



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Biologia
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

Dissertação de Mestrado

**ENGENHARIA METABÓLICA PARA A PRODUÇÃO DE ETILENO GLICOL POR
Komagataella phaffii A PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA**

NATHALIA ALINE MONTEIRO TORRES

**Brasília – DF
2024**

Embrapa

Agroenergia

NATHALIA ALINE MONTEIRO TORRES

**ENGENHARIA METABÓLICA PARA A PRODUÇÃO DE ETILENO GLICOL POR
*Komagataella phaffii***

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília como parte dos
requisitos parciais para obtenção do título
de mestre ou doutor pelo Programa de
Pós-Graduação em Biologia Microbiana.

Orientador (a):

Dr. João Ricardo Moreira de Almeida

Co-orientador:

Dr^a Viviane Castelo Branco Reis

**Brasília –DF
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

Torres, N. A. M.

Engenharia metabólica para a produção de etileno glicol por *Komagataella phaffii*

Nathalia Aline Monteiro Torres

Brasília, 2024.

Número de páginas: 71.

Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana,
Universidade de Brasília, Brasília, DF.

- I- Palavras chaves: *Engenharia metabólica, Etileno glicol, Komagataella phaffii*
- II- Universidade de Brasília. PPG/BioMicro.
- III- Título do trabalho com inicial em maiúsculo e onde mais necessitar de acordo com as normas de português

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-Gaduação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Dr. João Ricardo Moreira de Almeida. Apoio CAPES.

Engenharia metabólica para a produção de etileno glicol por *komagataella phaffii*

NATHALIA ALINE MONTEIRO TORRES

DISSERTAÇÃO TESE APROVADA DA EM: ____/____/____

Profº. Dr. – Universidade de Brasília – UnB
(Membro interno)

Prof. Dr. – Instituição
(Membro externo)

Prof. Dr. – Instituição
(Membro externo)

Prof. Dr.– Universidade de Brasília - UnB
Membro interno (Suplente)

Profª. Dra. (Orientador (a) / Presidente)

**BRASÍLIA – DF
2024**

*Dedico essa dissertação aos meus pais que apesar de terem tido os pés impedidos de correr,
foram capazes de gerar filhos com asas nos pés.*

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que fizeram parte desta jornada. O trabalho árduo e dedicação empregados nas atividades descritas são apenas uma parte do todo. Embora os resultados não tenham alcançado o patamar de publicação na *Nature*, o que vocês lerão a seguir representa a "melhor parte" de todo o processo.

A jornada de um estudante que se propõe a ingressar no mestrado é desafiadora por si só. São inúmeras aprendizagens e desafios, assemelhando-se a uma montanha-russa. No entanto, o que não está escrito no *script* são os imprevistos e as más notícias.

Na reta final para a defesa, perdi minha amada avó, Aline, após uma batalha injusta contra o câncer. Embora a luta tenha sido árdua, tivemos a oportunidade de nos despedir dia após dia, tornando cada momento ainda mais precioso. O luto que se seguiu não foi fácil, mas a vida continuou e, quando menos esperava, retornei à segurança da rotina no laboratório.

Não poderia imaginar que viveria o luto novamente em abril de 2024, quando perdi tragicamente minha tia, Diacuir. Desta vez, tudo foi diferente; me vi desorientada e sem chão, mergulhada na tristeza e na dor. No entanto, Deus demonstrou sua infinita bondade através das pessoas ao meu redor.

Aos meus pais, é difícil expressar em palavras o imenso sacrifício e dedicação que demonstraram ao longo de suas vidas para me proporcionar as oportunidades que tive. Vocês construíram um lar seguro e repleto de amor, um refúgio para onde posso sempre retornar. Em cada desafio que enfrentei, vocês estiveram lá, com palavras de conforto e incentivo, prontos para me apoiar. Seu apoio inabalável moldou meu caráter e será um legado que levarei comigo para o resto da vida e transmitirei aos meus filhos.

Aos meus irmãos mais novos, Pedro, Anna Júlia e Anna Carolina, digo apenas uma coisa: o impossível é apenas uma questão de perspectiva. Vocês são capazes de conquistar qualquer coisa que se proponham a fazer.

Ao meu companheiro, Luís Felipe, agradeço por escolher ficar ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis. Você me ensinou que o amor é uma escolha consciente e constante, uma jornada de apoio mútuo, compreensão e crescimento. Sua presença e apoio foram fundamentais para que eu enfrentasse os desafios com coragem e determinação. Sou profundamente grata por compartilhar essa jornada chamada vida ao seu lado.

Aos meus amigos e colegas de bancada, Alessa, Ananda André, Eduardo, Giovanna, Isabela, Júlia, Laura, Marciano, Mariana, Matheus, Raissa, Rodrigo e Valquíria, agradeço por tornarem esta jornada mais leve. As horas passadas juntos ficarão marcadas para sempre em minha memória.

Para o Túlio, que de companheiro de bancada se tornou um irmão, não há palavras suficientes para expressar minha gratidão. Além de ser uma excelente dupla de trabalho, você é indiscutivelmente uma das pessoas mais inteligentes que já conheci. Em momentos de grande dificuldade, quando meu mundo parecia desmoronar, você esteve lá para me apoiar incondicionalmente. Seu apoio foi muito além do braçal; foi emocional e psicológico, sustentando-me nos momentos mais desafiadores. Sua amizade é extraordinária, e estarei sempre ao seu lado para testemunhar suas conquistas. Estou confiante de que você alcançará grandes feitos e quero estar sempre perto para te ver alcançar as estrelas, você vai longe.

Para meu querido orientador, João, gostaria de expressar minha sincera gratidão por sua orientação excepcional ao longo deste processo. Desde o momento em que entrei em sua sala para discutir os próximos dois anos da minha vida, percebi que estava diante de alguém extraordinário. Você não apenas me deu uma oportunidade, mas também estendeu a mão e me apoiou nos momentos mais difíceis. Mesmo quando eu duvidava das minhas capacidades, você sempre viu o meu potencial e me incentivou a continuar. Seu coração admirável e sua dedicação aos seus alunos são verdadeiramente inspiradores. Se eu sair deste mestrado com uma fração do conhecimento que você possui, considerarei que atingi um grande marco na vida. E, apesar de me autodenominar sua aluna favorita (opinião esta que só eu considero válida), prometo continuar enchendo sua paciência e compartilhando as conquistas adquiridas com o tempo no laboratório. Obrigada por tudo.

Para a Viviane, que não apenas foi uma orientadora maravilhosa, mas também se mostrou uma mulher extraordinária, gostaria de expressar minha profunda gratidão. Você foi o consolo de Deus para o meu coração em momentos de grande dificuldade. Muitas vezes, eu entrava e saía do laboratório com a alma devastada, sentindo-me isolada mesmo cercada por outras pessoas. Você enxergou além das aparências, acolheu-me com carinho, acreditou em mim e tem sido uma luz em minha jornada. Sua compaixão e apoio foram inestimáveis, e sou imensamente grata por sua presença em minha vida.

Aos analistas do laboratório, Diogo, Thais, Livia e Lorena, expresso meus sinceros agradecimentos pela ajuda e treinamento em uma variedade de equipamentos. Seu apoio foi fundamental para o sucesso deste trabalho.

Para a querida Thalyta, meu especial agradecimento não apenas por ter me ensinado muitas coisas, mas também por me convencer de que o mestrado passaria rápido e seria uma experiência única. Suas palavras foram quase proféticas, e estou imensamente grata por sua orientação e amizade durante este período.

A todos que contribuíram de alguma forma para esta jornada, meu mais sincero obrigado. Seus esforços e apoio foram fundamentais para minha conquista. Que possamos continuar compartilhando muitas outras vitórias.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana (PPG-BioMicro)

Resumo

A mudança para uma economia circular é fundamental para abordar as crescentes ameaças ambientais e de saúde pública. Os carboidratos da biomassa vegetal representam uma fonte promissora de matéria-prima para bioprocessos, permitindo a produção sustentável de compostos químicos por meio de fontes renováveis. Com diversas aplicações industriais, o etileno glicol (EG), um composto orgânico de 2-carbonos, desempenha um papel fundamental como matéria-prima na fabricação de tereftalato de polietileno (PET), fluidos anticongelantes, solventes, polímeros e resinas. Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma linhagem de levedura recombinante de *K. phaffii* capaz de produzir EG a partir de xilose por meio de uma nova rota biossintética baseada na via de Dahms. A via é composta pelas enzimas XDH (xilose desidrogenase), XD (xilonato desidratase), ALDO (dehidro-deoxi xilonato aldolase) e ALDR (aldeído redutase). Entretanto observou-se que essa linhagem também foi capaz de oxidar glicolaldeído à ácido glicólico (AG) por meio da atividade de aldeído desidrogenase (ALDH) endógena. Visando identificar ALDH(s) e ALDH(s) nativas da levedura, 6 genes putativos para ALDR e ALDH foram selecionados e usados para construção de módulos de deleção baseados na toxina mazF de *Escherichia coli*. Inicialmente, para gerar sequências flanqueadoras nos cassetes de deleção, fragmentos de 1.293 a 1.916 pb correspondentes aos genes alvos foram amplificados e clonados no vetor pGEM-T easy. Em seguida, cada plasmídeo foi digerido com enzimas de restrição específicas, e o cassete de deleção contendo 4.796 pb, foi inserido entre as sequências flanqueadoras do gene alvo. Foram construídos os plasmídeos pGem-ALD6_mazF, pGem-YDR541C_mazF, onde os últimos caracteres representam o gene alvo de *K. phaffii*. Posteriormente, os módulos foram liberados do vetor por digestão com *notI*, e usados para transformar a levedura. Após ciclos de transformação e confirmação, foi possível obter uma linhagem recombinante com a deleção do gene *YDR541C*. Análises em andamento estão sendo realizadas para confirmar o efeito da deleção na produção de EG e AG e no metabolismo da levedura. Paralelamente, uma série de fermentações em biorreator de bancada foi conduzida, explorando diferentes condições de pH e pO₂ (pressão parcial de oxigênio) a fim de determinar as melhores condições para a produção de EG. Apesar de não ser possível determinar as condições ótimas de produção, obteve-se 47,5% de aumento de produção de EG em condição estabelecida nesse trabalho em comparação a anterior.

