassa (de 1,08 g.L<sup>-1</sup> para 0,49 g.L<sup>-1</sup>) em comparação à ausência de inibidor, dentro desse mesmo intervalo de tempo (Tabela 7).

Após 20 horas, praticamente toda a glicose do meio havia sido consumida por todas as linhagens (Figura 11 b), assim como o ácido acético (Figura 11 d), consumido em 84% do total presente no meio pela linhagem X33, em 87% pela linhagem X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1 e em 91% pela linhagem X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1. A produção máxima de biomassa na presença de ácido acético a 2 g.L<sup>-1</sup> foi semelhante ao controle, com uma média de 8,07 g.L<sup>-1</sup>, 7,72 g.L<sup>-1</sup> e 7,37 g.L<sup>-1</sup> na ausência de inibidor, e 7,09 g.L<sup>-1</sup>, 8,80g.L<sup>-1</sup> e 8,23 g.L<sup>-1</sup> para X33, X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1 e X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1, respectivamente, após 24 horas (Tabela 8).

Na concentração de 6 g.L<sup>-1</sup>, o ácido acético teve grande efeito inibitório sobre *K. phaffii*, mesmo sob a superexpressão do fator Haa1. Ao final do ensaio, o consumo máximo de glicose nessa condição foi de apenas 1,62 ± 0,20 g.L<sup>-1</sup> para X33, 2,25 ± 0,52 g.L<sup>-1</sup> para X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1 e 1,68 ± 0,43 g.L<sup>-1</sup> para X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1 (Figura 11 c), e o consumo máximo de ácido acético foi de apenas 1,21 ± 0,37 g.L<sup>-1</sup> para X33, 1,33 ± 0,25 g.L<sup>-1</sup> para X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1 e 1,30 ± 0,43 g.L<sup>-1</sup> para X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1 (Figura 11 e). A

produção de biomassa das linhagens de *K. phaffii* sob  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido acético atingiu o seu máximo após oito horas, não ultrapassando  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ , e decresceu em diante. Na presença de ácido acético a  $10 \text{ g.L}^{-1}$  (dados não exibidos), não houve produção de biomassa ou consumo de glicose e ácido acético.



**Figura 11. Perfil das linhagens de *K. phaffii* superexpressando Haa1 na presença de ácido acético a  $0 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $6 \text{ g.L}^{-1}$ . A produção de biomassa (linhas sólidas), o consumo de glicose (linhas tracejadas) e o consumo de ácido acético (linhas pontilhadas) das linhagens X33 (círculos), X33-PRP1b-Haa1 (quadrados) e X33-PGAP-Haa1 (triângulos) estão representadas em  $\text{g.L}^{-1}$ . **A:** ensaio em meio controle sem ácido acético; **B:** ensaio em ácido acético a  $2 \text{ g.L}^{-1}$ ; **C:** ensaio em ácido acético a  $6 \text{ g.L}^{-1}$ ; **D:** consumo de ácido acético no ensaio a  $2 \text{ g.L}^{-1}$ ; **E:** consumo de ácido acético no ensaio a  $6 \text{ g.L}^{-1}$ . Os valores representam uma de duas replicatas.**

**Tabela 7. Média da produção de biomassa, consumo de açúcar e consumo de ácido acético pelas linhagens de *K. phaffii* cultivadas em ácido acético a 0 g.L<sup>-1</sup> e 2 g.L<sup>-1</sup> após 8 horas.** Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de duas replicatas.

Concentração do inibidor	Produção de Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )			Consumo de glicose (g.L <sup>-1</sup> )			Consumo de ácido acético (g.L <sup>-1</sup> )		
	X33	X33 P <sub>RPP1b-Haa1</sub>	X33 P <sub>GAP-Haa1</sub>	X33	X33 P <sub>RPP1b-Haa1</sub>	X33 P <sub>GAP-Haa1</sub>	X33	X33 P <sub>RPP1b-Haa1</sub>	X33 P <sub>GAP-Haa1</sub>
AA 0 g.L <sup>-1</sup>	1,37 ± 0,89	1,08 ± 0,03	0,99 ± 0,04	7,20 ± 0,49	9,38 ± 0,75	8,23 ± 1,14	n.d.	n.d.	n.d.
AA 2 g.L <sup>-1</sup>	0,35 ± 0,27	0,49 ± 0,18	0,34 ± 0,05	5,54 ± 0,72	10,47 ± 2,15	9,73 ± 1,84	0,41 ± 0,10	0,46 ± 0,09	0,43 ± 0,20

**Tabela 8. Média da produção de biomassa, consumo de açúcar e consumo de ácido acético pelas linhagens de *K. phaffii* cultivadas em ácido acético a 0 g.L<sup>-1</sup> e 2 g.L<sup>-1</sup> após 24 horas.** Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de duas replicatas.

Concentração do inibidor	Produção de Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )			Consumo de glicose (g.L <sup>-1</sup> )			Consumo de ácido acético (g.L <sup>-1</sup> )		
	X33	X33 P <sub>RPP1b-Haa1</sub>	X33 P <sub>GAP-Haa1</sub>	X33	X33 P <sub>RPP1b-Haa1</sub>	X33 P <sub>GAP-Haa1</sub>	X33	X33 P <sub>RPP1b-Haa1</sub>	X33 P <sub>GAP-Haa1</sub>
AA 0 g.L <sup>-1</sup>	4,72 ± 0,89	4,82 ± 0,34	4,47 ± 0,52	18,79 ± 0,03	18,79 ± 0,01	18,96 ± 0,05	n.d.	n.d.	n.d.
AA 2 g.L <sup>-1</sup>	5,52 ± 0,50	7,08 ± 1,83	6,28 ± 1,59	19,31 ± 0,50	19,66 ± 0,13	19,51 ± 0,48	1,78 ± 0,23	1,92 ± 0,26	1,82 ± 0,39

A fim de avaliar o efeito da densidade celular na resposta fisiológica das linhagens de *K. phaffii*, um novo ensaio foi realizado com uma densidade celular inicial dez vezes maior que o ensaio anterior ( $DO_{600nm} = 5,0$ ) na presença de ácido acético nas concentrações de 0 g.L<sup>-1</sup>, 2 g.L<sup>-1</sup>, 4 g.L<sup>-1</sup> e 6 g.L<sup>-1</sup> em meio YPD tamponado com KHP para o pH de 5,5, em duplicata. As culturas foram cultivadas nas mesmas condições de 30 °C e 200 rpm por 48 horas.

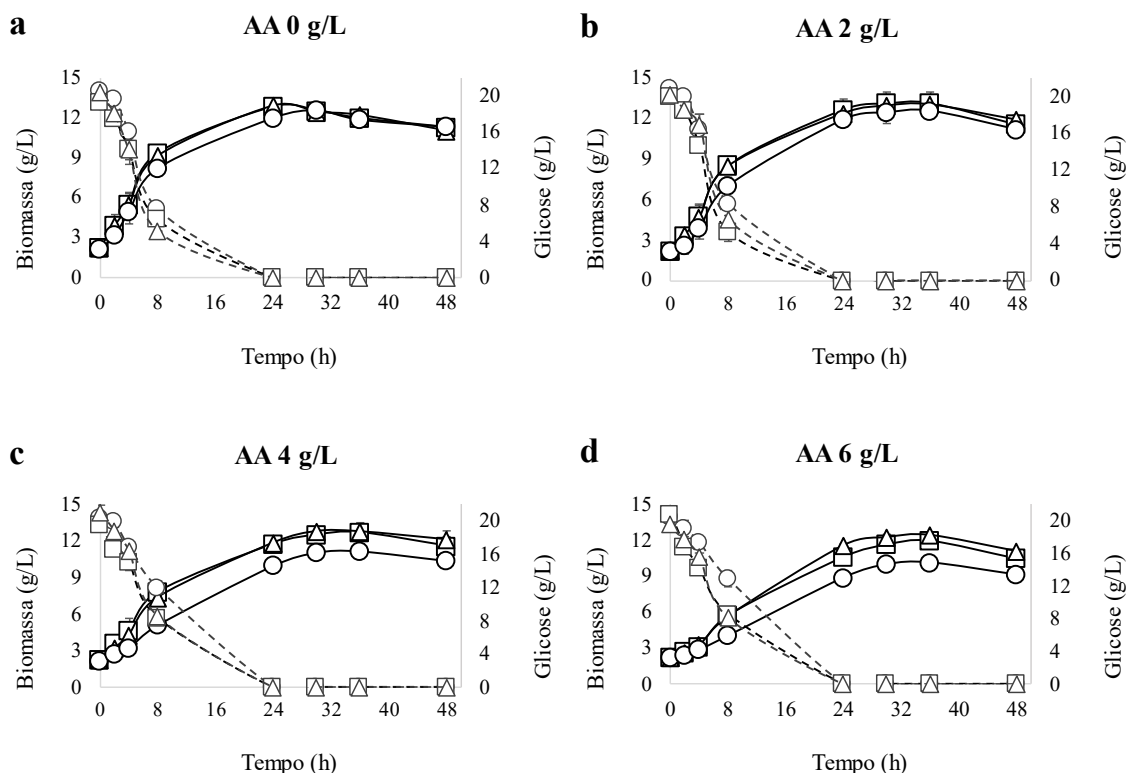
Todas as linhagens de *K. phaffii* foram capazes de crescer e consumir todo o ácido acético presente no meio em todas as suas concentrações (Figura 12). O desempenho das linhagens de *K. phaffii* avaliadas sob a presença de ácido acético a 2 g.L<sup>-1</sup> (Figura 12 b) foi semelhante ao observado na ausência de inibidor. Uma pequena redução na produção de biomassa da linhagem X33 foi observada nas primeiras horas de cultivo – de 6,07 g.L<sup>-1</sup> para 4,87 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 9) . Nenhum efeito inibitório foi observado sobre o consumo de açúcar e o crescimento celular de X33-P<sub>RPPIb</sub>-Haa1 e X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1. Após o período de adaptação da linhagem X33, o crescimento foi retomado de modo que todas as linhagens alcançaram uma produção final de biomassa bastante próxima em 24 horas.

Na presença de ácido acético a 4 g.L<sup>-1</sup>, (Figura 12 c) a biomassa produzida pela linhagem X33 sofreu uma redução maior, caindo de uma média de 6,07 g.L<sup>-1</sup> – na ausência de inibidor – para apenas 2,92 g.L<sup>-1</sup>. Esse valor representa uma redução de cerca de 50% em comparação à ausência de inibidor. Já as linhagens superexpressando o fator Haa1 sofreram redução abaixo de 25% sob as mesmas condições – de 7,12 g.L<sup>-1</sup> para 5,57 g.L<sup>-1</sup> em X33-P<sub>RPPIb</sub>-Haa1 e de 6,91 g.L<sup>-1</sup> para 5,13 g.L<sup>-1</sup> em X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1. A produção de biomassa das linhagens X33-P<sub>RPPIb</sub>-Haa1 e X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1 manteve-se praticamente idêntica entre si e cerca de 15% maior em relação à linhagem X33 até o final do ensaio, às 48 horas (Figura 12 c).

Na presença de ácido acético a 6 g.L<sup>-1</sup> (Figura 12 d), a média da produção de biomassa de *K. phaffii* nas primeiras oito horas de crescimento sofreu grande redução se comparada à ausência de inibidor (de 6,07 g.L<sup>-1</sup> para 1,84 g.L<sup>-1</sup>), enquanto das linhagens X33-P<sub>RPPIb</sub>-Haa1 e X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1 novamente manteve-se bastante próxima entre si e cerca de 20% maior em relação à linhagem X33 até o final do ensaio, das 24 horas às 48 horas (Figura 12 d).

As três linhagens de *K. phaffii* atingiram uma biomassa final de cerca de 11 g.L<sup>-1</sup> sob 0 g.L<sup>-1</sup> e 2 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético. Na presença de ácido acético a 4 g.L<sup>-1</sup> e 6 g.L<sup>-1</sup> a

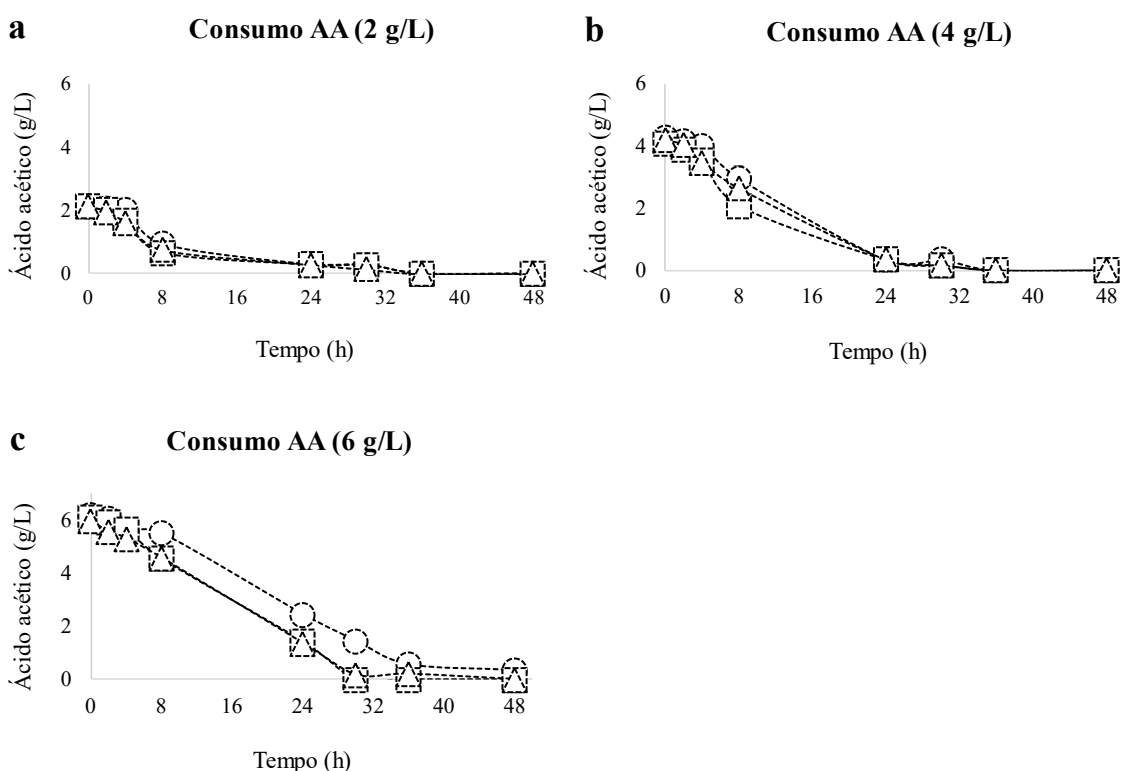
biomassa final de *K. phaffii* X33 foi de  $10,34 + 0,22 \text{ g.L}^{-1}$  e  $9,10 + 0,90 \text{ g.L}^{-1}$  sem a superexpressão do fator Haa1. Já a biomassa final produzida pelas linhagens X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1 e X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1 foi de  $11,55 + 0,63 \text{ g.L}^{-1}$  e  $12,07 + 0,65 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de ácido acético a  $4 \text{ g.L}^{-1}$ , e  $10,45 + 0,98 \text{ g.L}^{-1}$  e  $11,06 + 0,34 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de ácido acético a  $6 \text{ g.L}^{-1}$ .



**Figura 12. Perfil das linhagens de *K. phaffii* superexpressando Haa1 na presença de ácido acético a  $0 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $2 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $4 \text{ g.L}^{-1}$  e  $6 \text{ g.L}^{-1}$ .** A produção de biomassa (linhas sólidas) e o consumo de glicose (linhas tracejadas) das linhagens de *K. phaffii* X33 (círculos), X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1 (quadrados) e X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1 (triângulos) estão representadas em  $\text{g.L}^{-1}$ . **A:** ensaio em meio controle sem ácido acético; **B:** ensaio em ácido acético a  $2 \text{ g.L}^{-1}$ ; **C:** ensaio em ácido acético a  $4 \text{ g.L}^{-1}$ ; **D:** ensaio em ácido acético a  $6 \text{ g.L}^{-1}$ . Os valores representam a média de duas replicatas com o desvio padrão.

Na presença de ácido acético a  $2 \text{ g.L}^{-1}$ , seu consumo pela levedura foi praticamente idêntico por todas as linhagens de *K. phaffii* (Figura 13 a), enquanto na sua presença a  $4 \text{ g.L}^{-1}$ , esse consumo foi mais acelerado pelas linhagens superexpressando o fator Haa1 (Figura 13 b). Em apenas oito horas, X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1 já havia consumido uma média de  $1,41 \text{ g.L}^{-1}$  e X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1 havia consumido uma média de  $1,56 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto para X33 esse valor foi de apenas  $0,90 \text{ g.L}^{-1}$  (Tabela 9). Dentro de 24 horas, mais de 90% do ácido acético presente no meio foi consumido por todas as linhagens.

Na presença de ácido acético a  $6 \text{ g/L}^{-1}$ , a média de consumo de ácido acético pelas linhagens superexpressando o fator Haa1 foi 50% maior ( $1,56 \text{ g.L}^{-1}$  para X33- $P_{RPP1b}$ -Haa1 e  $1,38 \text{ g.L}^{-1}$  para X33- $P_{GAP}$ -Haa1) em comparação à linhagem X33 ( $0,69 \text{ g.L}^{-1}$ ) nas primeiras horas de cultivo e se manteve pelo menos 20% maior até as 24 horas (Figura 13 c). Ao contrário do que foi observado na presença de ácido acético a  $4 \text{ g.L}^{-1}$ , as linhagens de *K. phaffii* precisaram de mais de 24 horas para consumir pelo menos  $5 \text{ g.L}^{-1}$  do inibidor presente no meio (Tabela 10), sendo que a linhagem X33 precisou de pelo menos 36 horas.



**Figura 13. Consumo de ácido acético pelas linhagens de *K. phaffii* superexpressando Haa1 na presença do inibidor a  $2 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $4 \text{ g.L}^{-1}$  e  $6 \text{ g.L}^{-1}$ . O consumo de ácido acético pelas linhagens X33 (círculos), X33- $P_{RPP1b}$ -Haa1 (quadrados) e X33- $P_{GAP}$ -Haa1 (triângulos) estão representadas em  $\text{g.L}^{-1}$ . **A:** ensaio em ácido acético a  $2 \text{ g.L}^{-1}$ ; **B:** ensaio em ácido acético a  $4 \text{ g.L}^{-1}$ ; **C:** ensaio em ácido acético a  $6 \text{ g.L}^{-1}$ . Os valores representam a média de duas replicatas com o desvio padrão.**



**Tabela 9. Média da produção de biomassa, consumo de açúcar e consumo de ácido acético pelas linhagens de *K. phaffii* cultivadas em ácido acético a 0 g.L<sup>-1</sup>, 2 g.L<sup>-1</sup>, 4 g.L<sup>-1</sup> e 6 g.L<sup>-1</sup> após 8 horas. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de duas replicatas.**

Concentração do inibidor	Produção de Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )			Consumo de glicose (g.L <sup>-1</sup> )			Consumo de ácido acético (g.L <sup>-1</sup> )		
	X33	X33	X33	X33	X33	X33	X33	X33	X33
		P <sub>RPP1b</sub> -Haa1	P <sub>GAP</sub> -Haa1		P <sub>RPP1b</sub> -Haa1	P <sub>GAP</sub> -Haa1		P <sub>RPP1b</sub> -Haa1	P <sub>GAP</sub> -Haa1
AA 0 g.L <sup>-1</sup>	6,07 ± 0,22	7,12 ± 0,34	6,91 ± 0,65	12,98 ± 0,54	12,83 ± 1,30	15,25 ± 0,04	n.d.	n.d.	n.d.
AA 2 g.L <sup>-1</sup>	4,87 ± 0,61	6,36 ± 0,55	6,27 ± 0,49	12,43 ± 0,31	14,59 ± 1,10	13,51 ± 2,06	1,21 ± 0,43	1,10 ± 0,06	1,38 ± 0,05
AA 4 g.L <sup>-1</sup>	2,92 ± 0,13	5,57 ± 0,12	5,13 ± 0,02	7,76 ± 0,90	11,15 ± 1,41	12,74 ± 1,50	0,90 ± 0,49	1,41 ± 0,09	1,56 ± 0,25
AA 6 g.L <sup>-1</sup>	1,84 ± 0,21	3,52 ± 0,07	3,45 ± 0,03	7,53 ± 0,69	12,24 ± 1,56	11,45 ± 1,38	0,69 ± 0,40	1,56 ± 0,38	1,38 ± 0,06

**Tabela 10. Média da produção de biomassa, consumo de açúcar e consumo de ácido acético pelas linhagens de *K. phaffii* cultivadas em ácido acético a 0 g.L<sup>-1</sup>, 2 g.L<sup>-1</sup>, 4 g.L<sup>-1</sup> e 6 g.L<sup>-1</sup> após 24 horas. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de duas replicatas.**

Concentração do inibidor	Produção de Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )			Consumo de glicose (g.L <sup>-1</sup> )			Consumo de ácido acético (g.L <sup>-1</sup> )		
	X33	X33	X33	X33	X33	X33	X33	X33	X33
		P <sub>RPP1b</sub> -Haa1	P <sub>GAP</sub> -Haa1		P <sub>RPP1b</sub> -Haa1	P <sub>GAP</sub> -Haa1		P <sub>RPP1b</sub> -Haa1	P <sub>GAP</sub> -Haa1
AA 0 g.L <sup>-1</sup>	9,84 ± 0,47	10,60 ± 0,13	10,68 ± 0,21	20,56 ± 0,47	19,23 ± 0,76	20,40 ± 0,00	n.d.	n.d.	n.d.
AA 2 g.L <sup>-1</sup>	9,75 ± 0,78	10,44 ± 0,68	10,17 ± 1,02	20,80 ± 0,01	19,91 ± 0,02	20,17 ± 0,29	1,86 ± 0,11	1,85 ± 0,05	1,85 ± 0,01
AA 4 g.L <sup>-1</sup>	7,78 ± 0,14	9,49 ± 0,13	9,59 ± 0,13	20,23 ± 0,17	19,47 ± 0,55	21,66 ± 0,90	3,93 ± 0,10	3,74 ± 0,05	3,78 ± 0,06
AA 6 g.L <sup>-1</sup>	6,67 ± 0,04	8,36 ± 0,27	9,31 ± 0,26	20,36 ± 0,59	20,73 ± 0,28	19,54 ± 0,08	3,74 ± 0,11	4,68 ± 0,28	4,60 ± 0,03

## **4.2. Efeito da superexpressão de Haa1 em *K. phaffii* na produção de ácido xilônico**

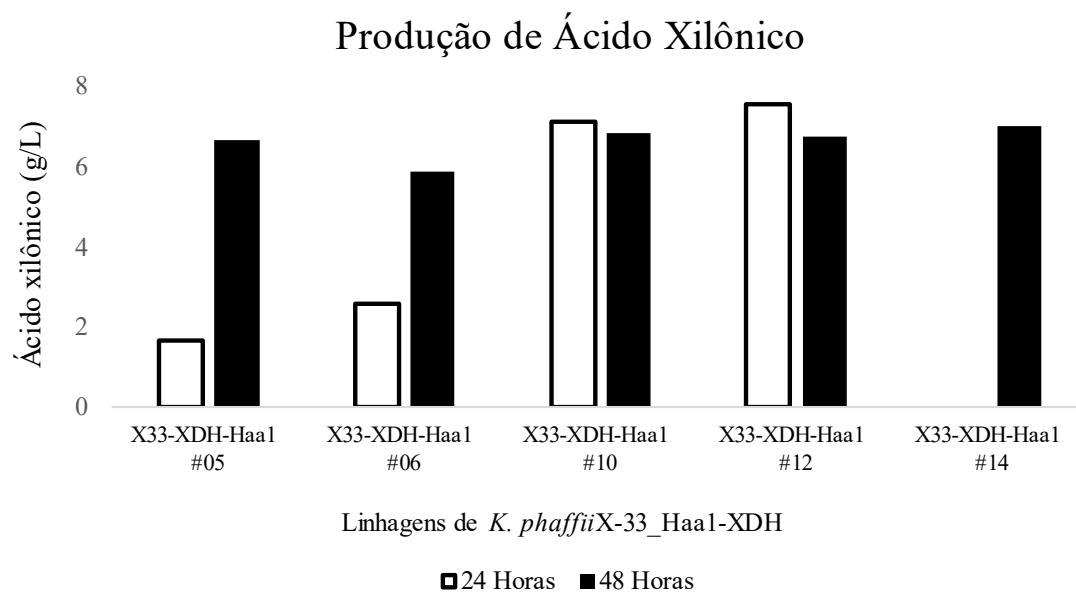
### **4.2.1. Construção de linhagens de *K. phaffii* produtoras de ácido xilônico superexpressando o fator de transcrição Haa1**

A construção de linhagens de *K. phaffii* superexpressando o fator Haa1 produtoras de ácido xilônico foi realizada através da adição do gene codificante para a enzima xilose desidrogenase (XDH-HL) caracterizado em Ramos et al. (2021) inserido no plasmídeo de expressão constitutiva pGAPZB. Para a obtenção de alto número de cópias do plasmídeo pGAPZB-XDH-HL, células de *E. coli* foram transformadas por protocolo de eletroporação. Após confirmação da inserção do vetor nas células bacterianas, seguiu-se com a multiplicação e preparação de DNA para a transformação em *K. phaffii*. A linearização do vetor pGAPZB-XDH-HL foi feita com a enzima *PagI* e confirmada por eletroforese. A transformação de *K. phaffii* foi realizada de acordo com protocolo de eletroporação e catorze clones foram selecionados em meio seletivo por resistência a zeocina e nomeados de #01 a #14.

Para avaliar o sucesso da recombinação das linhagens de *K. phaffii* X33-PRPP1b-Haa1 com o gene XDH-HL, sete linhagens resultantes da transformação foram cultivadas em 30 mL de meio YNB suplementado com xilose a 40 g.L<sup>-1</sup> e glicerol a 2 g.L<sup>-1</sup> em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL por 48 horas a 30 °C e 200 rpm. Foi possível confirmar a produção de ácido xilônico em cinco linhagens, sendo a produção final de aproximadamente 6 g.L<sup>-1</sup> comparável à produção obtida pela linhagem de *K. phaffii* X33-XDH-HL em Ramos et al. (2021).