Palavras chave: Engenharia metabólica, Etileno glicol, *Komagataella phaffii*

Abstract

The transition to a circular economy is paramount to address the escalating environmental and public health threats. Carbohydrates from plant biomass serve as a promising raw material for bioprocesses, enabling sustainable production of chemical compounds from renewable sources. With various industrial applications, ethylene glycol (EG), a two-carbon organic compound, plays a pivotal role as a raw material in the manufacture of polyethylene terephthalate (PET), antifreeze fluids, solvents, polymers, and resins. In previous studies, our research group developed a recombinant yeast strain of *K. phaffii* capable of producing EG from xylose via a novel biosynthetic pathway based on the Dahms pathway. The pathway comprises the enzymes XDH (xylose dehydrogenase), XD (xylonate dehydratase), ALDO (dehydro-deoxy xylonate aldolase), and ALDR (aldehyde reductase). However, it was observed that this strain was also capable of oxidizing glycolaldehyde to glycolic acid (GA) through the activity of endogenous aldehyde dehydrogenase (ALDH). Aiming to identify native ALDH(s) and ALDR(s) of the yeast, six putative genes for ALDR and ALDH were selected and used to construct deletion modules based on Escherichia coli mazF toxin. Initially, to generate flanking sequences in the deletion cassettes, fragments ranging from 1,293 to 1,916 bp corresponding to the target genes were amplified and cloned into the pGEM-T easy vector. Subsequently, each plasmid was digested with specific restriction enzymes, and the 4,796 bp deletion cassette was inserted between the flanking sequences of the target gene. The plasmids pGem-ALD6_mazF and pGem-YDR541C_mazF were constructed, where the last characters represent the target gene of *K. phaffii*. Subsequently, the modules were released from the vector by digestion with NotI, and used to transform the yeast. After cycles of transformation and confirmation, it was possible to obtain a recombinant strain with the deletion of the YDR541C gene. Ongoing analyses are being conducted to confirm the effect of the deletion on EG and GA production and yeast metabolism. Meanwhile, a series of fermentations in benchtop bioreactors were conducted, exploring different pH and pO₂ (partial pressure of oxygen) conditions to determine the optimal conditions for EG production. Although it was not possible to determine the optimal production conditions, a 47.5% increase in EG production was achieved under conditions established in this study compared to previous ones.

Key words: Metabolic engineering, Ethylene glycol, *Komagataella phaffii*.

Lista de Abreviações:

°C: Graus Celsius

(m/v): Massa/Volume

M: Molar

g: Gramas

pb: Pares de base

EG: Etileno Glicol

AG: Ácido Glicólico

GA: Glicolaldeído

LB: Meio Luria-Bertani

YPD: Extrato de Levedura Peptona Dextrose

YPEG: Extrato de Levedura Peptona, Dextrose e Etileno Glicol

YPAG: Extrato de Levedura Peptona, Dextrose e Ácido Glicólico

YPGA: Extrato de Levedura Peptona, Dextrose e Glicolaldeído

YPR: Extrato de Levedura Peptona e Ramnose

ALDR: Aldeído Redutase

ALDH: Aldeído desidrogenase

ADH: Álcool desidrogenase

MTPa: Milhões de toneladas por ano

Lista de Figuras

Figura 1. Representação da Estrutura e composição da biomassa lignocelulósica.	8
Figura 2. Representação das diferentes vias do Metabolismo de xilose em microrganismos	14
Figura 3. Vias biossintéticas para obtenção de etileno glicol e ácido glicólico	16
Figura 4. Ilustração de produtos químicos formados a partir de diferentes fontes de carbono por cepas de <i>K. phaffii</i> modificadas.	20
Figura 5. Estratégia adotada para aumentar a produção de EG.	22
Figura 6. Estratégia de deleção dos genes alvo.	31
Figura 7. Esquema de construção do módulo de deleção.	44
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) mostrando a amplificação por PCR dos seis genes alvo a partir do DNA molde da <i>K. phaffii</i> .	45
Figura 9. Gel de agarose (0,8%) mostrando a digestão de confirmação para os seis plasmídeos construídos.	47
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) que confirma a construção dos plasmídeo.	49
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose (0,8%). Em A digestões com PvuII para as colônias 1-3 dos transformantes do pGemT-Easy_ALD4_mazF.	50
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose (0,8%). Em A digestões com PvuII para as colônias 1-3 dos transformantes do pGemT-Easy_ADH7_mazF.	51
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose (0,8%). Na Figura A, digestão do vetor pGemT-Easy_SORI com as enzimas <i>BamHI</i> e <i>Kpn</i> .	52
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) purificação dos módulos ALD6_mazF e YDR541C_mazF.	53
Figura 15. Ilustração representativa dos fragmentos esperados da PCR multiplex para confirmação da integração do módulo de deleção no genoma de <i>K. phaffii</i> .	54
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose (0,8%). PCR multiplex utilizando os primers <i>YDR541C</i> -NotI-F, <i>YDR541C</i> -PstI-R e InpLRA-R.	55
Figura 17. 13Eletroforese em gel de agarose (0,8%). PCR multiplex utilizando os primers ALD6-XhoI-F, ALD6-XhoI-R e Seq-MDH-R para confirmar a deleção do gene ALD6.	56
Figura 18. Ilustração representativa dos fragmentos esperados da PCR usando os primers Seq-MDH-F e InHyg-R	57

- Figura 19.** Eletroforese em gel de agarose (0,8%). PCR de colônia dos transformantes do gene *ALD6* usando os primers Seq-MDH-F e InHyg-R 57
- Figura 20.** Eletroforese em gel de agarose (0,8%). PCR de colônia dos transformantes do gene *YDR541C* usando os primers Seq-MDH-F e InHyg-R 58
- Figura 21.** Gráficos gerados pelo programa *statistics*. 61

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos da geração global de lignocelulose..	6
Tabela 2. Variações dos componentes químicos da lignocelulose de acordo com a fonte de origem. (Adaptado de (ZHAO et al., 2022).	8
Tabela 3. Dados de Produção de Etileno Glicol por diferentes vias Metabólicas.	17
Tabela 4. Características das linhagens usadas neste trabalho.	25
Tabela 5. Lista dos genes usados nesse trabalho e suas características.	26
Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.	28
Tabela 7. Tamanho esperado de cada gene seguido pela temperatura de anelamento dos primers usadas na reação de PCR.	31
Tabela 8. Reagentes e suas proporções empregadas nas reações de PCR.	31
Tabela 9. Enzimas de restrição usadas para a linearização dos plasmídeos e inserção do cassette de seleção e contrasseleção.	35
Tabela 10. Enzimas de restrição usadas para excisar os módulos de deleção.	36
Tabela 11. Reagentes e suas proporções empregados nas reações de PCR de colônia.	37
Tabela 12. Pontos Axiais, Fatoriais e centrais codificados.	38
Tabela 13. Parâmetros de ph e PO2 das fermentações.	38
Tabela 14. Metodologia empregada na análise quantitativa de amostras por HPLC e UPLC.	40
Tabela 15. Enzimas de restrição usadas para confirmar a clonagem dos genes alvo e o cassette de seleção e contrasseleção no vetor comercial.	46
Tabela 16. Dados da Produção de EG por cada condição realizada.	58
Tabela 17. Tabela com os blocos e as respectivas condições testadas e o número do vaso do fermentador usado.	61

Sumário

Resumo	2
Abstract	3
1.	6
1.1.	Biomassa lignocelulósica 8
1.2.	Metabolismo de Xilose 14
1.3.	Etileno Glicol 17
1.4.	Komagataella phaffii 21
2.	16
2.1.	Objetivos Específicos 23
3.	16
3.1.	Materiais 24
3.1.1.	Meios de cultura 24
3.1.2.	Soluções 26
3.1.3.	Marcadores de peso molecular 27
3.1.4.	Linhagens utilizadas 27
3.1.5.	Genes e plasmídeos 28
-	Sistema de seleção e contrasseleção 29
3.2.	Metodologia 32
3.2.1.	Construção do módulo de deleção 32
3.2.1.1	26
3.2.1.2	28
3.2.1.3	28
3.2.1.4	29
3.2.1.5	29
3.2.1.6	29
3.2.1.7	30
3.2.2.	Transformação de 32
3.2.3.	PCR de colônia de 33
3.3.	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 41
3.4.	Análise e quantificação dos metabólitos por UPLC 42
3.5.	Preparo das amostras para o peso seco 43

4.1.	Seleção dos genes putativos para ALDH e ALDR	44
4.2.	Construção dos módulos de deleção	45
4.2.2.	Clonagem dos fragmentos gênicos e do cassete de seleção e contrasseleção no pGEM-T Easy	48
4.2.3.	-Clonagem do cassete de seleção e contrasseleção no vetor com o gene alvo.	50
4.2.4.	Deleção dos genes alvo em 47	
4.3.	Fermentação em biorreator	61
	Perspectivas	65

1. Introdução

Biomassa lignocelulósica

A exploração extensiva de recursos de petróleo ou combustíveis fósseis para a produção de energia, produtos químicos e materiais sintéticos tem acarretado não apenas o esgotamento dos recursos naturais não renováveis, mas também altas emissões de gases de efeito estufa, resultando em impactos ambientais significativos (LEONG *et al.*, 2021). Diante dessa realidade, a busca por alternativas sustentáveis tem se tornado cada vez mais relevante e urgente.

Nesse contexto, a biomassa vegetal emerge como um recurso renovável promissor por ser o recurso de carbono renovável mais abundante do planeta. A biomassa vegetal é uma combinação de todo o material orgânico proveniente das plantas. Essa biomassa é composta principalmente por material derivado de plantas, incluindo troncos, galhos, folhas, sementes e cascas. Um subconjunto específico dessa biomassa é a biomassa lignocelulósica, que se refere a materiais ricos em lignocelulose. É importante destacar que as indústrias agrícolas e de processamento de alimentos produzem resíduos lignocelulósicos em quantidades expressivas, estimadas em cerca de 1,3 bilhão de toneladas por ano (Tabela 1) (DHARMARAJA *et al.*, 2023). Diante desse panorama, compreende-se a importância de explorar o potencial da biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de diferentes produtos. Essa exploração exige o desenvolvimento de processos eficientes e sustentáveis de conversão da biomassa em produtos de valor agregado.

Tabela 1. Exemplos da geração global de lignocelulose (Adaptado de (ZHAO et al., 2022).

País	Quantidade (Milhões de toneladas por ano)	Origem do resíduo lignocelulósico	Referência
Brasil	196,2	Cana-de-açúcar	EPE., 2020
China	900	Palha de milho, trigo e arroz	MA <i>et al.</i> , 2020
Estados Unidos	150	Palha de milho	NDAYISENGA <i>et al.</i> , 2021
Índia	605	Resíduos da produção de cereais	TRIPATHI <i>et al.</i> , 2019
Indonésia	532,4	Vagens de cacau	NURIKA, 2019
Rússia	287,5	Madeira	TRIPATHI <i>et al.</i> , 2019

A parede celular das plantas possui uma estrutura rígida de celulose que é coberta por porções de lignina e hemicelulose como ilustrado na Figura 1 esse emaranhado confere robustez a estrutura que é constituída pelos três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina cujas proporções variam de acordo com a origem da biomassa, conforme evidenciado na Tabela 2 (ANU *et al.*, 2020) .