### **4.2.2. Desempenho das linhagens de *K. phaffii* na produção de ácido xilônico**

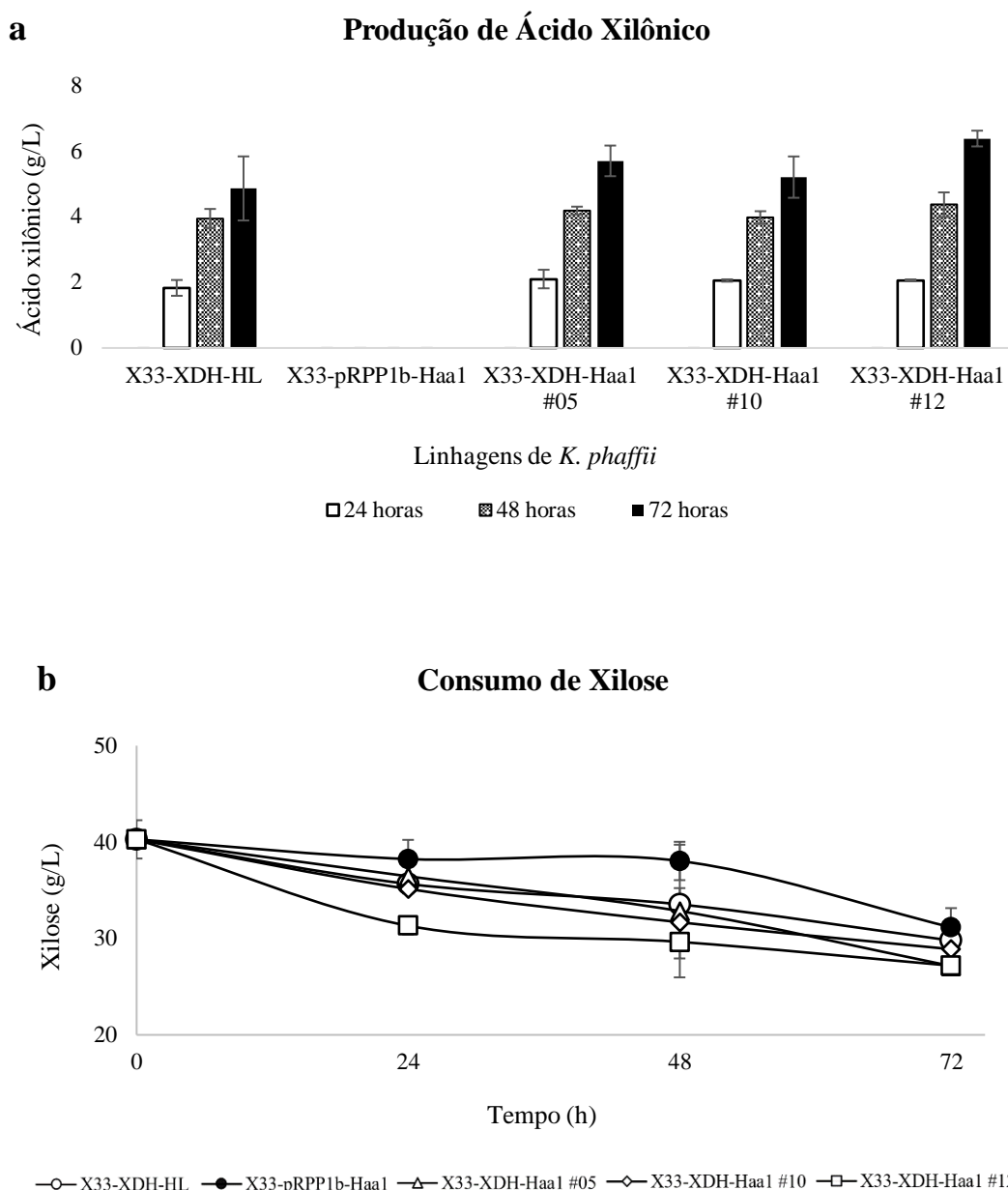
A partir da confirmação da produção de ácido xilônico em cinco linhagens, as três linhagens de maior produção de ácido xilônico (X33-XDH-Haa1#5, X33-XDH-Haa1#10 e X33-XDH-Haa1#12) e a linhagem X33-XDH-HL foram selecionadas para avaliação do efeito da superexpressão de Haa1 na produção de ácido xilônico em meio mineral. As linhagens foram cultivadas em 50 mL de FM22 suplementado com xilose a 40 g.L<sup>-1</sup> e glicerol a 2 g.L<sup>-1</sup> em frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL por 72 horas a 30 °C e 200 rpm.



**Figura 14. Produção de ácido xilônico pelas linhagens *K. phaffii* X33-XDH-Haa1 após 24 horas e 48 horas. Os valores estão indicados em g.L<sup>-1</sup>.**

A linhagem X33-XDH-HL foi utilizada como controle negativo para a superexpressão de Haa1. As linhagens de *K. phaffii* X33-XDH-Haa1 alcançaram uma produção de ácido xilônico satisfatória em relação à linhagem controle X33-XDH-HL, obtendo-se uma produção do composto em torno de 2 g.L<sup>-1</sup> após 24 horas, 4 g.L<sup>-1</sup> após 48 horas um valor final entre 5 e 6 g.L<sup>-1</sup> após 72 horas (Figura 15). A maior produção final de ácido xilônico foi observada na linhagem X33-XDH-Haa1#12, igual a 6,38 g.L<sup>-1</sup> após 72 horas e rendimento total de 0,49 g.g<sup>-1</sup> (Tabela 10). Esta linhagem, portanto, foi selecionada para os próximos experimentos.

A produção de ácido xilônico pelas linhagens de *K. phaffii* X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 foi semelhante em todos os intervalos de tempo avaliados (Figura 15 a), apesar de o consumo de xilose pela linhagem X33-XDH-HL ser um pouco maior dentro das primeiras 24 horas (Figura 15 b) indicando maior rendimento pelas linhagens superexpressando o fator Haa1 nesse intervalo. Em 24 horas, a média da produção de ácido xilônico foi de  $1,83 \pm 0,24$  g.L<sup>-1</sup> para X33-XDH-HL,  $2,1 \pm 0,28$  g.L<sup>-1</sup> para X33-XDH-Haa1#05,  $2,05 \pm 0,03$  g.L<sup>-1</sup> para X33-XDH-Haa1#10 e  $2,06 \pm 0,02$  g.L<sup>-1</sup> para X33-XDH-Haa1#12.



**Figura 15. Produção de ácido xilônico pelas linhagens *K. phaffii* X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 após 24, 48 e 72 horas. Os valores estão indicados em  $\text{g.L}^{-1}$  e representam a média de duas replicatas com o desvio padrão.**

Após 48 horas, a produção total de ácido xilônico duplicou em quase todas as linhagens, subindo para  $3,94 + 0,28 \text{ g.L}^{-1}$  em X33-XDH-HL,  $4,18 + 0,12 \text{ g.L}^{-1}$  em X33-XDH-Haa1#05,  $3,97 + 0,19 \text{ g.L}^{-1}$  em X33-XDH-Haa1#10 e  $4,36 + 0,37 \text{ g.L}^{-1}$  em X33-XDH-Haa1#12. Ao final de 72 horas, a produção total de ácido xilônico pela linhagem X33-XDH-HL foi a menor, com uma média de  $4,86 \text{ g.L}^{-1}$  para X33-XDH-HL, seguida de  $5,2 \text{ g.L}^{-1}$  para X33-XDH-Haa1#10,  $5,7 \text{ g.L}^{-1}$  para X33-XDH-Haa1#10 e finalmente  $6,38$

g.L<sup>-1</sup> para X33-XDH-Haa1#12 (Tabela 10), sendo esta última a linhagem de maior produção final e também o maior rendimento ao final de 72 horas.

**Tabela 11. Produção e rendimento de ácido xilônico pelas linhagens *K. phaffii* após 72 horas.**

<b>Linhagem</b>	<b>Produção</b> (g. L <sup>-1</sup> )	<b>Y<sub>AX/X</sub><sup>a</sup></b> (g.g <sup>-1</sup> )
X33-XDH-HL	4,86 ± 0,24	0,46 ± 0,08
X33-XDH-Haa1#05	5,70 ± 0,46	0,43 ± 0,05
X33-Haa1-XDH#10	5,20 ± 0,62	0,47 ± 0,14
X33-Haa1-XDH#12	6,38 ± 0,24	0,49 ± 0,01

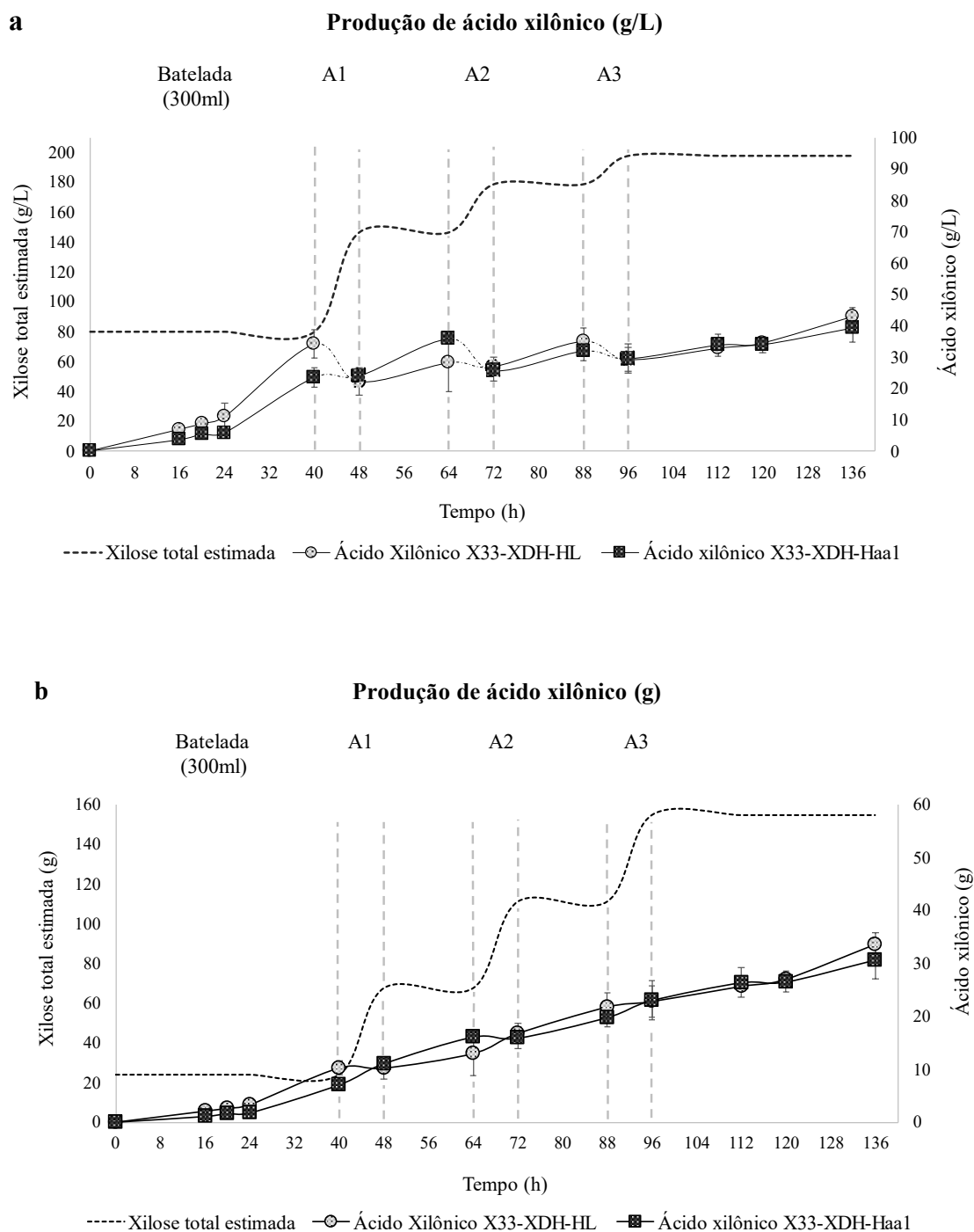
<sup>a</sup> O rendimento (Y) foi calculado dividindo-se a produção de ácido xilônico (AX), em gramas, pela quantidade de xilose consumida (X), em gramas, no intervalo de 0 a 72 horas.

#### **4.2.3. Desempenho das linhagens de *K. phaffii* na produção de ácido xilônico em biorreator**

Para avaliar o efeito da superexpressão de Haa1 na produção de ácido xilônico em *K. phaffii* em biorreator, as linhagens X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1#12 foram cultivadas em meio mineral FM22 com 80 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 80 g.L<sup>-1</sup> de xilose em reatores de 1 L. A fermentação correu por 136 horas a 30 °C com agitação de 500 rpm e fluxo de O<sub>2</sub> de 1,2 L/min. Os reatores foram alimentados em três intervalos de oito horas (entre 40h e 48h, entre 64h e 72h e entre 88h e 96h) com 160 mL de solução de açúcares a 0,02 L.h<sup>-1</sup>.

Ambas as linhagens consumiram completamente a glicose dentro das primeiras 24 horas, produzindo até 28 g.L<sup>-1</sup> de biomassa. Nesse período, a média da produção de ácido xilônico foi de 11 g.L<sup>-1</sup> por X33-XDH-HL e 5,81 g.L<sup>-1</sup> por X33-XDH-Haa1. Entre 24 e 40 horas, pós a depleção de glicose, a produção média de ácido xilônico de X33-XDH-HL subiu para 34,14 g.L<sup>-1</sup> e a de X33-XDH-Haa1 para 23,57 g.L<sup>-1</sup>, o que significa que em um intervalo de 16 horas, as linhagens de *K. phaffii* conseguiram produzir 23 g.L<sup>-1</sup> e 17 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo este o intervalo de maior produção observado (Figura 16 a). A cada alimentação realizada, foram adicionados cerca de 43 g de xilose e 4 g de

glicose em um volume de 160 mL. Dessa forma, a xilose total estimada oferecida às leveduras após a última alimentação foi de 154 g (Figura 16 b).



**Figura 16. Produção de ácido xilônico pelas linhagens de *K. phaffii* em meio mineral em biorreator. A:** produção de ácido xilônico (eixo principal) e xilose total estimada (eixo secundário), em  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . **B:** produção de ácido xilônico (eixo principal) e xilose total estimada (eixo secundário), em gramas. As fases da batelada alimentada estão representadas como Batelada, A1 (alimentação 1), A2 (alimentação 2) e A3 (alimentação 3) e indicadas pelas linhas verticais tracejadas. Os valores da produção de ácido xilônico representam a média de duas replicatas com o desvio padrão.

Após o período de 24 a 40 horas, onde a linhagem X33-XDH-HL manteve sua média de produção de ácido xilônico pelo menos 30% maior que a linhagem X33-XDH-Haa1 (11 g.L<sup>-1</sup> às 24h e 34,14 g.L<sup>-1</sup> às 40h comparado a 5,81 g.L<sup>-1</sup> às 24h e 23,57 g.L<sup>-1</sup> às 40h), a produção das linhagens apresentou pequenas variações, observadas às 64 horas (média de 28,22 g.L<sup>-1</sup> em X33-XDH-HL e de 35,8 g.L<sup>-1</sup> em X33-XDH-Haa1), às 88 horas (média de 35,08 g.L<sup>-1</sup> em X33-XDH-HL e de 31,94 g.L<sup>-1</sup> em X33-XDH-Haa1) e às 136 horas, quando a produção final total de ácido xilônico foi de 43,08 + 2,74 g.L<sup>-1</sup> por X33-XDH-HL e de 39,35 + 4,57 g.L<sup>-1</sup> por X33-XDH-Haa1 (Tabela 12).

Em 40 horas, uma média de produção de ácido xilônico igual a 34 g.L<sup>-1</sup> pela linhagem X33-XDH-HL (Tabela 12) representa cerca de 10 g de ácido xilônico, considerando o volume da cultura igual a 300 mL. Ao final da primeira alimentação, em 48 horas, o volume da cultura havia sido acrescido de 160 mL e a média da produção de ácido xilônico foi de 22,20 g.L<sup>-1</sup> pela linhagem X33-XDH-HL (Tabela 12), o que representa o mesmo total de 10 g de ácido xilônico em 460 mL de cultura (Figura 16 b). No mesmo intervalo de tempo, uma média de produção de 23,57 g.L<sup>-1</sup> de ácido xilônico pela linhagem X33-XDH-Haa1 representa cerca de 7 g do composto, considerando o volume da cultura igual a 300 mL. Ao final da primeira alimentação, em 48 horas, a média da produção de ácido xilônico pela linhagem X33-XDH-Haa1 foi de 24 g.L<sup>-1</sup>, o que representa um total de 11 g de ácido xilônico em 460 mL de cultura. Esses valores indicam que durante a primeira alimentação, a linhagem X33-XDH-HL teve sua produção de ácido xilônico inibida, enquanto a linhagem X33-XDH-Haa1 foi capaz de continuar produzindo o composto.

O inverso desse fenômeno foi observado durante a segunda alimentação. Em 64 horas, a média da produção de ácido xilônico pela linhagem X33-XDH-Haa1 igual a 35,80 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 12) representa cerca de 16 g de composto, considerando 460 mL de cultura. Ao final da segunda alimentação, em 72 horas, o volume da cultura havia sido acrescido de 160 mL e a média da produção de ácido xilônico pela linhagem X33-XDH-Haa1 foi de 25,65 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 12), o que representa o total de 15,90 g em 620 mL de cultura (Figura 16 b). A linhagem X33-XDH-HL havia produzido uma média de 28,22 g.L<sup>-1</sup> de ácido xilônico em 64 horas, totalizando cerca de 13 g do composto em 460 mL de cultura, e uma média de 27,03 g.L<sup>-1</sup> após o final da segunda alimentação, em 72 horas, totalizando cerca de 16 g de ácido xilônico em 620 mL de cultura.

**Tabela 12. Produção de ácido xilônico pelas linhagens de *K. phaffii* em biorreator em diferentes intervalos de tempo.** Os horários representam o número de horas após o início da fermentação ( $t_0$ ).

<b>Tempo</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Produção de ácido xilônico (g. L<sup>-1</sup>)</b>
<b>40 horas</b>	X33-XDH-HL	34,14 ± 4,50
	X33-XDH-Haa1	23,57 ± 3,08
<b>48 horas</b>	X33-XDH-HL	22,20 ± 4,35
	X33-XDH-Haa1	24,01 ± 1,77
<b>64 horas</b>	X33-XDH-HL	28,22 ± 9,16
	X33-XDH-Haa1	35,80 ± 1,56
<b>72 horas</b>	X33-XDH-HL	27,03 ± 3,06
	X33-XDH-Haa1	25,65 ± 3,32
<b>88 horas</b>	X33-XDH-HL	35,09 ± 4,25
	X33-XDH-Haa1	31,94 ± 2,69
<b>96 horas</b>	X33-XDH-HL	29,24 ± 3,87
	X33-XDH-Haa1	29,5 ± 4,70
<b>136 horas</b>	X33-XDH-HL	43,08 ± 2,74
	X33-XDH-Haa1	39,35 ± 4,57

#### **4.2.4. Desempenho das linhagens de *K. phaffii* na produção de ácido xilônico na presença de hidrolisado lignocelulósico**

Para avaliar o efeito da superexpressão do fator de transcrição Haa1 na produção de ácido xilônico em hidrolisado, as linhagens de *K. phaffii* X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 foram cultivadas em meio mineral FM22 com adição de hidrolisado lignocelulósico nas concentrações de 10% e 20% (v/v). A quantidade de xilose e glicose foi ajustada a

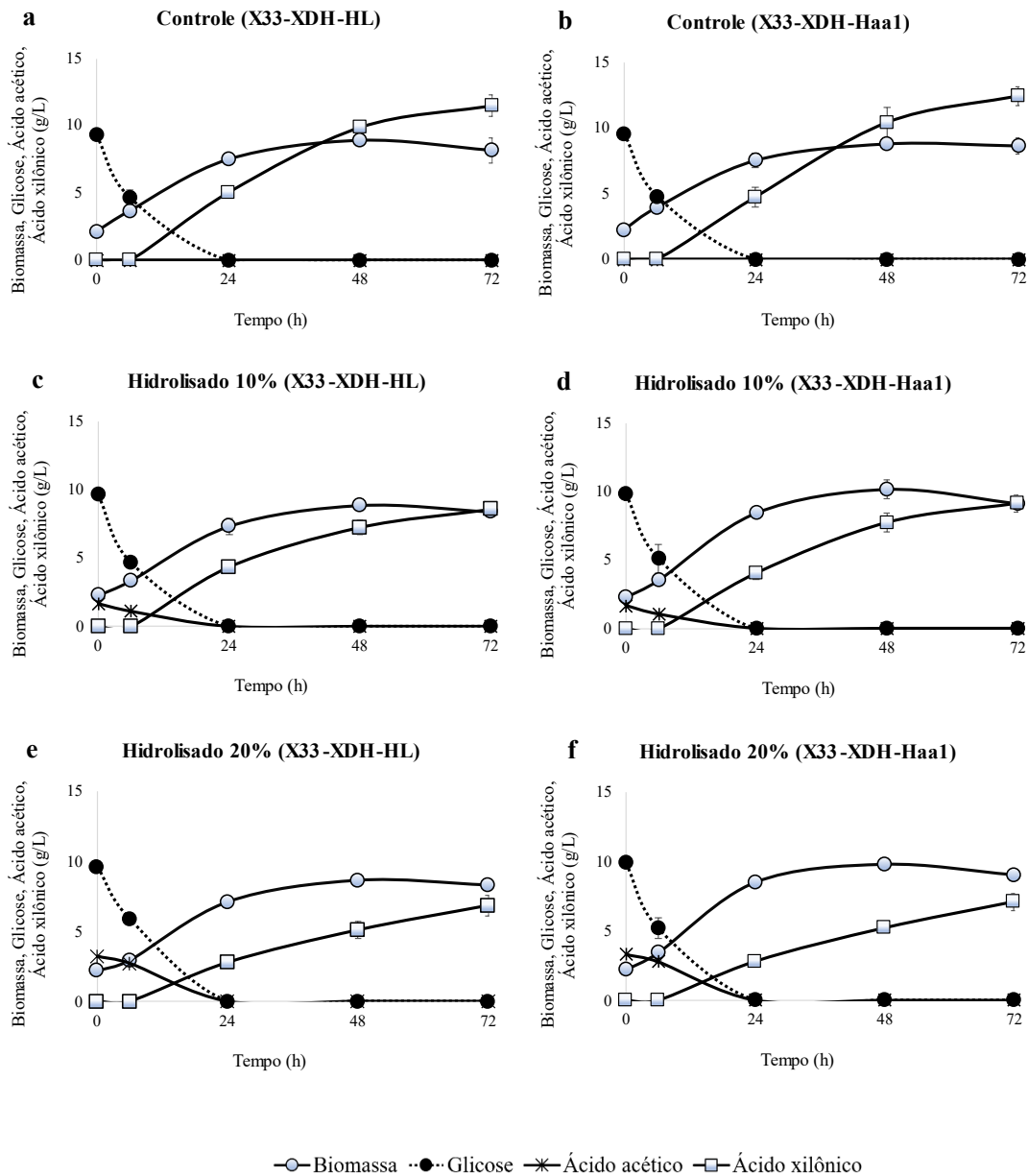


fim de que a concentração inicial desses açúcares fosse a mesma entre os ensaios, igual a  $40 \text{ g.L}^{-1}$  e  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente.

A produção de ácido xilônico pelas linhagens de *K. phaffii* foi bastante próxima em todos os intervalos avaliados dentro de cada condição (Figura 17). Em 24 horas, a linhagem X33-XDH-HL produziu uma média de  $5,06 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido xilônico na ausência de hidrolisado (Figura 17 a),  $4,36 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de hidrolisado a 10% (Figura 17 c) e  $2,77 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de hidrolisado a 20% (Figura 17 e). Esses valores representam uma queda de 13% e 45%, respectivamente. No mesmo intervalo, X33-XDH-Haa1 produziu uma média de  $4,74 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido xilônico na ausência de hidrolisado (Figura 17 b),  $4,06 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de hidrolisado a 10% (Figura 17 d) e  $2,80 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de hidrolisado a 20% (Figura 17 f). Esses valores representam uma queda de 14% e 40%, respectivamente.

Em 48 horas, X33-XDH-HL produziu uma média de  $9,90 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido xilônico na ausência de hidrolisado (Figura 17 a),  $7,25 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de hidrolisado a 10% (Figura 17 c) e  $5,08 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de hidrolisado a 20% (Figura 17 e). Esses valores representam uma queda de 25% e 48%, respectivamente. No mesmo intervalo, X33-XDH-Haa1 produziu uma média de  $10,40 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido xilônico na ausência de hidrolisado (Figura 17 b),  $7,73 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de hidrolisado a 10% (Figura 17 d) e  $5,20 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de hidrolisado a 20% (Figura 17 f). Esses valores representam uma queda de 25% e 50%, respectivamente.

Ao final de 72 horas, X33-XDH-HL produziu uma média de  $11,51 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido xilônico na ausência de hidrolisado,  $8,58 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de hidrolisado a 10% e  $6,82 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de hidrolisado a 20% (Tabela 13). Esses valores representam uma queda de 25% e 40%, respectivamente. No mesmo intervalo, X33-XDH-Haa1 produziu uma média de  $12,44 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido xilônico na ausência de hidrolisado,  $9,13 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de hidrolisado a 10% e  $7,08 \text{ g.L}^{-1}$  na presença de hidrolisado a 20% (Tabela 13). Esses valores representam uma queda de 26% e 42%, respectivamente. Ambas as linhagens X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 sofreram praticamente a mesma queda na produção de ácido xilônico comparando a ausência e a presença de hidrolisado a 10% e 20%.



**Figura 17. Produção de ácido xilônico pelas linhagens de *K. phaffii* na presença de hidrolisado.** A produção de biomassa, o consumo de glicose e ácido acético, e a produção de ácido xilônico estão representados em  $\text{g.L}^{-1}$ . **A:** X33-XDH-HL na ausência de hidrolisado; **B:** X33-XDH-Haa1 na ausência de hidrolisado; **C:** X33-XDH-HL em hidrolisado 10%; **D:** X33-XDH-Haa1 em hidrolisado 10%; **E:** X33-XDH-HL em hidrolisado 20%; **F:** X33-XDH-Haa1 em hidrolisado 20%. Os valores representam a média de duas replicatas com o desvio padrão.

**Tabela 13. Produção e rendimento de ácido xilônico pelas linhagens de *K. phaffii* em hidrolisado após 72 horas.**

<b>Hidrolisado</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Produção</b> (g.L <sup>-1</sup> )	<b>Y<sub>AX/X</sub><sup>a</sup></b> (g.g <sup>-1</sup> )
0%	X33-XDH-HL	11,51 ± 0,80	0,55 ± 0,02
	X33-XDH-Haa1	12,44 ± 0,73	0,57 ± 0,01
10%	X33-XDH-HL	8,58 ± 0,07	0,54 ± 0,01
	X33-XDH-Haa1	9,13 ± 0,60	0,52 ± 0,02
20%	X33-XDH-HL	6,82 ± 0,73	0,42 ± 0,01
	X33-XDH-Haa1	7,08 ± 0,60	0,40 ± 0,01

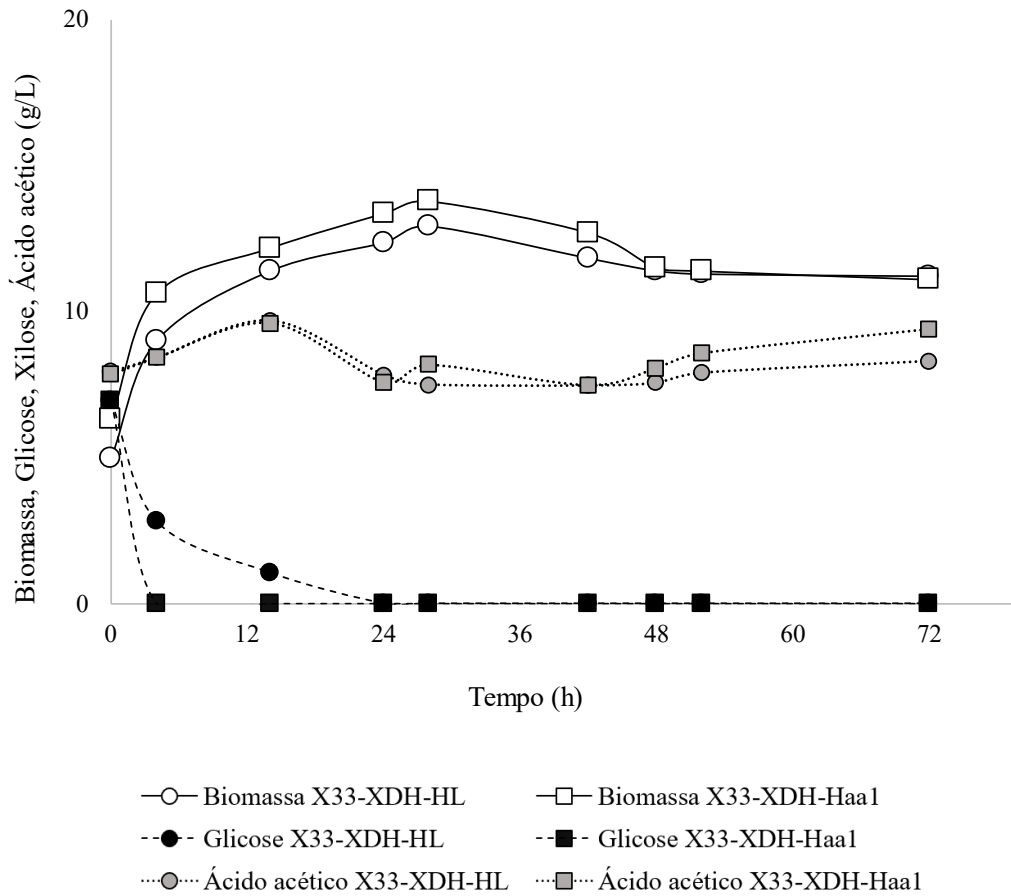
<sup>a</sup> O rendimento (Y) foi calculado dividindo-se a produção de ácido xilônico (AX), em gramas, pela quantidade de xilose consumida (X), em gramas, no intervalo de 0 a 72 horas.