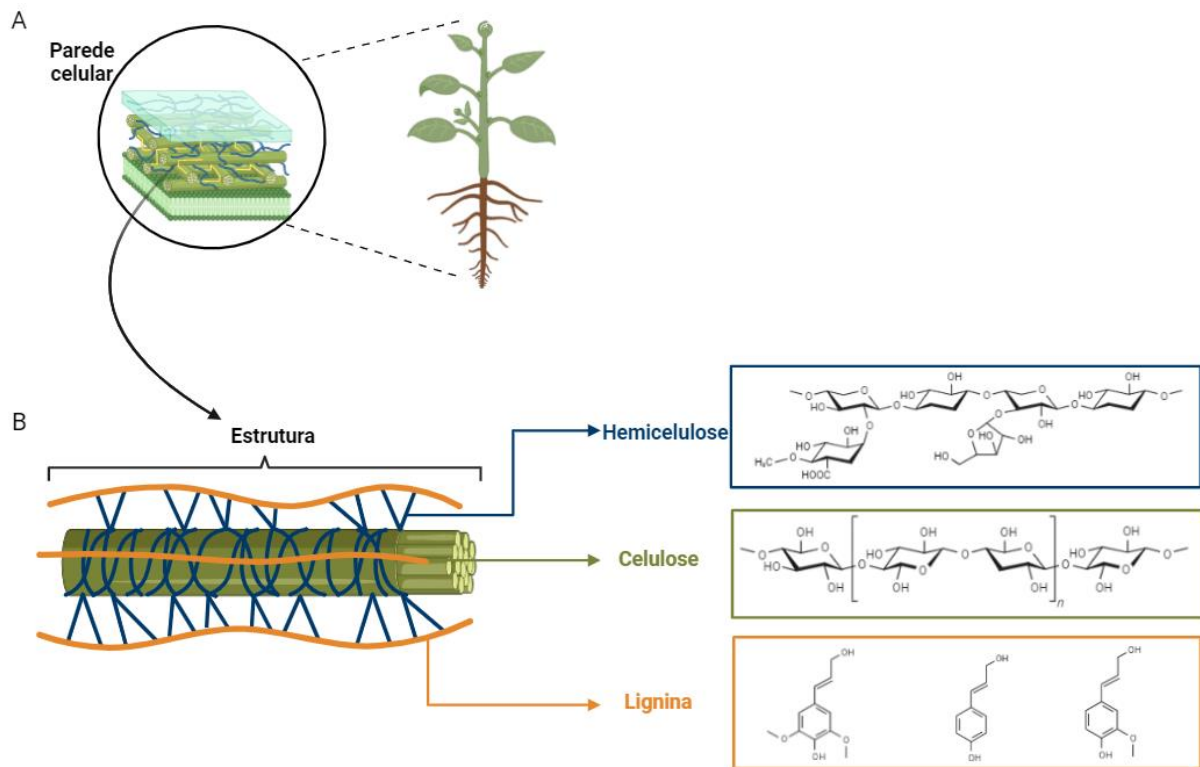


Figura 1. Representação da Estrutura e composição da biomassa lignocelulósica. (Fonte: A autora, 2023)

A celulose é um polissacarídeo composto por cadeias lineares de glicose unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4). Essas cadeias de celulose se organizam em uma estrutura altamente cristalina, por meio de interações de pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, resultando na formação de microfibrilas que, por sua vez, se agregam em fibras (ASHOKKUMAR *et al.*, 2022).

A hemicelulose, um heteropolímero amorfo e variável, é composta por unidades de açúcares como xilose, glicose e galactose. Embora a hemicelulose esteja amplamente disponível, a diversidade de unidades de açúcar varia dependendo da fonte de biomassa lignocelulósica (ZOGHLAMI; PAËS, 2019).

A lignina é uma componente chave da parede celular das plantas, fornecendo rigidez e suporte estrutural. É composta por uma matriz complexa de polímeros ramificados de cadeia longa, que estão ligados à hemicelulose por meio de pontes de hidrogênio e ligações covalentes. Essa composição heterogênea contribui para a resistência e integridade das paredes celulares.

As unidades básicas da lignina são os monolignóis (blocos poliméricos), que incluem o cumaril (H), o coniferil (G) e o álcool sinapil (S) (Figura 1 B). Essas unidades são polimerizadas para formar a estrutura tridimensional da lignina. As ligações entre essas unidades são principalmente ligações covalentes carbono-carbono e éter arílico, que são formadas durante processos de polimerização e condensação radical (SCELSI *et al.*, 2021) .

Ela desempenha uma importante função estrutural na lignocelulose, proporcionando estabilidade e integridade à celulose e à hemicelulose. Assim como a hemicelulose, a composição da lignina pode variar de acordo com a biomassa utilizada, resultando em diferentes concentrações de suas unidades monoméricas. (DHARMARAJA *et al.*, 2023).

Tabela 2. Variações dos componentes químicos da lignocelulose de acordo com a fonte de origem. (Adaptado de (ZHAO *et al.*, 2022).

Matéria Prima	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Palha de arroz	38,82	27,59	19,550	(ZAHOOR <i>et al.</i> , 2021)
Palha de trigo	35,69	29,68	18,80	(ZIAEI-RAD <i>et al.</i> , 2021)
Palha de milho	32,75	31,08	10,07	(WANG <i>et al.</i> , 2020)
Palha de feijão	31,1	23,9	9,7	(MONTOYA-ROSALES <i>et al.</i> , 2020)
<i>Switchgrass</i>	31,8	25	31,2	(BONFIGLI O <i>et al.</i> , 2021)
Vagens de cacau	26,1	4,82	21,29	(ANTWI <i>et al.</i> , 2019)
Pseudocaules de bananeira	33,3	18,2	5,5	(PAN <i>et al.</i> , 2020)

Cana de açúcar	37,72	22,95	22,34	(a LIU, Y. <i>et al.</i> , 2021; LIU, Z.-H. <i>et al.</i> , 2021 b)
Oliveira	36,5	21,3	24,1	(FONSECA <i>et al.</i> , 2020)

A etapa de pré-tratamento é essencial para tornar a celulose mais acessível e disponibilizar as unidades de açúcar necessárias para o processo de fermentação por microrganismos para a produção de produtos desejáveis (MANKAR *et al.*, 2021). O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica pode aumentar a produção de açúcares fermentáveis em até 90%, em comparação com os cerca de 20% obtidos sem pré-tratamento (DAVID *et al.*, 2023). Os métodos de pré-tratamento são comumente classificados em quatro categorias: físico, químico, físico-químico, e biológico. O pré-tratamento físico compreende moer, triturar ou lascas a partícula de biomassa para reduzir seu tamanho e diminuir a cristalinidade da celulose, aumentando assim sua disponibilidade de superfície para a atuação de enzimas hidrolíticas. Dentre os tratamentos físicos se destaca a abordagem assistida por micro-ondas pois apresenta vários benefícios, incluindo um tempo de processo rápido, baixo consumo de energia e baixa formação de inibidores (JASMINE *et al.*, 2023).

O Pré-tratamento químico conta com o uso de produtos químicos como ácidos, bases, solventes orgânicos e agentes oxidantes que são empregados para facilitar o processo de hidrólise. Entre os procedimentos de pré-tratamento tradicionais em escala industrial, o tratamento com ácido se destaca como o mais amplamente empregado, pois possui a capacidade de solubilizar a hemicelulose, deixando a lignina e a celulose na mesma fração. Ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido nítrico são comumente utilizados para o tratamento da biomassa, sendo aplicados em duas condições distintas: ácido diluído em altas temperaturas (>150 °C) e ácido concentrado em baixas temperaturas (DAVID *et al.*, 2023). No entanto, esse processo gera compostos tóxicos e nocivos (furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácidos fenólicos e aldeídos) tanto ao ser humano quanto aos microrganismos que têm potencial de fermentar os açúcares gerados ao final do processo. (LORENCI WOICIECHOWSKI *et al.*, 2020).

O pré-tratamento físico-químico da biomassa lignocelulósica envolve a quebra da estrutura refratária por meio de métodos como explosão de fibra de amônia (AFEX) (ZHAO, C. *et al.*, 2020), água subcrítica (HAMRAOUI *et al.*, 2020) ou explosão de vapor (YUAN *et al.*, 2020), utilizando amônia líquida e vapor de alta pressão como catalisadores.

O pré-tratamento biológico é uma abordagem eficiente, de baixo consumo de energia e ecologicamente sustentável para remover a lignina da biomassa lignocelulósica. Microrganismos como bactérias e fungos, notadamente os fungos de podridão branca, têm sido empregados devido à sua capacidade de degradar a lignina, hemicelulose e polifenóis presentes na biomassa. Esses microrganismos secretam enzimas como ligninase, manganês peroxidase e lacase, que desempenham um papel crucial na despolimerização da lignina (SINGH, 2021). Essa abordagem apresenta diversas facetas e perspectivas futuras, sendo um método promissor para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Em suma, com o intuito de potencializar a eficácia da hidrólise, o pré-tratamento tem como principal objetivo deformar a estrutura da lignina e reduzir a cristalinidade da celulose. Dessa forma, busca-se aumentar significativamente a área de contato das enzimas com a celulose durante o processo. Após a etapa de pré-tratamento, a hidrólise da biomassa é realizada através de processos químicos ou enzimáticos (ZHENG *et al.*, 2022) resultando no hidrolisado que por sua vez é rico em açúcares, que o torna uma valiosa matéria-prima para processos biotecnológicos e industriais, proporcionando uma fonte promissora de carbono para diversas aplicações.

Metabolismo de Xilose

Os microrganismos desenvolveram ao longo do tempo vias metabólicas distintas para assimilação de xilose, conforme ilustrado na Figura 2 (ZHAO *et al.*, 2020). Em bactérias, a xilose é convertida diretamente em xilulose por meio de uma xilose isomerase (MISHRA; SINGH, 1993), enquanto em alguns fungos e leveduras, a conversão da xilose para xilulose ocorre através da ação conjunta da xilose redutase (XR) e da xilitol desidrogenase (XDH) (WANG *et al.*, 1980). Em ambos os casos, a xilulose formada é fosforilada em xilulose-5-fosfato e, por fim, é metabolizada pela via das pentoses fosfato (SCALCINATI *et al.*, 2012). Adicionalmente, em algumas bactérias como *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum* e *Lactococcus lactis* a xilulose-5-fosfato pode ser dividida em acetilfosfato e gliceraldeído-3-fosfato pela ação da fosfoacetolase (TANAKA *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2012; GU *et al.*, 2014).

Além das vias já citadas, foi descoberta em *Caulobacter crescentus* uma via oxidativa para o metabolismo de xilose, a qual utiliza o α -cetogluturato como um intermediário chave (STEPHENS *et al.*, 2007). Nessa via, chamada de Weimberg, a xilose é convertida em xilonolactona e xilonato pelas enzimas xilose desidrogenase e a xilonolactonase, respectivamente. Em seguida, o xilonato é desidratado a 2-ceto-3-desoxi-xilonato e posteriormente a semialdeído- α -cetogluturato. Finalmente, este é oxidado em α -cetogluturato pela α -cetogluturato semialdeído desidrogenase (STEPHENS *et al.*, 2007), e por fim é metabolizado no ciclo do ácido cítrico.

Finalmente, também foi demonstrada em bactérias, uma quarta via metabólica, denominada de via de Dahms. Os passos iniciais da conversão de xilose são idênticos à via de Weimberg. Porém, na via de Dahms, o 2-ceto-3-desoxi-xilonato pode ser decomposto em glicolaldeído (GA) e piruvato pela ação de uma aldolase que por fim irá ser convertido a Acetil-CoA para posterior assimilação no ciclo do ácido cítrico (STEPHEN DAHMS, 1974).

A xilose derivada da hemicelulose é uma importante fonte renovável de açúcares, podendo representar de 18% a 30% dos açúcares presentes no hidrolisado da biomassa lignocelulósica. Isso a torna um recurso promissor na produção de produtos químicos e biocombustíveis. O estudo das vias metabólicas da xilose e a compreensão dos mecanismos regulatórios envolvidos são fundamentais para otimizar sua utilização em processos biotecnológicos e avançar em estudos em genética de microrganismos. De fato, vários microrganismos recombinantes com vias nativas ou heterólogas de assimilação de xilose já foram construídos, permitindo a produção de diferentes bioprodutos de interesse industrial. Por exemplo, Bamba et al. (2019) demonstraram a produção de 1,2,4-butanotriol a partir de xilose por *S. cerevisiae*, enquanto Procópio et al. (2023) mostraram a produção de etanol de segunda geração usando xilo-oligossacarídeos por *S. cerevisiae*. Além disso, Gu et al. (2023) desenvolveram a cepa recombinante *E. coli* *BWL9* para a produção de isobutanol, e Salusjärvi et al. (2017) demonstraram a produção de ácido glicólico e etileno glicol através da assimilação da xilose via via de Dahms.

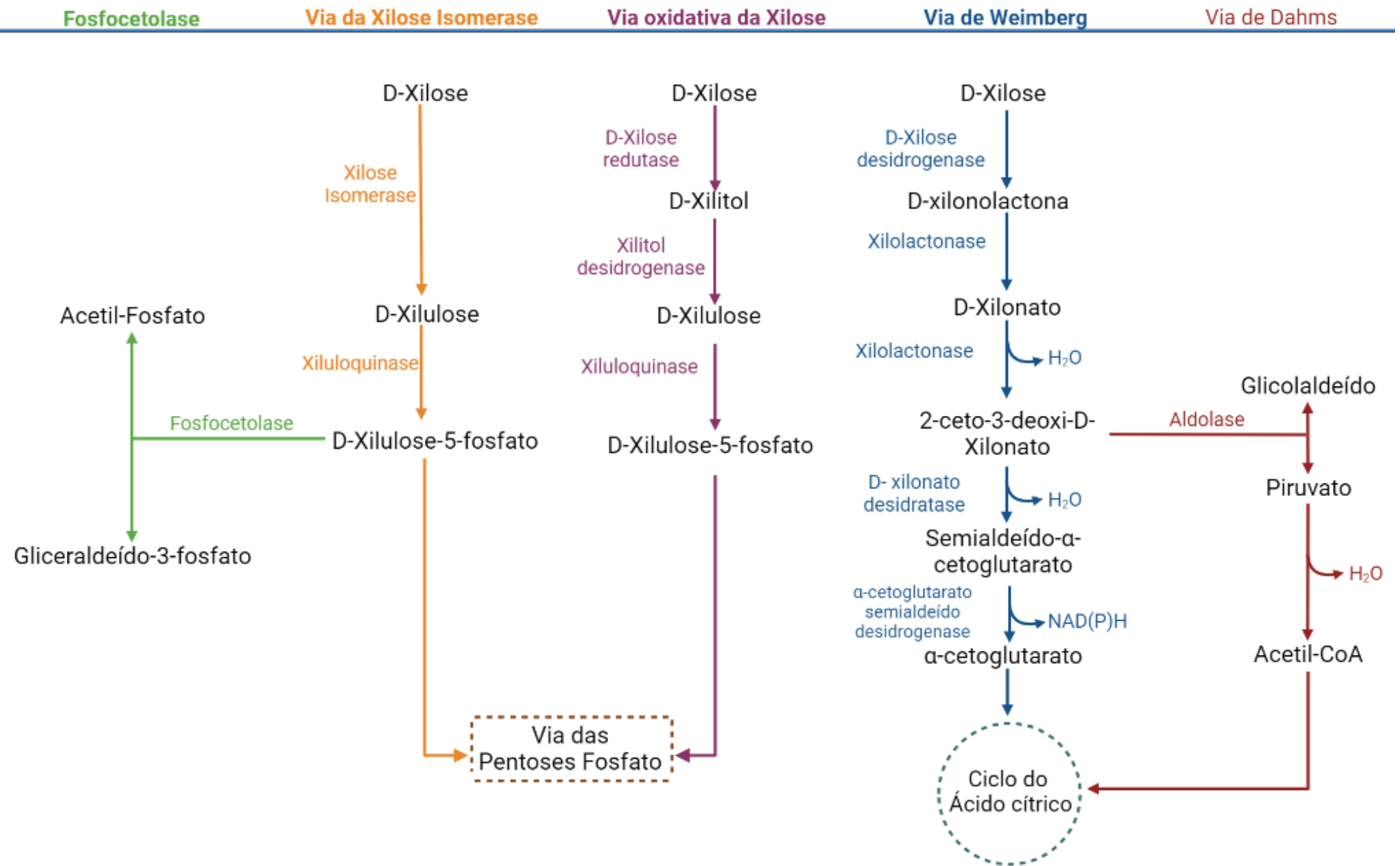


Figura 2. Representação das diferentes vias do Metabolismo de xilose em microrganismos. (Baseado em ZHAO, Z. et al., 2020)

■ Etileno Glicol

O etilenoglicol (EG; etano-1,2-diol) é um composto químico orgânico pertencente à classe dos glicóis. Suas propriedades químicas versáteis o tornam útil em diversas aplicações. O EG é utilizado principalmente como fluido anticongelante em sistemas de condução, visando prevenir danos causados pelo congelamento (BAUDOT; ODAGESCU, 2004). Esse mercado específico teve tamanho estimado de US \$ 5.061,1 bilhões em 2022 e espera-se que cresça a uma taxa de 7,0% no período de 2023 a 2030.(ANTIFREEZE MARKET SIZE, SHARE, TRENDS ANALYSIS [2023 REPORT], [s. d.] . Além disso, O EG desempenha um papel crucial como matéria-prima na síntese de diversos produtos químicos, incluindo o glioxal, ácido glicólico e glicolato de metila (YUE *et al.*, 2012). O EG também é usado na polimerização com tereftalato ou do dimetil tereftalato, resultando no polietileno tereftalato (PET), amplamente utilizado como material base para embalagens plásticas em todo o mundo (KURODA *et al.*, 2022). Adicionalmente, encontra aplicação relevante em indústrias químicas, como as de tintas e resinas, devido às suas propriedades químicas favoráveis (SALUSJÄRVI *et al.*, 2019).

A produção predominante de EG ocorre por dois métodos: carbonatação seguida de hidrolização do óxido de etileno, ou pela hidratação direta do óxido de etileno (KAWABE, 2010; LI *et al.*, 2004). A fim de evitar o uso de recursos derivados de petróleo, tem sido relatada na literatura a possibilidade de produção direta de EG a partir de recursos renováveis, como materiais derivados de plantas, por meio de catálise química (FAN *et al.*, 2013). Para contornar algumas dessas limitações, existem estudos que propõem a síntese de etilenoglicol (EG) por meio de uma cascata enzimática *in vitro*, utilizando glicerol como substrato (LI *et al.*, 2021). Porém, é importante mencionar que o escalonamento desse processo de cascata enzimática *in vitro* não é viável devido ao alto custo de produção e baixo rendimento de produção.

Assim, com o objetivo de contornar as limitações mencionadas anteriormente, várias rotas sintéticas foram desenvolvidas para a produção microbiana de etilenoglicol (EG) a partir de pentoses. Por meio dos intermediários da via das pentoses fosfato, como ribulose 1-fosfato e xilulose 1-fosfato, juntamente com a via de Dahms, foram criadas vias biossintéticas que permitem a produção de etileno glicol a partir de xilose.(ALKIM *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016; SALUSJÄRVI *et al.*, 2019) que são ilustradas na Figura 3.

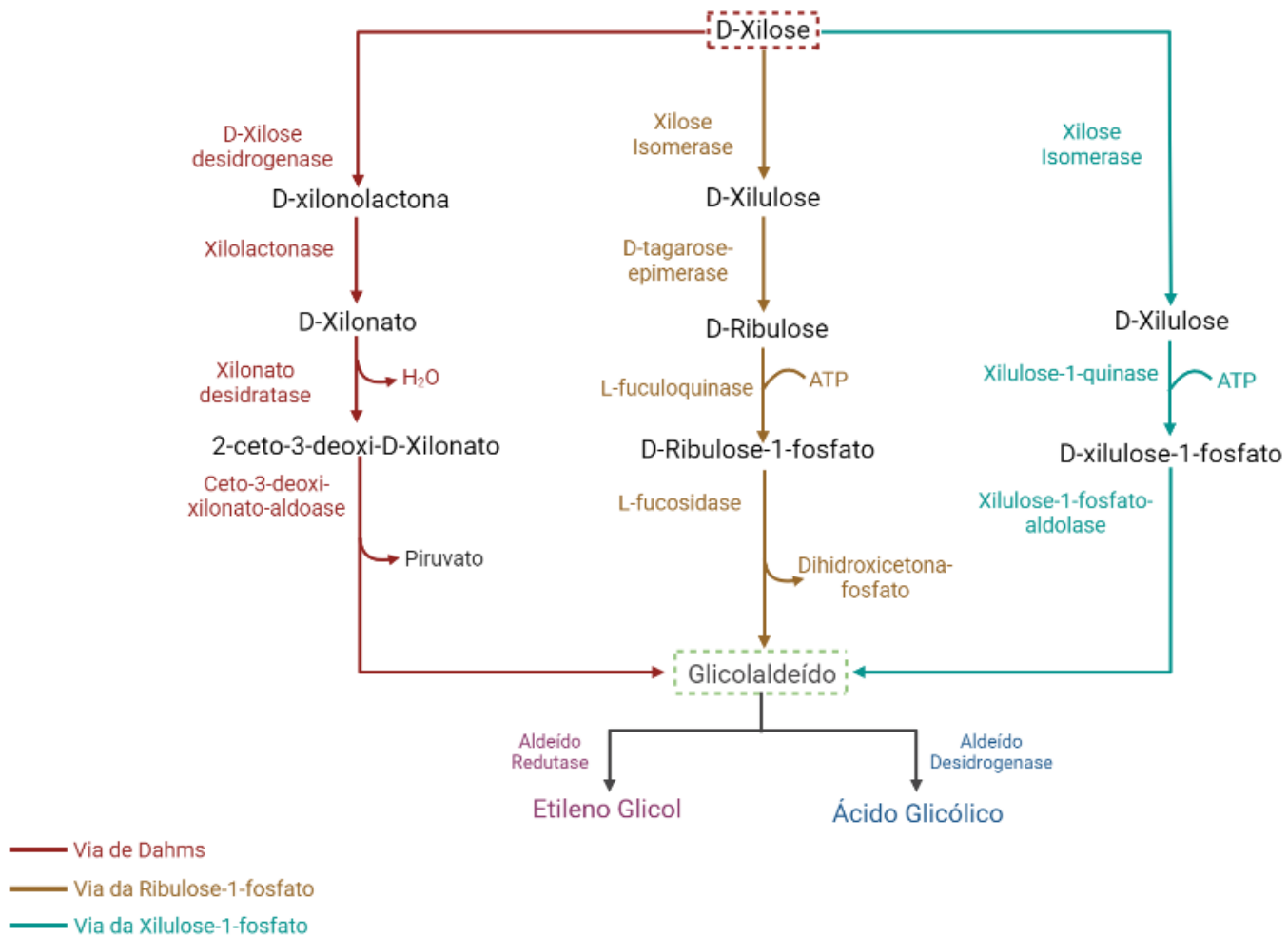


Figura 3. Vias biossintéticas para obtenção de etileno glicol e ácido glicólico (ALKIM et al., 2015; PEREIRA et al., 2016; SALUSJÄRVI et al., 2019)

No trabalho de ALKIM et al., (2015) é descrita a via sintética da xilulose-1-fosfato para a produção de EG e AG em *E. coli* a partir de xilose. Esse processo ocorre por meio da isomerização da D-Xilose em D-xilulose seguida pela fosforilação da mesma para a produção de D-xilulose-1-fosfato, que posteriormente é clivada em di-hidroxiacetona-fosfato e glicolaldeído. A via da ribulose-1-fosfato foi utilizada para a produção de EG e AG em *E. coli* no trabalho de PEREIRA et al., (2016) onde o glicolaldeído produto do metabolismo das pentose teve uma conversão subsequente em uma única etapa em EG. A via de Dahms consiste em quatro etapas para a produção de GA, que pode ser posteriormente reduzido a EG por meio da enzima aldeído redutase (ALDR) ou oxidado a AG através de uma aldeído desidrogenase (ALDH). Essa rota metabólica é amplamente utilizada para a produção de EG, como evidenciado na Tabela 3, que apresenta os detalhes da sua produção biotecnológica, incluindo informações sobre o rendimento, o microrganismo empregado e a via metabólica utilizada.