#### **4.2.5. Desempenho das linhagens de *K. phaffii* na produção de ácido xilônico na presença de hidrolisado lignocelulósico em biorreator**

Para avaliar o efeito da superexpressão de Haa1 na produção de ácido xilônico em hidrolisado em biorreator, as linhagens de *K. phaffii* X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 foram cultivadas em meio mineral FM22 com 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose como única fonte de carbono em reatores de 1 L. Após 20 horas, os reatores foram alimentados com 180 ml de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar adicionado de 20 mL de xilose totalizando 600 mL de cultura nos reatores com a presença de hidrolisado a 30% (v/v) e 40 g.L<sup>-1</sup> de xilose. A fermentação correu por 72 horas a 30 °C com agitação de 400 rpm e fluxo de O<sub>2</sub> de 0,8 L/min. O pH foi mantido a 5,5 com adição automática de KOH 3M.

A produção de ácido xilônico foi completamente inibida em ambas as linhagens. Não foi detectada a sua produção em nenhum intervalo de tempo desde a adição do hidrolisado, bem como nenhum consumo de xilose foi observado em ambos os ensaios. No entanto, toda a glicose presente no hidrolisado adicionado foi rapidamente consumida pelas leveduras dentro de 24 horas e uma produção de até 7,45 g.L<sup>-1</sup> e 7,94 g.L<sup>-1</sup> de biomassa foi observada por X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 (Figura 18), respectivamente, que sugere que as células conseguiram manter o seu metabolismo de carbono em funcionamento por um por um curto período de tempo mesmo na presença

de hidrolisado a 30%. As leveduras também não foram capazes de consumir o ácido acético do meio proveniente do hidrolisado adicionado.



**Figura 18.** Perfil das linhagens de *K. phaffii* na presença de hidrolisado lignocelulósico em biorreator. A biomassa produzida e o consumo de glicose pelas linhagens X33-XDH-HL (círculos) e X33-XDH-Haa1 (quadrados) e o ácido acético presente no hidrolisado estão representados em  $\text{g.L}^{-1}$ .

## 5. Discussão

O fator de transcrição Haa1 está envolvido na expressão de mais de 80% dos genes relacionados à resposta celular de *S. cerevisiae* na presença de ácido acético, reduzindo a susceptibilidade da levedura e a duração da fase de adaptação das células (Fernandes et al. 2005; Mira et al. 2011). Portanto, neste trabalho foi avaliado o efeito da superexpressão do gene Haa1 homólogo em *K. phaffii* sobre a tolerância da levedura a diferentes concentrações de ácido acético e hidrolisado lignocelulósico.

Foi observado que a presença de ácido acético na concentração a partir de 2 g.L<sup>-1</sup> teve efeito inibitório sobre *K. phaffii* causando atraso no crescimento celular. Em ensaio com baixa densidade celular (DO<sub>600nm</sub> = 0,5) a produção de biomassa de *K. phaffii* sofreu grande diminuição (Figura 11 b), produzindo apenas 25% da biomassa produzida na ausência do inibidor (Figura 11 a).

Foi descrito que quando uma concentração inibitória de ácido fraco como o ácido acético é adicionada a uma cultura de levedura em crescimento, ocorre uma interrupção temporária da produção de biomassa, e a cultura entra em um período de latência enquanto as células se recuperam do estresse causado, e o crescimento exponencial pode ser retomado (Mira et al. 2010a). Nos ensaios realizados neste trabalho, foi observado que o crescimento de *K. phaffii* passou por um período de adaptação seguido de retomada na produção de biomassa também quando a o inibidor estava presente na cultura desde o início (t<sub>0</sub>).

O efeito inibitório de ácido acético sobre *K. phaffii* na concentração de 2 g.L<sup>-1</sup> (Figura 11 b) foi semelhante ao efeito observado em ensaio com maior densidade celular (Figura 12 b), onde uma breve redução na produção de biomassa foi observada no início do crescimento exponencial da linhagem X33 se comparada à ausência de inibidor (6,07 g.L<sup>-1</sup> para 4,86 g.L<sup>-1</sup>) dentro do mesmo intervalo de tempo. Considerando que esse efeito inibitório sobre o crescimento celular da levedura na presença de ácido acético a 2 g.L<sup>-1</sup> foi observado apenas na linhagem X33, é possível inferir que a superexpressão do fator Haa1 teve efeito protetivo no crescimento de *K. phaffii*.

O efeito protetivo da superexpressão do fator Haa1 ficou mais evidente na presença de ácido acético a 4 g.L<sup>-1</sup> (Figura 12 c). A presença do inibidor levou à redução do crescimento celular de *K. phaffii* de forma mais intensa sobre a linhagem X33, que em

oito horas havia produzido apenas 2,92 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 8) comparado a 6,07 g.L<sup>-1</sup> na ausência de inibidor. Esta redução equivale a cerca de 50% menos biomassa e 40% menor assimilação de açúcar. As linhagens sob superexpressão do fator Haa1, por outro lado, não sofreram o mesmo efeito inibitório e produziram, no mesmo período, pelo menos 43% mais biomassa e consumiram pelo menos 36% mais ácido acético do que a linhagem X33. Em 24 horas, mais de 90% do ácido acético havia sido consumido por todas as linhagens, sendo que a biomassa das linhagens X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1 e X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1 manteve-se cerca de 15% maior em relação à linhagem X33 até o final da fase estacionária de crescimento, às 36 horas.

O ácido acético na concentração de 6 g.L<sup>-1</sup> demonstrou ainda maior efeito inibitório sobre *K. phaffii*, em especial sobre a linhagem X33, que teve sua produção média de biomassa reduzida em até 70% em comparação à ausência de inibidor (de 6,07 g.L<sup>-1</sup> para 1,84 g.L<sup>-1</sup>) no início do cultivo. A maior concentração de ácido acético também reduziu a velocidade de consumo do inibidor em *K. phaffii* X33 em pelo menos 30% nas primeiras 24 horas. Já para as linhagens superexpressando o fator Haa1, o efeito inibitório de 6 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético foi menos prejudicial, desacelerando o crescimento celular em cerca de apenas 30%. Apesar de todas as linhagens precisarem de mais de 24 horas para consumir mais de 90% do ácido acético presente no meio, seu consumo pelas linhagens X33-P<sub>RPP1b</sub>-Haa1 e X33-P<sub>GAP</sub>-Haa1 foi semelhante ao observado em 4 g.L<sup>-1</sup> (Figura 13 b). Isso reitera a vantagem da superexpressão do fator Haa1 à tolerância de *K. phaffii* ao ácido acético.

O efeito inibitório do ácido acético sobre o crescimento celular de *K. phaffii* observado neste trabalho foi mais significativo durante o início dos ensaios, fazendo com que a levedura passe por uma extensão da fase *lag* e o crescimento exponencial seja retomado logo após o período de adaptação. Um efeito semelhante foi observado em *S. cerevisiae* com a remoção do gene *HAA1*, o que levou ao aumento na duração da fase de adaptação das células expostas a ácido acético (Fernandes et al. 2005). Além disso, o efeito inibitório cada vez maior sobre as primeiras horas de crescimento de *K. phaffii* observado neste trabalho, isto é, a redução na produção de biomassa causada pela presença de ácido acético a 2 g.L<sup>-1</sup> (6,07 g.L<sup>-1</sup> para 4,86 g.L<sup>-1</sup>), 4 g.L<sup>-1</sup> (6,07 g.L<sup>-1</sup> para 2,92 g.L<sup>-1</sup>) e 6 g.L<sup>-1</sup> (6,07 g.L<sup>-1</sup> para 1,84 g.L<sup>-1</sup>) condiz com o efeito inibitório dose-dependente do ácido acético descrito em microrganismos (Pampulha e Loureiro-Dias 1990; Dong et al. 2017; Soares et al. 2021).

Foi reportado que uma maior quantidade de composto inibitório terá maior efeito sobre uma população menor de células, pois estas sofrerão maior acúmulo intracelular de íons e conseqüentemente inibição metabólica quando em menor quantidade (Carmelo et al. 1997; Palmqvist e Hahn-Hägerdal 2000). Além disso, concentrações letais de ácido acético podem induzir a morte celular por apoptose ou necrose (Dong et al. 2017). Como observado neste trabalho, em ensaio com baixa densidade celular ( $DO_{600nm} = 0,5$ ) a presença de ácido acético a  $6 \text{ g.L}^{-1}$  foi suficiente para inibir completamente o metabolismo e crescimento de *K. phaffii* em poucas horas (Figura 11 c). Porém, o mesmo não aconteceu em ensaio com maior densidade celular ( $DO_{600nm} = 5$ ). Isso sugere que a quantidade de células foi um fator determinante na tolerância de *K. phaffii* ao ácido acético e na definição da concentração letal do inibidor para a levedura.

O atraso no crescimento celular por consequência da presença de ácido acético também pode acontecer devido à depleção de ATP causada tanto pela inibição de enzimas da via glicolítica devido à queda no pH quanto pela alta demanda energética da ativação de respostas de defesa, em especial o intenso transporte ativo de prótons para o exterior da célula realizado por  $H^+$ -ATPase e  $V-H^+$ -ATPase (Pampulha e Loureiro-Dias 1990). Genes relacionados à síntese de ATP foram identificados como fatores determinantes na resposta adaptativa de leveduras a ácidos fracos (Mollapour et al. 2004; Mira et al. 2009), incluindo o ácido acético (Kawahata et al. 2006). Isso também pode explicar o rápido decréscimo de biomassa em *K. phaffii* observado em ensaio com a adição de hidrolisado para concentração final de 30% (v/v), uma vez que a glicose adicionada ao início do cultivo já havia sido esgotada até este momento e a pequena quantidade deste açúcar presente no hidrolisado adicionado foi rapidamente consumida pela levedura. Isto é, a baixa disponibilidade de glicose e a alta demanda de resposta celular aos compostos inibitórios do hidrolisado podem ter sido um fator limitante à manutenção do metabolismo e crescimento celular de *K. phaffii*.

Entre os genes regulados pelo fator de transcrição Haa1 estão transportadores de membrana do tipo “*multidrug-resistance*” (MDR), que realizam intenso bombeamento de íons para fora da célula para reverter a queda do pH intracelular e outros efeitos tóxicos causados pelo acúmulo de íons no citosol (Carmelo et al. 1997; Mira et al. 2010a). Portanto, a superexpressão de Haa1 pode ajudar a acelerar este mecanismo, à medida que regula positivamente a expressão desses transportadores. Como consequência, as células poderiam compensar o intenso gasto de ATP mais rapidamente e produzir biomassa em

menos tempo. Além disso, a presença de ácido acético e hidrolisado lignocelulósico também pode causar a repressão da via glicolítica em *K. phaffii* (Pampulha e Loureiro-Dias 1990; Mira et al. 2010a). Isso também pode explicar o comportamento observado nas linhagens de *K. phaffii* avaliadas neste trabalho, que, sem a superexpressão do fator Haa1, mantiveram a assimilação de açúcar em biomassa muito mais lenta na presença de ácido acético.

O aumento da tolerância de *K. phaffii* ao ácido acético conferido pela superexpressão do fator Haa1 não se mostrou correlacionado à força dos promotores utilizados nos ensaios realizados neste trabalho. Em ensaios quantitativos de nível de expressão em diferentes fontes de carbono, o promotor  $P_{RPP1b}$  apresentou 23% da força de expressão de  $P_{GAP}$  em glicose (Prielhofer et al. 2017). Sabe-se que a síntese proteica é um processo de alta demanda energética (Verduyn 1991) e portanto a superexpressão de proteínas representa um custo energético adicional para o organismo (Bienick et al. 2014). É possível que o custo energético da superexpressão de *HAA1* em *K. phaffii* sob o controle de  $P_{GAP}$  não seja compensatório para a levedura, uma vez que o efeito protetivo do fator de transcrição é concretizado apenas mediante a ativação dos genes regulados por essa molécula, o que também representa um custo energético para as células.

Sabe-se que o ácido xilônico também pode desempenhar certa toxicidade às células, uma vez que contribui para a acidificação do meio intracelular, ou extracelular, quando secretado (Bañares et al. 2021). Portanto, a possibilidade da superexpressão do fator Haa1 beneficiar a tolerância de *K. phaffii* ao acúmulo de ácido xilônico produzido pela levedura foi avaliada.

A produção de ácido xilônico em biorreator com alta quantidade de glicose e xilose (Figura 16) possibilitou uma rápida produção, onde X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 atingiram uma média de 34,14 g.L<sup>-1</sup> e 23,57 g.L<sup>-1</sup> de ácido xilônico, respectivamente, em apenas 40 horas. Esses valores são cerca de quatro vezes maiores do que a produção observada em *K. phaffii* em 40 g.L<sup>-1</sup> de xilose em Ramos et al. (2021) dentro do mesmo intervalo de tempo. Essa vantagem pode estar relacionada tanto à maior quantidade de açúcares oferecida às leveduras quanto a uma maior densidade celular no início da fermentação ( $DO_{600nm} = 15$ ). No entanto, ao final de 136 horas, as linhagens de *K. phaffii* produziram apenas cerca de 40 g.L<sup>-1</sup> de ácido xilônico, enquanto essa mesma produção foi alcançada em Ramos et al. (2021) em apenas 96 horas. Esse valor também é bastante menor em comparação à produção alcançada em *Pichia kudriavzevii* no mesmo



intervalo de tempo (Toivari et al. 2013). Por outro lado, ao final da fermentação, observou-se que a produção de ácido xilônico continuou aumentando mesmo após 136 horas, o que indica a possibilidade de *K. phaffii* produzir maior quantidade de ácido xilônico caso a fermentação fosse continuada.

A partir da primeira alimentação realizada, a produção de ácido xilônico pelas linhagens X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 manteve-se próxima com pequenas variações em alternância observadas após longos períodos sem alimentação e uma média de produção final um pouco maior pela linhagem X33-XDH-HL. Portanto, não se pode inferir que a superexpressão do fator Haa1 conferiu vantagem na produção de ácido xilônico em *K. phaffii*.

A queda da produtividade de ácido xilônico observada nas linhagens de *K. phaffii* durante os intervalos de alimentação com xilose e glicose sugere que a adição de glicose pode ter cessado a assimilação de xilose pelas leveduras. Isso pode acontecer devido ao fato de que, em um meio onde há oferta de glicose e xilose, microrganismos que não assimilam xilose naturalmente tendem a consumir a pentose apenas diante da escassez de glicose (Shin et al. 2015), uma vez que seus transportadores de açúcares possuem maior afinidade por glicose (Sharma e Arora 2020).