Tabela 3. Dados de Produção de Etileno Glicol por diferentes vias Metabólicas.

Microrganismo	EG (g/L)	Y* (g/g)	Processo	Substrato	Via	Ref.
<i>E. coli</i> WL3110	108,2	0,36	Batelada Alimentada	Xilose	Dahms	(Chae et al., 2018)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	72,0	0,40	Batelada alimentada	Xilose	Dahms	(Wang et al. 2018)
<i>E. coli</i> MG1655	40,0	0,35	Batelada alimentada	Xilose	Ribulose-1P	(Pereira et al., 2016)
<i>E. coli</i> MG1655	20,0	0,38	Batelada	Xilose	Xilulose-1P	(Alkim et al., 2015)
<i>E. coli</i> MG1655	20,0	0,38	Batelada	Xilose	Xilulose-1P	(Alkim et al., 2015)
<i>E. coli</i> W3110	7,7	0,39	Batelada	Xilose	Dahms	(Cabulong et al., 2017)
<i>E. cloacae</i> S1	34,1	0,28	Batelada alimentada	Ácido xilônico	Dahms	(Zhang et al., 2020)
<i>S. cerevisiae</i> D452-2	0,5	0,01	Batelada	Xilose	Xilulose-1P	(Chomvong et al., 2016)
<i>S. cerevisiae</i> H4099	0,0014	-	Batelada	Xilose + Glicose	Dahms	(Salusjärvi et al., 2017)
<i>S. cerevisiae</i> H131-A3CS	4,0	-	Batelada alimentada contínua (glicose)	Xilose + Glicose	Xilulose-1P	(Uranukul et al., 2019)

*Rendimento

A conversão de D-xilonato a 2-ceto-3-desoxi-xilonato (Figura 3) é um dos principais desafios enfrentados na via de Dahms, e essa etapa é realizada pela enzima xilonato desidratase (XD). O gene responsável por codificar a enzima XD foi inicialmente identificado em *C. crescentus* (STEPHENS *et al.*, 2007). No entanto, até o presente momento, há uma escassez de estudos caracterizando as xilonato desidratases na literatura.

Nesse cenário, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma linhagem de *K. phaffii* com a capacidade de produzir EG a partir de xilose, utilizando enzimas da via de Dahms. Para alcançar esse objetivo, foram avaliadas diferentes xilose desidrogenases e xilonato desidratases ainda não caracterizadas, buscando tornar a conversão de xilose em EG mais eficiente. Durante esse processo, linhagens foram obtidas, destacando-se a *K. phaffii* JA122, capaz de produzir EG e AG de forma mais eficiente. Em experimentos comparativos com uma linhagem selvagem, a *K. phaffii* X-33, também foi observado que a linhagem selvagem possuía uma capacidade intrínseca de metabolizar GA em EG e AG. Assim, o propósito deste estudo foi identificar os genes nativos de aldeído redutase (ALDR) e aldeído desidrogenase (ALDH) de *K. phaffii*, para posterior obtenção de linhagens com esses genes deletados.

■ *Komagataella phaffii*

A levedura *Pichia pastoris* hoje renomeada *Komagataella phaffii* foi encontrada em fluidos liberados por uma castanheira na França em meados de 1919 recebendo, em um primeiro momento, o nome de *Zygosaccharomyces pastoris* (GUILLIERMOND A., 1920) (26). Posteriormente, Yamada e seus colegas classificaram essa cepa como pertencente ao gênero *Komagataella* com base nas sequências parciais de rRNAs 18S e 26S (YAMADA *et al.*, 1995). Por volta de meados do século XX, após a descoberta de sua capacidade de usar o metanol como única fonte de carbono (OGATA *et al.*, 1969) a companhia Philips Petroleum Company empregou-a para produzir aditivo para ração animal como proteína de célula única (SCP), processo esse que não se mostrou mais rentável com o aumento de preço do metanol durante a crise do petróleo em 1973.

Uma das características mais notáveis dessa levedura reside na sua capacidade de utilizar um promotor robusto e altamente regulado, o P_{AOX1}, proveniente do gene da álcool oxidase-1 (COS *et al.*, 2006). Como a primeira enzima na via de utilização do metanol a álcool oxidase em *K. phaffii* é codificada em dois genes AOX1 e AOX2 (CREGG *et al.*, 1989).

Devido à capacidade de serem cultivadas em fermentações de alta densidade em um curto período de tempo, as células de levedura têm se tornado um alvo cada vez mais desejado para a produção de proteínas heterólogas. O uso de *K. phaffii* como sistema de expressão para a produção de produtos de alto valor agregado tem crescido exponencialmente (Karbalaeei *et al.*, 2020). Entretanto, seu emprego na indústria e biorrefinaria para a produção de compostos químicos a partir de fontes renováveis também vem ganhando destaque (CARNEIRO *et al.*, 2022). Na Figura 4, são evidenciados exemplos de produtos químicos provenientes de diferentes cepas modificadas de *K. phaffii*, obtidos a partir de diversas fontes de carbono. O desenvolvimento contínuo de novos métodos, plataformas e estratégias têm permitido uma abordagem mais viável na concepção dessa levedura para atender às demandas industriais específicas (YANG; ZHANG, 2018). Esse conjunto de características torna a utilização de *K. phaffii* altamente atrativa para a produção eficiente de bioprodutos com relevância comercial.

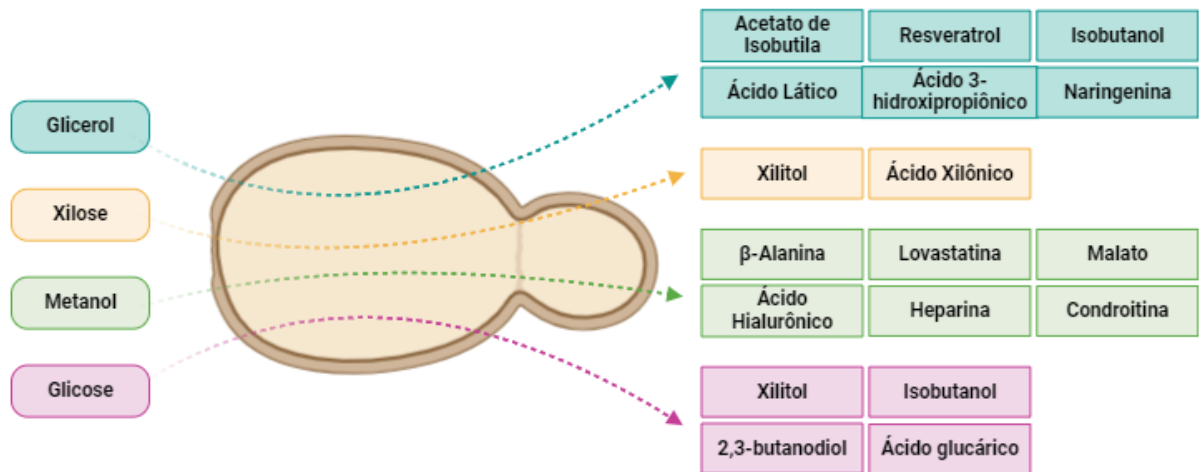


Figura 4. Ilustração de produtos químicos formados a partir de diferentes fontes de carbono por cepas de *K. phaffii* modificadas.

■ Objetivo

Este trabalho tem como objetivo melhorar a produção de EG a partir de fontes renováveis, utilizando linhagens robustas de *K. phaffii* obtidas por engenharia metabólica. Para alcançar esse objetivo, foram adotadas duas abordagens principais: a deleção de genes-alvo e a otimização do processo fermentativo em um biorreator.

■ Objetivos Específicos

- Identificar e deletar genes envolvidos com atividades de glicolaldeído desidrogenase e glicolaldeído redutase;
- Obter linhagens recombinantes de *K. phaffii* com genes-alvo deletados;
- Avaliar o metabolismo de EG, AG e GA em linhagens de *K. phaffii* com os genes-alvo deletados;
- Avaliar o efeito dos parâmetros pH e pO₂ na fermentação para produção de etileno glicol pela linhagem *K. phaffii* JA122;

■ Estratégia

Para alcançar os objetivos propostos, foram adotadas duas abordagens de trabalho. A primeira consiste na seleção *in silico* de genes alvo seguida pela construção de módulos de deleção baseados na toxina mazF de *E. coli*. Esses módulos foram posteriormente utilizados para a deleção dos genes selecionados do genoma de *K. phaffii*, com o objetivo de direcionar o metabolismo da levedura para a produção de EG. A segunda abordagem teve como foco o aumento da produção de EG por meio da otimização do processo fermentativo em um biorreator de bancada. Para isso, foi proposto um modelo preditivo baseado no delineamento central composto rotacional (DCCR), no qual buscou-se correlacionar os fatores pH e pO₂ (pressão parcial de oxigênio) na produção de EG.

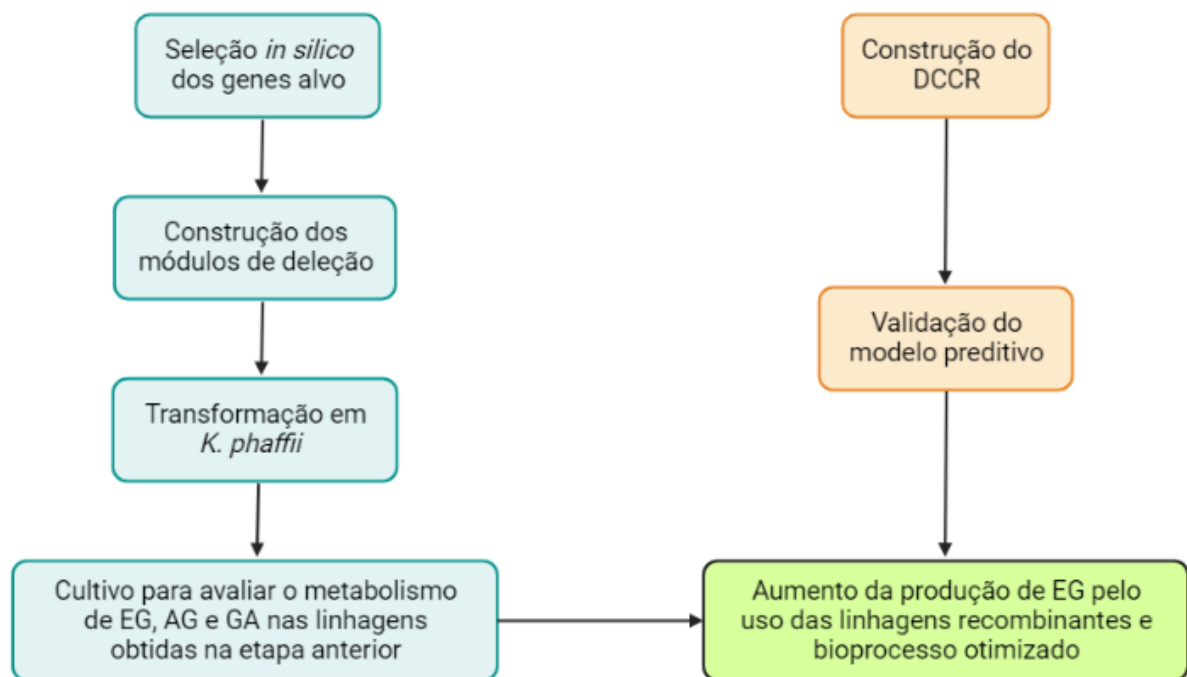


Figura 5. Estratégia adotada para aumentar a produção de EG.

■ Materiais

3.1.1. Meios de cultura

Meio LB - low salt

Cloreto de sódio	0,5% (m/v)
Extrato de levedura	0,5% (m/v)
Peptona bacteriológica	1% (m/v)
Ágar Bacteriológico, se meio sólido	1,5% (m/v)
Suplementação com antibiótico, quando necessário	

Meio YPD

Extrato de Levedura	1% (m/v)
---------------------	----------

Peptona bacteriológica	2% (m/v)
D-glicose	2% (m/v)
Ágar bacteriológico, se meio sólido	2% (m/v)

Suplementação com antibiótico, quando necessário

Meio YPEG

Extrato de Levedura	1% (m/v)
Peptona bacteriológica	2% (m/v)
Etilenoglicol	0,5 % (m/v)

Meio YPAG

Extrato de Levedura	1% (m/v)
Peptona bacteriológica	2% (m/v)
Ácido Glicólico	0,5 % (m/v)

Meio YPGA

Extrato de Levedura	1% (m/v)
Peptona bacteriológica	2% (m/v)
Glicolaldeído	0,012% (m/v)

Meio FM22

Fosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄)	4,29% (m/v)
Sulfato de Amônio (NH ₄) ₂ SO ₂	0,5 % (m/v)

Cloreto de Cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,2% (m/v)
Sulfato de Potássio (K_2SO_4)	0,43% (m/v)
Sulfato de Magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1,17% (m/v)
Solução de elementos-traços	4,35 mL/L

Todos os meios de cultura, antes de serem utilizados foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos.

3.1.2. Soluções

Solução de elementos-traços para FM22

Sulfato de Ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2,2% (m/v)
Cloreto de Zinco (ZnCl_2)	0,7% (m/v)
Sulfato de Cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,2% (m/v)
Sulfato de Manganês monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,3% (m/v)
Sulfato de Cálcio dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,05% (m/v)
Cloreto de Cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,05% (m/v)
Molibdato de Sódio dihidratado ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,02% (m/v)
Biotina	0,02% (m/v)
Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)	0,01% (m/v)
Iodeto de Sódio (NaI)	0,008% (m/v)
Ácido Bórico (H_3BO_3)	0,002% (m/v)

Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 50X

Tris	2 M
Ácido acético	1 M
EDTA pH 8,0	0,05 M

Solução Acetato de Sódio

Acetato de Sódio (NaO₂CCH₃) 12,305 g

Completar com água ultrapura para volume final de 50 mL

Solução de Glicerol 10%

Glicerol 10 % (v/v)

3.1.3. Marcadores de peso molecular

- GeneRuler 1 Kb Ladder Mix 100-10.000 pb (Thermo Scientific)
- O'GeneRule DNA Ladder Mix 100-10.000 pb (Thermo Scientific)
- 1 Kb DNA Ladder, 250-10.000 pb (Promega)

3.1.4. Linhagens utilizadas

As células competentes bacterianas e de leveduras empregadas neste estudo foram adquiridas pela empresa Invitrogen e estão indicadas na Tabela 4. As células bacterianas foram da linhagem *E. coli* DH10BT1 usadas para multiplicação e manipulação dos plasmídeos construídos, enquanto as células de leveduras foram da linhagem *K. phaffii* X-33 para a parte de transformação e para os ensaios fermentativos foi usada a levedura *K. phaffii* JA122 construída anteriormente pelo grupo. A linhagem JA122 está depositada na “Coleção de

Microorganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias – CMMAABio, da Embrapa Agroenergia, sob o número BRM X.

Tabela 4. Características das linhagens usadas neste trabalho.

Linhagem	Genótipo	Fenótipo Principal
<i>E. coli</i> DH10BT1	F- <i>mcr</i> A Δ (<i>mrr</i> - <i>hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC), Φ 80 <i>lac</i> Z Δ M15 Δ <i>lac</i> X74 <i>rec</i> A1 e A1 <i>ara</i> D139 Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>gal</i> /Ugal K λ - <i>rps</i> L <i>nup</i> G <i>ton</i> A	Resistência aos fagos T1 e T5
<i>K. phaffii</i> X-33	Prototrófica	-
<i>K. phaffii</i> JA122	pGAPZB(XDH)_ <i>xyiB</i> - <i>HL</i> +pKLD(XD)_ <i>hl</i> + pB3Hyg_MOD1_ <i>yjhH</i> + <i>fucO</i>	ZeoR + GenR + HygR, Produtora de EG e AG

3.1.5. Genes e plasmídeos

Previamente foram selecionados seis genes putativos *in silico* codificantes para enzimas com possível atividade de aldeído desidrogenases (ALDH) (enzima responsável pela conversão de glicolaldeído (GA) para AG) e atividade de aldeído redutases (ALDR) (enzima responsável pela conversão de GA a EG). Para tanto, as sequências gênicas que codificam para ALDH e ALDR de *E. coli* e *Saccharomyces cerevisiae* foram empregadas para buscar sequências com similaridade no genoma de *K. phaffii*. Além disso, foram realizadas buscas em literatura científica por enzimas já descritas que poderiam ter atividade sobre glicolaldeído. Os genes selecionados são apresentados na Tabela 5.

Foi utilizado o vetor de clonagem comercial pGEM-T Easy (Promega) para a inserção dos amplicons obtidos por PCR e posteriormente para inserção do cassete de seleção e contrasseleção. Além disso seu uso permite a seleção de clones através da resistência à ampicilina e da coloração branca/azul.

- Sistema de seleção e contrasseleção

Um sistema de seleção e contrasseleção foi utilizado para identificar cepas desejadas. O cassete de seleção continha o gene da higromicina fosfotransferase (Hyg) controlado pelo promotor constitutivo da malato desidrogenase peroxissomal (pMDH3) de *K. phaffii* (PRIELHOFER et al., 2017). Por outro lado, o cassete de contrasseleção continha o gene da endonuclease tóxica mazF de *E. coli*, regulado pelo promotor da L-ramnonato desidratase (pLRA3), que é ativado na presença de ramnose (JIAO et al., 2019). A ativação do gene mazF resultaria em morte celular, a menos que as cepas tivessem eliminado o cassete de contrasseleção por meio da recombinação homóloga das regiões repetitivas (DR2).

Tabela 5. Lista dos genes usados nesse trabalho e suas características.

Gene	Código do gene	Descrição	Referência
<i>ALD4</i>	PAS_chr2-1_0853	Aldeído desidrogenase mitocondrial	(LEWIS LIU <i>et al.</i> , 2008)
<i>ALD5</i>	PAS_chr3_0987	Aldeído desidrogenase mitocondrial	(KURITA; NISHIDA, 1999)
<i>ALD6</i>	PAS_chr4_0043	Aldeído desidrogenase mitocondrial	(GUPTA <i>et al.</i> , 2021)
<i>ADH7</i>	PAS_chr1-1_0357-1	Álcool desidrogenase (NADPH dependente) com atividade de redução de aldeídos	(LEWIS LIU <i>et al.</i> , 2008)
<i>SORI</i>	PAS_chr1-1_0490	Gene putativo para Xilitol	(HEISTINGER <i>et al.</i> , 2022)

		desidrogenase	
<i>YDR541C</i>	GQ67_03515T0	Gene putativo para aldeído redutase	(MOON; LIU, 2015)

A Tabela 6 indica os oligonucleotídeos usados neste trabalho. O par de primers Forward (F) e Reverse (R) de cada gene foi desenhado para gerar sequências flanqueadoras nos cassetes de deleção. Isso permitiu a clonagem dos amplicons no vetor comercial pGEM-T Easy e, posteriormente, a inserção do cassete de seleção e contrasseleção.

Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Primers	Sequência (5' → 3')	Sítio de Restrição
DR2-MazF-F	AGGGATCCCGGGTCGACCCACACG GCATTTCCCTCTCTAG	BamHI, SmaI e SalI
DR2-MazF-R	TAAGGATCCCGGGTCGACGTCTGTG GAAGCTAGCGGTACC	BamHI, SmaI e SalI
ALD4-SphI-F	CTGAGCATGCATGCTTAGAACTTCT CCAGCTAC	SphI
ALD4-NotI-R	CTAAGCGGCCGCCTCAGTTTACTCG TTCTTGTGG	NotI
ALD5-NotI-F	ATTTGCGGCCGCAGCGTGTCTCCA CAACGATC	NotI
ALD5-PstI-R	T <u>TA</u> CTGCAGTTAGGCGGTTGGAACG TTCAATC	PstI
ALD6-XhoI-F	CCGCTCGAGATGACATTTGCTCCTC CCTTAG	XhoI
ALD6-XhoI-R	TCGCTCGAGCTACTTATGTTTCAGGA GTGTAAGC	XhoI
ADH7-NotI-F	TTGAGCGGCCGCATGACCGCACTC AGAGTTGG	NotI
ADH7-SacIXhoI- R	TAAGAGCTCCTCGAGACCCTATTCA AACTGTTTTCCG	SacI e XhoI
SOR1-XhoI-F	CCGCTCGAGAGCACTTGTAACCGAT GGAGT	XhoI
SOR1-XhoI-R	TAGCTCGAGTTTACTCTGGGCCGTC AATG	XhoI

YDR541C-NotI-F	ATAAGCGGCCCGCACTTCGACACAT GGAGAGGA	NotI
YDR541C-PstI-R	TGAACTGCAGTGGTACTTACTTGTT TGCTCGC	PstI
InpLRA-R	AGAAGGTGTAGGGAGTCAGTC	-
IntTDH-F	CACCTGAGGACTTTCGCTAGA	-
SeqHyg-R	GTTAGAACCGAAATCAGCGTGA	-
InHyg-R	TTGCAAAGTAACACCTTGAGCT	-
SeqHyg-R	GTTAGAACCGAAATCAGCGTGA	-
InpMDH-F	GAATATACTACCCACCAGTTGAA	-
SeqMDH-R	GTACATGGTGAGTTCACAGGAA	-
InpMDH-R	TTCAACTGGTGGGTAGTATATTC	-
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT	-
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	-

■ Metodologia

3.2.1. Construção do módulo de deleção

A estratégia adotada para a deleção dos genes selecionados segue um padrão similar, conforme ilustrado na Figura 6. Nesse processo, ocorre a recombinação homóloga para inserção do módulo de deleção no genoma da levedura. O cassete de seleção e contrasseleção contém o gene da higromicina fosfotransferase (Hyg) sob o controle do promotor constitutivo da malato desidrogenase peroxissomal (pMDH3) de *K. phaffii* (PRIELHOFER et al., 2017) para a seleção de cepas. Para a contrasseleção e recuperação da marca de resistência, o gene da endonuclease tóxica mazF de *E. coli* foi inserido sob o controle do promotor da L-ramnonato desidratase (pLRA3), que é induzível pela presença de ramnose (JIAO et al., 2019). Na presença de

ramnose, a ativação do gene *mazF* resultaria em morte celular, a menos que as leveduras tivessem eliminado o cassete de contrasseleção por meio da recombinação homóloga das regiões DR2 (que são regiões repetitivas que contém 600pb para criar braços de homologia).