Considerando a vantagem conferida a *K. phaffii* pela superexpressão do fator Haa1 à presença de ácido acético observada neste trabalho, foi esperado que a superexpressão do fator Haa1 também beneficiasse a produção de ácido xilônico na presença de hidrolisado lignocelulósico. No entanto, as linhagens X33-XDH-HL e X33-XDH-Haa1 sofreram praticamente a mesma queda na produção de ácido xilônico comparando-se a ausência e a presença de hidrolisado a 10% e 20% (v/v) (Figura 17). A superexpressão do fator Haa1 não teve, no entanto, o efeito esperado sobre a produção de ácido xilônico na presença de hidrolisado. Tanto sob a superexpressão do fator Haa1, em X33-XDH-Haa1, quanto na ausência, em X33-XDH-HL, a média da produção de ácido xilônico em *K. phaffii* sofreu cerca de 15% de redução em 24 hora e 25% dentro de 48 horas e 72 horas, comparando-se a ausência de hidrolisado com sua presença a 10% (v/v). Já na presença de hidrolisado a 20% (v/v), a média da produção de ácido xilônico em *K. phaffii* sofreu cerca de 40% de redução em 24 horas e também em 72 horas, em ambas as linhagens. Portanto, não foi possível observar melhora na produção de ácido xilônico em *K. phaffii* superexpressando o fator Haa1 na presença de hidrolisado. Apesar de a concentração de ácido acético no hidrolisado utilizado diluído a 10% e 20% ser de

aproximadamente 2 g.L<sup>-1</sup> e 4 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, concentrações toleráveis por *K. phaffii*, a presença de outros compostos inibitórios presentes no hidrolisado podem ter prejudicado o metabolismo de xilose da levedura, uma vez que diferentes inibidores demandam diferentes mecanismos de adaptação e detoxificação (Almeida et al. 2007; Cunha et al. 2019). Furfural e HMF são compostos inibitórios presentes em hidrolisado lignocelulósico, formados pela desidratação dos açúcares (Almeida et al. 2007). Concentrações de 0,9 g.L<sup>-1</sup> de furfural e 0,25 g.L<sup>-1</sup> de HMF podem levar o crescimento celular de *K. phaffii* a um prolongamento da fase *lag* reduzindo a produção de biomassa (Paes et al. 2021). Porém, a concentração desses compostos no hidrolisado utilizado neste trabalho diluído a 10% é aproximadamente apenas 0,126 g.L<sup>-1</sup> e 0,04 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, e 0,25 g.L<sup>-1</sup> e 0,08 g.L<sup>-1</sup> em hidrolisado diluído a 20% (v/v) e o seu efeito exclusivo sobre a produção de ácido xilônico pela levedura em menores concentrações ainda não foi descrito.

Para a produção de ácido xilônico em hidrolisado em biorreator, foi esperado que a adição de hidrolisado durante o crescimento das linhagens de *K. phaffii* após alta densidade celular atingida ( $DO_{600nm} = 30$ ) favorecesse a adaptação das células aos compostos inibitórios, uma vez relatado que quando uma concentração inibitória de ácido fraco, como o ácido acético, é adicionada a uma cultura de levedura em crescimento, ocorre uma interrupção temporária da produção de biomassa, e a cultura entra em um período de latência enquanto as células se recuperam do estresse causado, e o crescimento exponencial pode ser retomado (Mira et al. 2010a). No entanto, a adição de hidrolisado lignocelulósico para a concentração final de 30% foi o suficiente para inibir totalmente a produção de ácido a partir da xilose presente no hidrolisado (Figura 18).

A capacidade de detoxificação do microrganismo a um inibidor pode ser mensurada pela taxa de conversão – na forma de consumo ou convertendo o inibidor a uma molécula menos tóxica – que ele é capaz de realizar. No entanto, isso é mais precisamente calculado quando se analisam inibidores separadamente, uma vez que a presença de diferentes tipos de inibidores demanda diferentes estratégias de adaptação (Almeida et al. 2007). Apesar de ser capaz de tolerar e consumir completamente o ácido acético em concentração igual a 6 g.L<sup>-1</sup> (Paes et al. 2021; este trabalho), ainda não foi possível observar a tolerância de *K. phaffii* à presença de hidrolisado lignocelulósico em concentração partir de 30% (v/v). Novamente, o maior efeito inibitório causado pela presença de hidrolisado pode estar relacionado à presença de outros compostos inibitórios

existentes no hidrolisado utilizado, como furaldeídos e compostos fenólicos. A concentração de furfural e HMF presente no hidrolisado utilizado neste trabalho diluído a 30% é aproximadamente 0,38 g.L<sup>-1</sup> e 0,12 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Furaldeídos podem causar efeitos diretos no metabolismo celular em concentrações menores que 1 g.L<sup>-1</sup>, como a inibição de enzimas da via glicolítica, levando à extensão da fase *lag* e limitação da produção de biomassa e produção de biocompostos, como observado em Banerjee et al. (1981), Modig et al. (2002) e revisado em Almeida et al. (2009).

Além disso, devido aos danos causados diretamente na parede celular e na membrana plasmática por inibidores presentes em hidrolisado (Larsson et al. 2000; Fernandes et al. 2005; Mira et al. 2010), pode ocorrer uma maior entrada de compostos inibitórios no meio intracelular, ocasionando um conjunto de efeitos inibitórios, ao contrário do que acontece quando a levedura está na presença de apenas um desses compostos. Isso também pode explicar o maior efeito inibitório observado neste trabalho causado pelo hidrolisado em comparação com o ácido acético. Assim, a combinação da rápida depleção de glicose com os efeitos inibitórios do hidrolisado podem ter superado o limite da viabilidade celular, fazendo com que a assimilação de xilose em ácido xilônico não fosse possível. Ainda, a rápida depleção de glicose também pode ter impedido a atividade de extrusão de prótons pelos transportadores da membrana plasmática responsáveis por reverter o acúmulo de prótons H<sup>+</sup> devido à grande quantidade de ácido acético adicionada ao meio, visto que a própria ativação deste mecanismo na levedura leva a um alto gasto de ATP (Carmelo et al. 1997).

Uma estratégia para permitir a assimilação de xilose em produtos na presença de hidrolisado lignocelulósico poderia ser a adição do hidrolisado na forma de alimentação controlada, mantendo a concentração de inibidores abaixo do limite inibitório. O modelo de fermentação alimentada mostrou-se vantajoso na utilização de açúcares a partir de hidrolisado lignocelulósico para fermentação alcoólica (Rudolf et al. 2005), isso porque a concentração de inibidores é mantida menor ao longo do processo, o que poderia facilitar a adaptação dos organismos fermentadores. Da mesma forma, esse modelo de fermentação poderia facilitar a adaptação de *K. phaffii* para a produção de outros compostos a partir de açúcares presentes no hidrolisado, como o ácido xilônico.

## 6. Conclusões

Foi demonstrado neste trabalho, pela primeira vez, que a superexpressão do fator de transcrição Haa1 favorece a tolerância de *K. phaffii* na presença de ácido acético acelerando o consumo do inibidor pelas células e a assimilação de glicose em biomassa. Este efeito positivo da superexpressão de Haa1 é mais significativo em baixa densidade celular.

A quantidade de células, isto é, a densidade celular é um fator crucial para a resposta de microrganismos ao ácido acético, uma vez que em baixa densidade celular a levedura *K. phaffii* foi totalmente inibida pelo ácido acético na concentração de 6 g.L<sup>-1</sup> e o mesmo não aconteceu com a densidade celular dez vezes maior.

As linhagens de *K. phaffii* produtoras de ácido xilônico avaliadas neste trabalho foram capazes de produzir o composto mesmo na presença de hidrolisado lignocelulósico a 10% e 20% (v/v), sendo menor sua produtividade quanto maior a concentração do hidrolisado. No entanto, estas mesmas linhagens não foram capazes de assimilar xilose em ácido xilônico na presença de hidrolisado lignocelulósico a 30%.

A superexpressão do fator Haa1 não ofereceu vantagem significativa na produção de ácido xilônico em *K. phaffii*.

## 7. Perspectivas

Considerando que a densidade celular de *K. phaffii* em ensaios sob diferentes concentrações de ácido acético foi um fator importante neste trabalho, ensaios com diferentes concentrações de ácido acético, superiores a 6 g.L<sup>-1</sup>, podem revelar mais informações sobre a tolerância de *K. phaffii* ao inibidor

Sobre a tolerância de leveduras a compostos inibitórios presentes em hidrolisado, a superexpressão simultânea de mais de um gene envolvido na tolerância ao ácido acético e outros inibidores poderia ser uma estratégia interessante para beneficiar a adaptação de *K. phaffii* ao hidrolisado lignocelulósico. Cunha et al. (2018) obteve efeito positivo superexpressando *HAA1* (Haa1) e a *PRS3* (ribose-fosfato difosfoquinase) em *S. cerevisiae* previamente modificada para o consumo de xilose, favorecendo sua viabilidade celular em hidrolisado. Além disso, outros fatores de transcrição envolvidos na ativação de genes relacionados à resposta celular sob a presença de ácido acético, como Rim101, Msn2/Msn4 e War1 (Mira et al. 2010a) também podem contribuir para o desenvolvimento de linhagens mais tolerantes de *K. phaffii*.

A fim de aumentar o desempenho de *K. phaffii* na produção de ácido xilônico e outros biocompostos a partir de xilose em hidrolisado lignocelulósico, uma importante característica – além da tolerância a compostos inibitórios – é o eficiente aproveitamento desse açúcar. A assimilação de xilose em microrganismos depende da presença de uma via capaz de utilizá-la como substrato e do seu transporte para o interior da célula (Kim et al. 2013; Moysés et al. 2016). No entanto, a maioria dos transportadores de açúcares em leveduras possuem maior afinidade por hexoses, dando preferência ao consumo de glicose e consumindo xilose de forma muito mais lenta (Sharma e Arora 2020). A superexpressão de transportadores de maior afinidade por xilose em leveduras é capaz de aumentar a quantidade desse açúcar no interior da célula, como visto em *S. cerevisiae* (Shin et al. 2015). Isso abre possibilidades para o melhoramento de capacidade de utilização de xilose por outras leveduras, como *K. phaffii*, a partir da superexpressão de transportadores de maior afinidade por esse açúcar.

Além disso, apesar das espécies de *Komagataella* não serem descritas como leveduras que consomem xilose naturalmente, isto é, sem a necessidade da introdução de vias heterólogas, investigações recentes no genoma de *K. phaffii* revelaram a presença de

genes putativos para a XR e XiDH homólogos a leveduras de outros gêneros como *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* (Heistingering et al. 2022). Diante disso, a construção de linhagens de *K. phaffii* com maior capacidade de importe de pentoses para o interior da célula também abre caminho para favorecer o consumo de xilose como fonte de carbono e energia ou na produção de biocompostos.

## 8. Bibliografia

- Abbott, D. A., Suir, E., van Maris, A. J. A., & Pronk, J. T. (2008). Physiological and Transcriptional Responses to High Concentrations of Lactic Acid in Anaerobic Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5759–5768. <https://doi.org/10.1128/AEM.01030-08>
- Alexandre, H., Mathieu, B., & Charpentier, C. (1996). Alteration in Membrane Fluidity and Lipid Composition, and Modulation of H<sup>+</sup>-ATPase Activity in *Saccharomyces Cerevisiae* caused by Decanoic Acid. *Microbiology*, 142(3), 469–475. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-3-469>
- Allen, S. A., Clark, W., McCaffery, J. M., Cai, Z., Lanctot, A., Slininger, P. J., Liu, Z. L., & Gorsich, S. W. (2010). Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-2>
- Almeida, J. R. M., Bertilsson, M., Hahn-Hägerdal, B., Lidén, G., & Gorwa-Grauslund, M.-F. (2009). Carbon fluxes of xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strains are affected differently by NADH and NADPH usage in HMF reduction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(4), 751–761. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2053-1>
- Almeida, J. R. M., Runquist, D., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2011). Stressrelated challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Journal*, 14.
- Almeida, J. R., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hägerdal, B., Lidén, G., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(4), 340–349. <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>
- Alternative Fuels Data Center. (2021). Energy Efficiency & Renewable Energy. Maps and Data - Global Ethanol Production by Country or Region. Disponível em <<https://afdc.energy.gov/data/categories/fuel-trends>>.
- Araujo Galvão, G. D., de Nadea, J., Clemente, D. H., Chinen, G., & de Carvalho, M. M. (2018). Circular Economy: Overview of Barriers. *Procedia CIRP*, 73, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2018.04.011>
- Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26(1), 89–105. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>
- Bañares, A. B., Nisola, G. M., Valdehuesa, K. N. G., Lee, W.-K., & Chung, W.-J. (2021). Understanding D-xylonic acid accumulation: A cornerstone for better metabolic engineering approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(13), 5309–5324. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11410-y>
- Bañares, A. B., Valdehuesa, K. N. G., Ramos, K. R. M., Nisola, G. M., Lee, W. K., & Chung, W. J. (2019). Discovering a novel d-xylonate-responsive promoter: The PyjH-driven genetic switch towards better 1,2,4-butanetriol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(19), 8063–8074. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10073-0>
- Bañares, A. B., Valdehuesa, K. N. G., Ramos, K. R. M., Nisola, G. M., Lee, W. K., & Chung, W.-J. (2020). A pH-responsive genetic sensor for the dynamic regulation of D-xylonic acid accumulation in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 2097–2108. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10297-0>