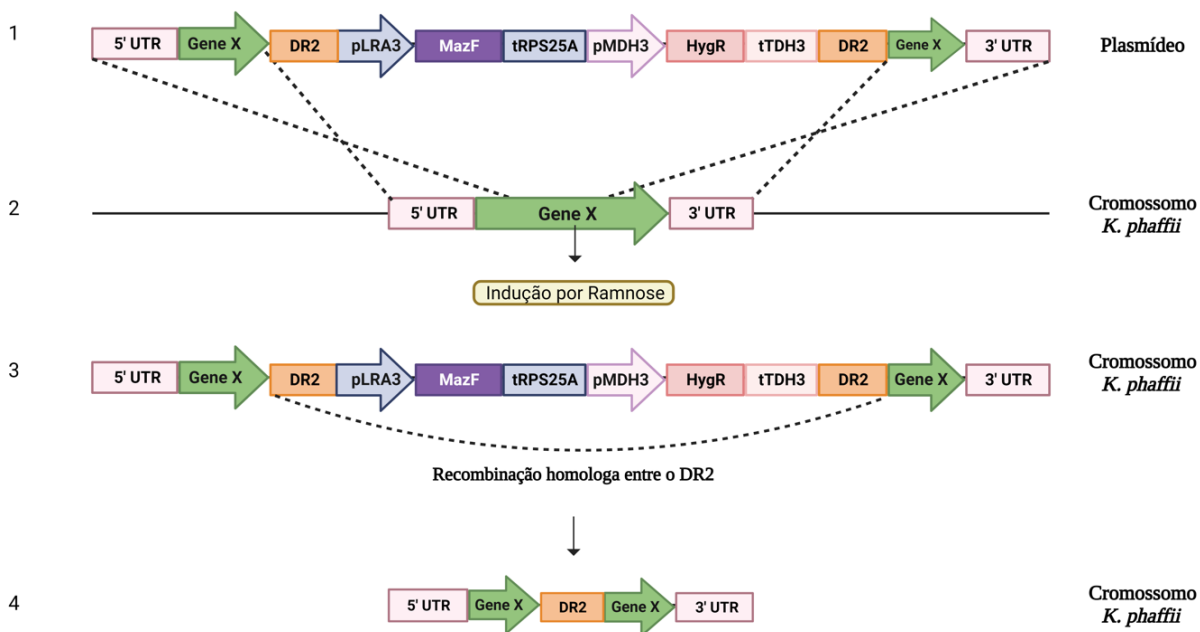


Figura 6. Estratégia de deleção dos genes alvo por meio do cassete de seleção e contrasseleção DR2-*mazF*-*hyg*. Linhas tracejadas indicam o local da recombinação homóloga. Fonte: A autora (2023).

Amplificação dos genes alvo e cassete de seleção e contrasseleção

A PCR foi usada para amplificar as sequências gênicas da *ALD4*, *ALD5*, *ALD6*, *ADH7*, *SORI* e *YDR541C* a partir do DNA genômico da *K. phaffii* X-33 e o cassete de seleção e contrasseleção DR2-*mazF*-*hyg* a partir do vetor de origem. O protocolo utilizado consistiu em um ciclo de desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos na temperatura indicada para cada gene (conforme descrito na Tabela 7) por 30 segundos, extensão da sequência a 72°C por 90 segundos e uma etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos. Para a realização das reações de PCR, o kit GoTaq® Hot Start Polymerase da empresa Promega foi utilizado, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. As concentrações dos reagentes foram preparadas de acordo com as indicações presentes na Tabela 8.

Tabela 7. Tamanho esperado de cada gene seguido pela temperatura de anelamento dos primers usadas na reação de PCR.

Gene alvo/cassete de deleção	Tamanho (pb)	Tm de anelamento (°C)
<i>ALD4</i>	1606	55
<i>ALD5</i>	1916	57
<i>ALD6</i>	1524	55
<i>SorI</i>	1561	55
<i>ADH7</i>	1437	56
<i>YDR541C</i>	1421	57
<i>DR2-MazF-Hyg</i>	4796	56

Tabela 8. Reagentes e suas proporções empregadas nas reações de PCR.

Reagente	Volume (µL)	Condições
5X GoTaq PCR Buffer	10	
MgCl ₂ (25mM)	3	-1 ciclo de desnaturação: 95°C - 5'
dNTP (10mM)	1	-30 ciclos: 95°C-30''; X°C*- 30''; 72°C - 5'
Primer forward (100 mM)	1	-1 ciclo de extensão final: 72°C - 10'
Primer Reverse (100 mM)	1	-Final: 4°C - ∞
GoTaq DNA Polimerase	0.5	
Água ultrapura + Amostra do clone	1	
Água ultrapura estéril	32.5	
Total	50	

* A temperatura varia de acordo com o gene e os primers usados

██████-Clonagem dos genes alvo no vetor pGEM-T Easy

Para a construção do módulo de deleção a primeira etapa de clonagem consistiu na ligação das sequências gênicas alvo no vetor de interesse, para isso foram realizadas as seguintes etapas. Primeiramente, os produtos de PCR contendo as sequências alvo foram amplificados e, em seguida, purificados utilizando o kit Sistema Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up (Promega) para remover resíduos de primers e outros contaminantes. Simultaneamente, o vetor pGEM-T Easy foi submetido à digestão enzimática com as enzimas de restrição *NotI* e *SphI* (para o gene *ALD4*) e *NotI* e *SacI* (para o gene *ADH7*). Essa estratégia foi adotada para eliminar sítios de restrição que seriam posteriormente utilizados para a inserção do cassete de seleção e contrasseleção. Os demais genes (*ALD5*, *ALD6*, *SORI* e *YDR541C*) e o cassete de seleção e contrasseleção foram clonados no sítio múltiplo de clonagem do vetor. Na etapa de ligação, uma ligase da marca Thermo Scientific foi utilizada, seguindo as instruções do fabricante. A reação de ligação foi realizada na proporção 3:1 de inserto para vetor, durante a noite, a uma temperatura de 16 °C. Os sistemas de ligação foram usados para transformar células eletrocompetentes DH10BT1. As colônias que cresceram em meio seletivo (LB com ampicilina 200 µg/ml) foram inoculadas para crescimento e extração de DNA plasmidial (realizada conforme o tópico extração de DNA plasmidial bacteriano). A correta clonagem dos fragmentos gênicos foi avaliada por análises de restrição com *NotI*, *PstI*, *XhoI*, *Sall*, *Scal*, *BamHI* e por sequenciamento pela empresa CLINILAB - laboratório veterinário LTDA.

██████-Transformação bacteriana por eletroporação

Para a transformação, foram utilizadas alíquotas de aproximadamente 50 µL de células eletrocompetentes DH10BT1, previamente armazenadas a -80°C, para os sistemas de ligação feito para cada um dos genes selecionados. A cubeta de eletroporação de 0,1 cm foi pré-resfriada no gelo. A célula foi descongelada no gelo e foram acrescentados 10 µL de cada sistema de ligação. Em seguida, as células foram transferidas para a cubeta e submetidas a um choque elétrico utilizando uma voltagem de 1800 V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω. Após o choque elétrico, 1 mL de meio LB gelado foi adicionado aos sistemas e incubado a 37°C por 1 hora. Posteriormente, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 14.500 rpm. 800 µL do sobrenadante foi descartado e os 200 µL restantes foram usados para ressuspender o pellet que em seguida foi plaqueado em meio LB sólido contendo o antibiótico ampicilina na concentração de 100 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

██████-Extração de DNA plasmidial bacteriano

A extração de DNA plasmidial bacteriano foi realizada seguindo as etapas descritas a seguir. Após os experimentos de transformação, as células foram transferidas para tubos do tipo falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio LB suplementado com ampicilina a 100 µg/mL necessário para a seleção das células transformadas. Os tubos contendo as células foram incubados a 37°C e 200 rpm *overnight*. Uma alíquota de 900 µL dos transformantes foi coletada para posterior armazenamento em freezer a -80°C, utilizando uma solução de glicerol a 60% como agente crioprotetor. O restante das células foi então centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, e o *pellet* celular resultante foi utilizado para a extração dos plasmídeos. A extração de plasmídeos foi realizada utilizando o Kit GeneJET Plasmid Miniprep, seguindo as etapas recomendadas pelo fabricante. O procedimento envolveu a lise celular, a precipitação do DNA plasmidial e sua posterior purificação utilizando colunas de sílica fornecidas pelo kit. Após a eluição do DNA plasmidial, sua concentração e pureza foram avaliadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Scientific).

██████-Reação de restrição de DNA plasmidial

A fim de confirmar a primeira etapa de clonagem que consiste na inserção do gene de interesse no vetor de expressão, foram realizadas reações de digestão com as enzimas específicas para cada plasmídeo, indicados na Tabela 9 em que o fragmento maior corresponde ao plasmídeo e o fragmento menor ao inserto. As reações ocorreram a 37°C por 1 hora, de acordo com as especificações indicadas pelos fabricantes.

██████-Eletroforese em gel de agarose

Os experimentos de eletroforese em gel de agarose foram realizados com uma concentração de 0.8%. Os géis foram preparados e corados com brometo de etídio a uma concentração de 62.5 µg/mL. As amostras contendo DNA foram carregadas nos poços dos géis de agarose e submetidas à eletroforese em cubas da marca Thermo Scientific, utilizando tampão TAE 1x. A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 90 V e corrente de 110 A. Para fins de quantificação, os marcadores descritos na sessão de marcadores de peso molecular, foram carregados em um dos poços do gel ao lado das amostras. Isso permitiu a estimativa do tamanho das bandas de DNA nas amostras analisadas. Após a eletroforese, os géis de agarose

foram visualizados e fotografados utilizando o sistema de documentação de imagens L-Pix Chemi, da empresa Loccus Biotecnologia.