- Banerjee, N., Bhatnagar, R., & Viswanathan, L. (1981). Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, *11*(4), 226–228. <https://doi.org/10.1007/BF00505872>
- Baruah, J., Nath, B. K., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R. C., Baruah, D. C., & Kalita, E. (2018). Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. *Frontiers in Energy Research*, *6*, 141. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>
- Bernauer, L., Radkohl, A., Lehmayr, L. G. K., & Emmerstorfer-Augustin, A. (2021). *Komagataella phaffii* as Emerging Model Organism in Fundamental Research. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 607028. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.607028>
- Bienick, M. S., Young, K. W., Klesmith, J. R., Detwiler, E. E., Tomek, K. J., & Whitehead, T. A. (2014). The Interrelationship between Promoter Strength, Gene Expression, and Growth Rate. *PLoS One*, *9*(10), 109105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109105>
- Braga, M., Ferreira, P. M., & Almeida, J. R. M. (2021). Screening method to prioritize relevant bio-based acids and their biochemical processes using recent patent information. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *15*(1), 231–249. <https://doi.org/10.1002/bbb.2156>
- Brandt, B. A., Jansen, T., Görgens, J. F., & Zyl, W. H. (2019). Overcoming lignocellulose-derived microbial inhibitors: Advancing the *Saccharomyces cerevisiae* resistance toolbox. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *13*(6), 1520–1536. <https://doi.org/10.1002/bbb.2042>
- Brethauer, S., & Studer, M. H. (2015). Biochemical Conversion Processes of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals – A Review. *CHIMIA*, *69*(10), 572. <https://doi.org/10.2533/chimia.2015.572>
- Carmelo, V., Santos, H., & Sa-Correia, I. (1997). Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1325*, 63–70. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(96\)00245-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(96)00245-3)
- Carrasco, C., Baudel, H. M., Sendelius, J., Modig, T., Roslander, C., Galbe, M., Hahn-Hägerdal, B., Zacchi, G., & Lidén, G. (2010). SO<sub>2</sub>-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, *46*(2), 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.016>
- Chandel, A. K., Garlapati, V. K., Jeevan Kumar, S. P., Hans, M., Singh, A. K., & Kumar, S. (2020). The role of renewable chemicals and biofuels in building a bioeconomy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *14*(4), 830–844. <https://doi.org/10.1002/bbb.2104>
- Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Lin, H., & Han, S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*, *160*, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.12.007>
- Chen, W.-H., Pen, B.-L., Yu, C.-T., & Hwang, W.-S. (2011). Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*, *102*(3), 2916–2924. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.052>
- Cheng, H., Lv, J., Wang, H., Wang, B., Li, Z., & Deng, Z. (2014). Genetically engineered *Pichia pastoris* yeast for conversion of glucose to xylitol by a single-fermentation



- process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3539–3552. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5501-x>
- Chun, B.-W., Dair, B., Macuch, P. J., Wiebe, D., Porteneuve, C., & Jeknavorian, A. (2006). The development of cement and concrete additive. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129, 14. <https://doi.org/10.1385/ABAB:131:1:645>
- Cregg, J. M., Barringer, A. Y., Hessler, K., Madden, K. R. (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5 (12), 3376-3385. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.12.3376-3385.1985>
- Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P., & Stillman, C. A. (1989). Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, 9, (8). <https://doi.org/10.1128/mcb.9.3.1316-1323.1989>
- Cunha, J. T., Costa, C. E., Ferraz, L., Romani, A., Johansson, B., Sá-Correia, I., & Domingues, L. (2018). *HAA1* and *PRS3* overexpression boosts yeast tolerance towards acetic acid improving xylose or glucose consumption: Unravelling the underlying mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(10), 4589–4600. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8955-z>
- Cunha, J. T., Romani, A., Costa, C. E., Sá-Correia, I., & Domingues, L. (2019). Molecular and physiological basis of *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to adverse lignocellulose-based process conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 159–175. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9478-3>
- Dahms A. S. (1974). 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 60(4): 1433-9. doi: 10.1016/0006-291x(74)90358-1. PMID: 4423285.
- Dong, Y., Hu, J., Fan, L., & Chen, Q. (2017). RNA-Seq-based transcriptomic and metabolomic analysis reveal stress responses and programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 7(1), 42659. <https://doi.org/10.1038/srep42659>
- Du, B., Sharma, L. N., Becker, C., Chen, S. F., Mowery, R. A., van Walsum, G. P., & Chambliss, C. K. (2010). Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(3), 430–440. <https://doi.org/10.1002/bit.22829>
- Faga B. A., Wilkins M. R., Banat I. M. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D(5)A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. *Bioresource Technology*. 101(7), 2273-9. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.001.
- Fatma, Shabih, Amir Hameed, Muhammad Noman, Temoor Ahmed, Muhammad Shahid, Mohsin Tariq, Imran Sohail e Romana Tabassum. 2018. “Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for the Future”. *Protein & Peptide Letters* 25(2): 148–163. <http://dx.doi.org/10.2174/0929866525666180122144504>
- Fernandes, A. R., Mira, N. P., Vargas, R. C., Canelhas, I., & Sá-Correia, I. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(1), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.010>
- Fina, A., Brêda, G. C., Pérez-Trujillo, M., Freire, D. M. G., Almeida, R. V., Albiol, J., Ferrer, P. (2021). Benchmarking recombinant *Pichia pastoris* for 3-hydroxypropionic acid production from glycerol. *Microbial Biotechnology*, 14, 1671-1682. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13833>.

- Fletcher, E., & Baetz, K. (2020). Multi-Faceted Systems Biology Approaches Present a Cellular Landscape of Phenolic Compound Inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 539902. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.539902>
- Gilna, P., Lynd, L. R., Mohnen, D., Davis, M. F., & Davison, B. H. (2017). Progress in understanding and overcoming biomass recalcitrance: A BioEnergy Science Center (BESC) perspective. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 285. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0971-1>
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Guilliermond, A. (1920). *Zygosaccharomyces pastori*, nouvelle espèce de levures à copulation hétérogamique. *Société mycologique de France*.
- Guldfeldt, L. U., & Arneborg, N. (1998). Measurement of the Effects of Acetic Acid and Extracellular pH on Intracellular pH of Nonfermenting, Individual *Saccharomyces cerevisiae* Cells by Fluorescence Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 530–534. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.530-534.1998>
- Guo, F., Dai, Z., Peng, W., Zhang, S.; Zhou, J.; Ma, J.; Dong, W.; Xin, F.; Zhang, W.; Jiang, M. (2021). Metabolic Engineering of *Pichia Pastoris* for Malic Acid Production from Methanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 118, 357-371. <https://doi.org/10.1002/bit.27575>.
- Gupta, P. K., Raghunath, S. S., Prasanna, D. V., Venkat, P., Shree, V., Chithanathan, C., Choudhary, S., Surender, K., & Geetha, K. (2019). An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. Em A. Rodríguez Pascual & M. E. Eugenio Martín (Orgs.), *Cellulose*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84727>
- Hagman, A., Säll, T., & Piškur, J. (2014). Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin. *The FEBS Journal*, 281(21), 4805–4814. <https://doi.org/10.1111/febs.13019>
- Hayes, D. J., Fitzpatrick, S., Hayes, M. H. B., & Ross, J. R. H. (2005). The Biofine Process— Production of Levulinic Acid, Furfural, and Formic Acid from Lignocellulosic Feedstocks. Em B. Kamm, P. R. Gruber, & M. Kamm (Orgs.), *Biorefineries-Industrial Processes and Products* (p. 139–164). Wiley-VCH Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1002/9783527619849.ch7>
- Heisteringer, L., Dohm, J. C., Paes, B. G., Koizar, D., Troyer, C., Ata, Ö., Steininger-Mairinger, T., & Mattanovich, D. (2022). Genotypic and phenotypic diversity among *Komagataella* species reveals a hidden pathway for xylose utilization. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01796-3>
- Herrera, C. R. J., Vieira, V. R., Benoliel, T., Carneiro, C. V. G. C., De Marco, J. L., de Moraes, L. M. P., de Almeida, J. R. M., & Torres, F. A. G. (2021). Engineering *Zymomonas mobilis* for the Production of Xylonic Acid from Sugarcane Bagasse Hydrolysate. *Microorganisms*, 9(7), 1372. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071372>
- Höfte, H., & Voxeur, A. (2017). Plant cell walls. *Current Biology*, 27(17), 865–870. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.025>
- Holyoak, C. D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M. B., Crimmins, K., Brown, A. J. P., & Coote, P. J. (1996). Activity of the Plasma Membrane H(+)-ATPase and Optimal Glycolytic Flux Are Required for Rapid Adaptation and Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the Presence of the Weak-Acid Preservative Sorbic

- Acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9).  
<https://doi.org/10.1128/aem.62.9.3158-3164.1996>
- INVITROGEN®. USA. *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins. *User Manual*. Catalog nos. V200-20 and V205-20. Rev. Date: 28 June 2010. Manual part no. 25-0174
- Jagtap, S. S., & Rao, C. V. (2018). Microbial conversion of xylose into useful bioproducts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(21), 9015–9036.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9294-9>
- Jin, D., Ma, J., Li, Y., Jiao, G., Liu, K., Sun, S., Zhou, J. Sun, R. (2022). Development of the synthesis and applications of xylonic acid: a mini-review. *Fuel*, 314, 122773.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122773>.
- Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
- Kanjee, U., & Houry, W. A. (2013). Mechanisms of Acid Resistance in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 65–81. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155708>
- Kawahata, M., Masaki, K., Fujii, T., & Iefuji, H. (2006). Yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid: Acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metal metabolism genes regulated by Aft1p. *FEMS Yeast Research*, 6(6), 924–936.  
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00089.x>
- Keller, G., Ray, E., Brown, P. O., & Winge, D. R. (2001). Haa1, a Protein Homologous to the Copper-regulated Transcription Factor Ace1, Is a Novel Transcriptional Activator. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38697–38702.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M107131200>
- Kim, D. (2018). Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review. *Molecules*, 23(2), 309.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23020309>
- Kim, D., Ximenes, E. A., Nichols, N. N., Cao, G., Frazer, S. E., & Ladisch, M. R. (2016). Maleic acid treatment of biologically detoxified corn stover liquor. *Bioresource Technology*, 216, 437–445. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.086>
- Kim, S. R., Kwee, N.R., Kim, H., Jin, Y.S. (2013). Feasibility of xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing endogenous aldose reductase (GRE3), xylitol dehydrogenase (XYL2), and xylulokinase (XYL3) from *Scheffersomyces stipitis*. *FEMS Yeast Research*, 13, 312–321.  
<https://doi.org/10.1111/1567-1364.12036>.
- Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N. S., & Ladisch, M. R. (2011). Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(4–5), 408–415.  
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.01.007>
- Klinke, H. B., Thomsen, A. B., & Ahring, B. K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(1), 10–26.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1642-2>
- Kohli, K., Prajapati, R., & Sharma, B. (2019). Bio-Based Chemicals from Renewable Biomass for Integrated Biorefineries. *Energies*, 12(2), 233.  
<https://doi.org/10.3390/en12020233>
- Kren, A., Mamnun, Y. M., Bauer, B. E., Schüller, C., Wolfger, H., Hatzixanthis, K., Mollapour, M., Gregori, C., Piper, P., & Kuchler, K. (2003). War1p, a Novel

- Transcription Factor Controlling Weak Acid Stress Response in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 23(5), 1775–1785. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.5.1775-1785.2003>
- Lachaux, C., Frazao, C. J. R., Kraußer, F., Morin, N., Walther, T., & François, J. M. (2019). A New Synthetic Pathway for the Bioproduction of Glycolic Acid From Lignocellulosic Sugars Aimed at Maximal Carbon Conservation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 359. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00359>
- Lang, G. I., Murray, A. W., Botstein, D. (2009). The cost of gene expression underlies a fitness trade-off in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14) 5755-5760. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901620106>.
- Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N. O., & Jönsson, L. J. (2000). Influence of Lignocellulose-Derived Aromatic Compounds on Oxygen-Limited Growth and Ethanolic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84, 16. <https://doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:617>
- Li, B. Z., Balan, V., Yuan, Y.-J., & Dale, B. E. (2010). Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. *Bioresource Technology*, 101(4), 1285–1292. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.044>
- Li, C., Zhao, X., Wang, A., Huber, G. W., & Zhang, T. (2015). Catalytic Transformation of Lignin for the Production of Chemicals and Fuels. *Chemical Reviews*, 115(21), 11559–11624. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00155>
- Linde, M., Jakobsson, E., Galbe, M., & Zacchi, G. (2008). Steam pretreatment of dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 32(4), 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.09.013>
- Liu, C.-G., Xiao, Y., Xia, X. X., Zhao, X. Q., Peng, L., Srinophakun, P., & Bai, F. W. (2019). Cellulosic ethanol production: Progress, challenges and strategies for solutions. *Biotechnology Advances*, 37(3), 491–504. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.002>
- Liu, H., Valdehuesa, K. N. G., Nisola, G. M., Ramos, K. R. M., & Chung, W. J. (2012). High yield production of d-xylonic acid from d-xylose using engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 115, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.065>
- Liu, W.-C., Inwood, S., Gong, T., Sharma, A., Yu, L.-Y., & Zhu, P. (2019). Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(2), 258–271. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1554620>
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D., & Kovar, K. (2015). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1177–1193. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>
- Louie, T.M., Louie, K., DenHartog, S., Gopishetty, S., Subramanian, M., Arnold, M., Das, S. (2021). Production of bio-xylitol from D-xylose by an engineered *Pichia pastoris* expressing a recombinant xylose reductase did not require any auxiliary substrate as electron donor. *Microbial Cell Factories*, 20 (50). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01534-1>.
- Ludovico, P., Sansonetty, F., Silva, M. T., & CÃ´rte-Real, M. (2003). Acetic acid induces a programmed cell death process in the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces*

- bailii. *FEMS Yeast Research*, 3(1), 91–96. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2003.tb00143.x>
- Ludovico, P., Sousa, M. J., Silva, M. T., Leão, C., & Côrte-Real, M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147(9), 2409–2415. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-9-2409>
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249–270. <https://doi.org/10.1002/yea.1208>
- Maranhão A. Q. Transformação Bacteriana. In: De-Souza, M. T., Brígido, M. M., Maranhão, A. Q. (Org.). *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*. Brasília: Editora UnB, 2016. 215-230.
- Martín, C., Klinke, H. B., & Thomsen, A. B. (2007). Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(3), 426–432. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.015>
- Melo, N. T. M., Pontes, G. C., Procópio, D. P., Cunha, G. C. G., Eliodório, K. P., Paes, H. C., Basso, T. O., & Parachin, N. S. (2020). Evaluation of Product Distribution in Chemostat and Batch Fermentation in Lactic Acid-Producing *Komagataella phaffii* Strains Utilizing Glycerol as Substrate. *Microorganisms*, 8(5), 781. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050781>
- Michelin, M., Ximenes, E., de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli, M., & Ladisch, M. R. (2016). Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities. *Bioresource Technology*, 199, 275–278. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.120>
- Mira, N. P., Teixeira, M. C., & Sá-Correia, I. (2010). Adaptive Response and Tolerance to Weak Acids in *Saccharomyces cerevisiae*: A Genome-Wide View. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 14(5), 525–540. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0072>
- Mira, N. P., Becker, J. D., & Sá-Correia, I. (2010). Genomic Expression Program Involving the Haa1p-Regulon in *Saccharomyces cerevisiae* Response to Acetic Acid. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 14(5), 587–601. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0048>
- Mira, N. P., Lourenço, A. B., Fernandes, A. R., Becker, J. D., & Sá-Correia, I. (2009). The *RIM101* pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids. *FEMS Yeast Research*, 9(2), 202–216. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00473.x>
- Modig, T., Lide, G., & Taherzadeh, M. J. (2002). Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 363, 769-776. <https://doi.org/10.1042/bj3630769>
- Mollapour, M., Fong, D., Balakrishnan, K., Harris, N., Thompson, S., Schüller, C., Kuchler, K., & Piper, P. W. (2004). Screening the yeast deletion mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbate, a weak organic acid food preservative. *Yeast*, 21(11), 927–946. <https://doi.org/10.1002/yea.1141>
- Morais Junior, W. G., Pacheco, T. F., Trichez, D., Almeida, J. R. M., & Gonçalves, S. B. (2019). Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *Candida tropicalis* JA2 strain. *Yeast*, 36(5), 349–361. <https://doi.org/10.1002/yea.3394>

- Mosier, N. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Moysés, D., Reis, V., Almeida, J., Moraes, L., & Torres, F. (2016). Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 207. <https://doi.org/10.3390/ijms17030207>
- Naumov G. I., Naumova, E. S., & Boundy-Mills, K. L. (2018). Description of *Komagataella mondaviorum* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 111(7): 1197-1207. doi: 10.1007/s10482-018-1028-6.
- Ndukwe, J. K., Aliyu, G. O., Onwosi, C. O., Chukwu, K. O., & Ezugworie, F. N. (2020). Mechanisms of weak acid-induced stress tolerance in yeasts: Prospects for improved bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Process Biochemistry*, 90, 118–130. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.009>
- Nielsen, J., Larsson, C., van Maris, A., & Pronk, J. (2013). Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.03.023>
- Ohgren, K., Bura, R., Saddler, J., & Zacchi, G. (2007). Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology*, 98(13), 2503–2510. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.003>
- Paes, B. G. (2021). Molecular and physiological responses of *Pichia pastoris* to lignocellulose hydrolysate components. Dissertação de doutorado. Universidade de Brasília.
- Paes, B. G., Steindorff, A. S., Formighieri, E. F., Pereira, I. S., & Almeida, J. R. M. (2021). Physiological characterization and transcriptome analysis of *Pichia pastoris* reveals its response to lignocellulose-derived inhibitors. *AMB Express*, 11(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01170-9>
- Palma, M., Guerreiro, J. F., & Sá-Correia, I. (2018). Adaptive Response and Tolerance to Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: A Physiological Genomics Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9, 274. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00274>
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- Pampulha, M. E., & Loureiro-Dias, M. C. (1990). Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(3). <https://doi.org/10.1007/BF00170063>
- Peña, D. A., Gasser, B., Zanghellini, J., Steiger, M. G., & Mattanovich, D. (2018). Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabolic Engineering*, 50, 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.017>
- Pettersson, A., Almeida, J. R., Modig, T., Karhumaa, K., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G. (2006). A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast*, 23 (6): 455-64. doi: 10.1002/yea.1370. PMID: 16652391.
- François, J. M., Alkim, C. & Morin, N. 2020. Engineering microbial pathways for production of bio-based chemicals from lignocellulosic sugars: current status and perspectives. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 13, 118.
- Piper, P., Calderon, C. O., Hatzixanthis, K., & Mollapour, M. (2001). Weak acid adaptation: The stress response that confers yeasts with resistance to organic acid

- food preservatives. *Microbiology*, *147*(10), 2635–2642. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2635>
- Phaff H. J., Miller, M. W., & Shifrine, M. (1956). The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *22* (2): 145-61. doi: 10.1007/BF02538322.
- Prielhofer, R., Barrero, J. J., Steuer, S., Gassler, T., Zahrl, R., Baumann, K., Sauer, M., Mattanovich, D., Gasser, B., & Marx, H. (2017). GoldenPiCS: A Golden Gate-derived modular cloning system for applied synthetic biology in the yeast *Pichia pastoris*. *BMC Systems Biology*, *11*(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0492-3>
- Puppán, D. (2002). Environmental evaluation of biofuels. *Periodica Polytechnica Social and Management Sciences*, *10*(1), 95-116.
- Qiao, Y., Li, C., Lu, X., Zong, H., & Zhuge, B. (2021). Transporter engineering promotes the co-utilization of glucose and xylose by *Candida glycerinogenes* for d-xylonate production. *Biochemical Engineering Journal*, *175*, 108150. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108150>
- Ramos, T. G. S., Justen, F., Carneiro, C. V. G. C., Honorato, V. M., Franco, P. F., Vieira, F. S., Trichez, D., Rodrigues, C. M., & Almeida, J. R. M. (2021). Xylonic acid production by recombinant *Komagataella phaffii* strains engineered with newly identified xylose dehydrogenases. *Bioresource Technology Reports*, *16*, 100825. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100825>
- Rémond, C., Aubry, N., Crônier, D., Noël, S., Martel, F., Roge, B., Rakotoarivonina, H., Debeire, P., & Chabbert, B. (2010). Combination of ammonia and xylanase pretreatments: Impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw. *Bioresource Technology*, *101*(17), 6712–6717. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.115>
- Renewable Energy Statistics (2021). The International Renewable Energy Agency, Abu Dhabi.
- Rudolf, A., Alkasrawi, M., Zacchi, G., & Lidén, G. (2005). A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology*, *37*(2), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.02.013>
- Rutherford, J. C. and Bird, A. J. (2004). Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryotic Cell*, *3*, 1-13. <https://doi.org/10.1128/EC.3.1.1-13.2004>.
- Salusjärvi, L., Havukainen, S., Koivistoinen, O., & Toivari, M. (2019). Biotechnological production of glycolic acid and ethylene glycol: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(6), 2525–2535. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09640-2>
- Sárvári Horváth, I., Franzén, C. J., Taherzadeh, M. J., Niklasson, C., & Lidén, G. (2003). Effects of Furfural on the Respiratory Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in Glucose-Limited Chemostats. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(7), 4076–4086. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4076-4086.2003>
- Sassner, P., Mårtensson, C. G., Galbe, M., & Zacchi, G. (2008). Steam pretreatment of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-impregnated *Salix* for the production of bioethanol. *Bioresource Technology*. *99* (1): 137-45. doi: 10.1016/j.biortech.2006.11.039.
- Schüller, C., Mamnun, Y. M., Mollapour, M., Krapf, G., Schuster, M., Bauer, B. E., Piper, P. W., & Kuchler, K. (2004). Global Phenotypic Analysis and Transcriptional Profiling Defines the Weak Acid Stress Response Regulon in *Saccharomyces*

- cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2), 706–720. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-05-0322>
- Scott, M., Gunderson, C. W., Mateescu, E. M., Zhang, Z. G., Hwa, T. (2010). Interdependence of Cell Growth and Gene Expression: Origins and Consequences. *Science*, 330, 1099–1102. doi: 10.1126/science.119258.
- Scully, M. J., Norris, G. A., Alarcon Falconi, T. M., & MacIntosh, D. L. (2021). Carbon intensity of corn ethanol in the United States: State of the science. *Environmental Research Letters*, 16(4), 043001. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/abde08>
- Seibert-Ludwig, D., Hahn, T., Hirth, T., & Zibek, S. (2019). Selection and optimization of a suitable pretreatment method for miscanthus and poplar raw material. *GCB Bioenergy*, 11(1), 171–180. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12575>
- Sharma, S., & Arora, A. (2020). Tracking strategic developments for conferring xylose utilization/fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 70(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01590-9>
- Shin, H. Y., Nijland, J. G., de Waal, P. P., de Jong, R. M., Klaassen, P., & Driessen, A. J. M. (2015). An engineered cryptic Hxt11 sugar transporter facilitates glucose–xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 176. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0360-6>
- Simões, T., Mira, N. P., Fernandes, A. R., & Sá-Correia, I. (2006). The *SP11* Gene, Encoding a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Cell Wall Protein, Plays a Prominent Role in the Development of Yeast Resistance to Lipophilic Weak-Acid Food Preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7168–7175. <https://doi.org/10.1128/AEM.01476-06>
- Singh, J., Suhag, M., & Dhaka, A. (2015). Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. *Carbohydrate Polymers*, 117, 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.012>
- Siripong, W., Wolf, P., Kusumoputri, T. P., Downes, J. J., Kocharin, K., Tanapongpipat, S., & Runguphan, W. (2018). Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of isobutanol and isobutyl acetate. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-1003-x>
- Soares, C. E. V. F., Bergmann, J. C., & de Almeida, J. R. M. (2021). Variable and dose-dependent response of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts toward lignocellulosic hydrolysate inhibitors. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(2), 575–586. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00489-0>
- Stichnothe, H., Bell, G., & Jørgensen, H. (2020). Bio-Based Chemicals - A 2020 Update. IEA Bioenergy. *Ed de Jong, Avantium (The Netherlands)*. 79.
- Stratton, J., Chiruvolu, V., Meagher, M., (1998). “High cell-density fermentation. In: *Pichia Protocols*”. *Humana Press*, New Jersey. 107–120.
- Sundar L. M. S., & Nampoothiri K. M. (2021). An overview of the metabolically engineered strains and innovative processes used for the value addition of biomass derived xylose to xylitol and xylonic acid. *Bioresource Technology*, 345, 126548. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126548.
- Sundar, M. S. L., Susmitha, A., Rajan, D., Hannibal, S., Sasikumar, K., Wendisch, V. F., & Nampoothiri, K. M. (2020). Heterologous expression of genes for bioconversion of xylose to xylonic acid in *Corynebacterium glutamicum* and optimization of the bioprocess. *AMB Express*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01003-9>



- Toivari, M. H., Nygård, Y., Penttilä, M., Ruohonen, L., & Wiebe, M. G. (2012). Microbial d-xylonate production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4288-5>
- Toivari, M., Nygård, Y., Kumpula, E.-P., Vehkomäki, M.-L., Benčina, M., Valkonen, M., Maaheimo, H., Andberg, M., Koivula, A., Ruohonen, L., Penttilä, M., & Wiebe, M. G. (2012). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of d-xylose to d-xylonate. *Metabolic Engineering*, 14(4), 427–436. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.03.002>
- Toivari, M., Vehkomäki, M.-L., Nygård, Y., Penttilä, M., Ruohonen, L., & Wiebe, M. G. (2013). Low pH d-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. *Bioresource Technology*, 133, 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.157>
- Trichez, D., Carneiro, C. V. G. C., Braga, M., & Almeida, J. R. M. (2022). Recent progress in the microbial production of xylonic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(7), 127. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03313-5>
- van Maris, A. J. A., Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A. H., Wisselink, H. W., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90(4), 391–418. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9085-7>
- Verduyn, C. (1991). Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 60, 325–353. <https://doi.org/10.1007/BF00430373>
- Vogl, T., & Glieder, A. (2013). Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnology*, 30(4), 385–404. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.010>
- Wang, C., Wei, D., Zhang, Z., Wang, D., Shi, J., Kim, C. H., Jiang, B., Han, Z., & Hao, J. (2016). Production of xylonic acid by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 10055–10063. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7825-9>
- Wang, S., Sun, X., & Yuan, Q. (2018). Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: A review. *Bioresource Technology*, 258, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.064>
- Wang, Y., Xian, M., Feng, X., Liu, M., & Zhao, G. (2018). Biosynthesis of ethylene glycol from D -xylose in recombinant *Escherichia coli*. *Bioengineered*, 9(1), 233–241. <https://doi.org/10.1080/21655979.2018.1478489>
- Warnecke, T., & Gill, R. T. (2005). Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-25>
- Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V., & Cregg, J. M. (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 186(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00675-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00675-0)
- Weimberg, R. (1961). Pentose Oxidation by *Pseudomonas fragi*. *Journal of Biological Chemistry*, 236(3), 629–635. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64279-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64279-6)
- Werpy, T., & Petersen, G. (2004). “Top Value-Added Chemicals from Biomass: Volume I - Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas” (DOE/GO-102004-1992, 15008859; p. DOE/GO-102004-1992, 15008859). <https://doi.org/10.2172/15008859>
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C. P., & Boles, E. (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block

- uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 464(3), 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01698-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01698-1)
- Yamada, R., Ogura, K., Kimoto, Y., & Ogino, H. (2019). Toward the construction of a technology platform for chemicals production from methanol: D-lactic acid production from methanol by an engineered yeast *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(2), 37. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2610-4>.
- Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K., Mikata., K. (1995). The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of Komagataella Gen. Nov (*Saccharomycetaceae*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 59 (3) 439–444. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.439>.
- Yang, Z., & Zhang, Z. (2018). Production of (2R, 3R)-2,3-Butanediol Using Engineered *Pichia Pastoris*: Strain Construction, Characterization and Fermentation. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 11 (35). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1031-1>.
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475–501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>.
- Zamora, F., Bueno, M., Molina, I., Iribarren, J. I., Muñoz-Guerra, S., Galbis, J. A. (2000). Stereoregular copolyamides derived from D-Xylose and L-Arabinose. *Macromolecules*, 33, 2030-2038. <https://doi.org/10.1021/ma9916436>
- Zeugin J, Hartley, J L. (1985). “Ethanol Precipitation of DNA”. *Focus*. 7 (4) 1–2.
- Zhang, Y., Guo, S., Wang, Y., Liang, X., Xu, P., Gao, C., & Ma, C. (2019). Production of D- Xylonate from Corn Cob Hydrolysate by a Metabolically Engineered *Escherichia coli* Strain. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7 (2), 2160–2168. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b04839>.
- Zhao, Z., Xian, M., Liu, M., & Zhao, G. (2020). Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. *Biotechnology for Biofuels*, 13 (1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1662-x>.
- Zhou, Z., Liu, D., & Zhao, X. (2021). Conversion of lignocellulose to biofuels and chemicals via sugar platform: An updated review on chemistry and mechanisms of acid hydrolysis of lignocellulose. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 146, 111169. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111169>.