■■■■■- Clonagem do cassete de seleção e contrasseleção

Para a inserção do cassete de seleção e contrasseleção entre as sequências de homologia ao genoma de *K. phaffii* (genes alvos), os plasmídeos pGEM-T Easy_ALD4, pGEM-T Easy_ALD5, pGEM-T Easy_ALD6, pGEM-T Easy_SORI, pGEM-T Easy_ADH7, pGEM-T Easy_YDR541C, foram digeridos com as enzimas *NcoI*, *EcoRV*, *BamHI*, *KpnI*, *Sall*, *XhoI*, respectivamente, com o objetivo de abrir o fragmento de interesse e inserir o cassete de seleção e contrasseleção. Para realizar essa etapa, os plasmídeos foram submetidos a digestão utilizando enzimas de restrição específicas para cada plasmídeo permitindo a inserção do cassete de seleção e contrasseleção (Tabela 9). Vale ressaltar que o plasmídeo pGEM-T Easy_SORI precisou passar por uma etapa de purificação por apresentar fragmento de 293 pb e o pGEM-T Easy_ALD4 por uma etapa de Blunting para que as extremidades adquirissem extremidades abruptas para a ligação. Para isso, utilizou-se a enzima DNA blunting enzyme do kit Anza™ DNA End Repair (Thermo Fischer Scientific) e seguiu-se o protocolo fornecido pelo fabricante. Ao final da reação uma nova purificação foi realizada usando o kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up para purificar o plasmídeo dos reagentes presente no mix. Após a obtenção de todos os plasmídeos com extremidades abruptas, foi realizada a etapa de desfosforilação dos plasmídeos. Para a reação de desfosforilação usou-se o kit USB® Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), seguindo as instruções do manual do fabricante (Affymetrix) de acordo com o protocolo recomendado. Os plasmídeos foram incubados na presença da enzima de desfosforilação por 60 minutos a 37°C. Seguido da inativação por temperatura durante 15 minutos a 65°C. Novamente os plasmídeos passaram por uma purificação para a remoção de resíduos de enzimas e outros contaminantes. Por fim, procedeu-se à ligação usando a enzima T4 DNA Ligase da Thermo Scientific entre o inserto (DR2-MazF-Hyg) e o vetor (plasmídeo contendo o gene) em uma proporção de 3:1 nas condições recomendadas pelo fabricante. Essa etapa teve como objetivo inserir o cassete de seleção e contrasseleção (DR2-MazF-Hyg) no vetor contendo os fragmentos de interesse (genes alvo), formando o módulo de deleção que será usado na próxima etapa. Os módulos obtidos foram nomeados de pGEM-T Easy_ALD4_mazF, pGEM-T Easy_ALD5_mazF, pGEM-T Easy_ALD6_mazF, pGEM-T Easy_SORI_mazF, pGEM-T Easy_ADH7_mazF e pGEM-T Easy_YDR541C_mazF.

Tabela 9. Enzimas de restrição usadas para a linearização dos plasmídeos e inserção do cassette de seleção e contrasseleção.

Plasmídeo	Sítio para clonagem do cassette DR2-MazF-Hyg	Digestão do cassette de seleção e contrasseleção (DR2-MazF-Hyg)
pGEM-T Easy_ALD4	<i>NcoI</i>	<i>SmaI</i>
pGEM-T Easy_ALD5	<i>EcoRV</i>	<i>SmaI</i>
pGEM-T Easy_ALD6	<i>BamHI</i>	<i>BamHI</i>
pGEM-T Easy_SORI	<i>BamHI e KpnI</i>	<i>BamHI e KpnI</i>
pGEM-T Easy_ADH7	<i>SalI</i>	<i>SalI</i>
pGEM-T Easy_YDR541C	<i>XhoI</i>	<i>SalI</i>

3.2.2. Transformação de *K. phaffii*

A Tabela 10 indica as enzimas de restrição usadas para liberar os módulos de deleção construídos na etapa anterior para a transformação em levedura. Um volume de aproximadamente 12 µg de DNA plasmidial foi incubado *overnight* 37 °C. A linearização do módulo de deleção a ser expressos em *K. phaffii* foi confirmada por gel de eletroforese. Em seguida, o DNA foi purificado segundo o protocolo de precipitação por etanol e acetato de sódio de Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition). Foram adicionados um 2,5X volumes de etanol 100% (gelado) ao volume da amostra seguida da adição de 1/10 do volume da reação de acetato de sódio 3 M. Após ser homogeneizada e incubada por 1 hora a -80°C a amostra foi centrifugada 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. O pellet foi seco no concentrador à vácuo, em temperatura ambiente e ressuspendido em 10 µL de água ultrapura estéril. Por fim, com o DNA purificado a transformação foi feita segundo descrito em EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen, EUA). Uma colônia de *K. phaffii* X-33, foi inoculada em 10 mL de YPD, incubada a 30°C por 24 h e sob agitação de 200 rpm. Foi inoculado o volume do pré-inóculo necessário para que a OD600 nm entre 1,3-1,5 fosse atingida em 100 mL de meio YPD. A cultura foi coletada e centrifugada a 1500 x g por 5 min a 4°C. O pellet foi ressuspendido em 100 mL de água ultrapura gelada. As células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições e o pellet foi ressuspendido em 50 mL de água ultrapura gelada. Novamente as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 2 mL de sorbitol 1 M gelado. A seguir as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 100 µL de Sorbitol 1 M gelado. Alíquotas de 80 µL de células foram separadas e adicionadas no DNA linearizado, transferidos para uma cubeta de eletroporação (0,2 mm) e incubadas por 5 min no gelo. Posteriormente, as células foram submetidas a choque elétrico com uma voltagem de 2000 V, capacitância 25 µF e resistência de 200 Ω. Foi adicionado 1 mL de Sorbitol 1 M gelado ao sistema, incubado a 30°C por 2 h, sem agitação. As células foram plaqueadas em meio YPD sólido com higromicina (200 µg/mL) e foram incubadas a 30°C por 96h.

Tabela 10. Enzimas de restrição usadas para excisar os módulos de deleção.

Gene	Excisão do módulo de deleção
pGEM-T Easy_ALD4_mazF	<i>SphI</i> e <i>NotI</i>

pGEM-T Easy_ALD5_mazF	<i>NotI e PstI</i>
pGEM-T Easy_ALD6_mazF	<i>NotI</i>
pGEM-T Easy_SorI_mazF	<i>NotI</i>
pGEM-T Easy_ADH7_mazF	<i>NotI</i>
pGEM-T Easy_YDR541C_mazF	<i>Not I e PstI</i>

3.2.3. PCR de colônia de *K. phaffii*

As colônias que cresceram após a transformação foram repicadas para uma nova placa contendo meio YPD e higromicina e cresceram por 96 horas, tempo necessário para o crescimento de colônias a 37°C. A fim de confirmar a inserção do cassete de seleção e contrasseleção por recombinação homóloga no genoma da levedura e preservação de possíveis clones positivos, realizou-se uma PCR de colônia. Com o auxílio de um palito de madeira esterilizado, uma pequena quantidade da colônia foi adicionada ao mix de reação, e a amplificação foi realizada seguindo as condições indicadas na Tabela 11. Os clones positivos foram preservados adicionando 900 µL de solução de glicerol 60% a cada tubo contendo 900 µL dos clones individuais. Os tubos foram armazenados no ultrafreezer a uma temperatura de -80°C para garantir a conservação das amostras a longo prazo.

Tabela 11. Reagentes e suas proporções empregados nas reações de PCR de colônia.

Reagente	Volume (µL)	Condições
5X GoTaq PCR Buffer	2,5	
MgCl ₂ (25mM)	1,5	-1 ciclo de desnaturação: 95°C - 5'
dNTP (10mM)	0,5	-30 ciclos: 95°C-30''; 56°C- 30''; 72°C - 5'
Primer forward (100 mM)	0,5	
Primer Reverse (100 mM)	0,5	-1 ciclo de extensão final: 72°C - 10'
GoTaq DNA Polimerase	0,25	-Final: 4°C - ∞
Água ultrapura + Amostra do clone	5	
Água ultrapura estéril	27,5	
Total	25	

■ Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Para desenvolver o modelo proposto, foram selecionados pontos centrais (0) fatoriais (-1 e 1) e axiais (-1,41 e 1,41) para cada fator. Os pontos centrais representam as condições normais do processo, enquanto os pontos axiais estão fora da faixa normal, permitindo a avaliação de possíveis efeitos não lineares. A faixa de pH considerada variou de 5 a 8, e os níveis de pO₂ foram selecionados entre 2% e 20%. A correlação entre todos os pontos escolhidos foi registrada nas Tabelas 12 e 13, indicando a interdependência entre os fatores estudados e a quantidade de fermentações a serem feitas. Os experimentos de fermentação foram conduzidos utilizando o biorreator de bancada Minifors (Infors HT). Foram utilizados frascos de 3 L de volume para realizar as fermentações. A linhagem de levedura utilizada para estabelecer o modelo preditivo foi a *K. phaffii* JA122, uma linhagem desenvolvida previamente pelo nosso grupo de pesquisa. Essa linhagem possui uma via metabólica baseada na via de Dhams, que permite a utilização da xilose como substrato e a produção de EG. O meio de cultura utilizado foi o FM 22, contendo uma concentração de 40 g/L de xilose e 20 g/L de glicose. A densidade óptica inicial (OD_{600nm}) foi ajustada para 5 em todas as condições testadas. As fermentações foram realizadas a uma temperatura de 30°C, com agitação constante de 200 rpm, ao longo de um período de 96 horas. A cada 24 horas de cultivo, uma alíquota de aproximadamente 1 mL foi retirada para medir a densidade óptica em 600 nm e posteriormente avaliada utilizando cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) para análise dos produtos metabólicos.

Tabela 12. Pontos Axiais, Fatoriais e centrais codificados.

	-1,41	-1	0	1	+1,41
pH	5,00	5,44	6,50	7,56	8
pO₂	2,0	4,6	11,0	17,4	20,0

Tabela 13. Parâmetros de pH e PO₂ das fermentações.

Fermentação	pH	pO₂	pH	pO₂
1	-1	-1	5,44	4,6
2	1	-1	7,56	4,6

3	-1	1	5,44	17,4
4	1	1	7,56	17,4
5	-1,41	0	5,00	11,0
6	1,41	0	8	11,0
7	0	-1,41	6,50	2,0
8	0	1,41	6,50	20,0
9	0	0	6,50	11,0
10	0	0	6,50	11,0
11	0	0	6,50	11,0

■ Análise e quantificação dos metabólitos por UPLC

Os metabólitos de interesse foram quantificados utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Ultra e de Alta Eficiência (UPLC e HPLC) conforme a Tabela 14. As amostras coletadas durante os experimentos foram submetidas a centrifugação a 14.500 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi armazenado a -20°C até o momento da análise. Para a análise dos metabólitos, foi utilizado o sistema de UPLC AcQuity UPLC H-Class, equipado com uma coluna HPX87H, mantida a uma temperatura de 45 °C. A fase móvel consistia em uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) com uma concentração de 5 mM, com um fluxo de 0,6 mL/min. O tempo total de análise foi de 24 minutos. As concentrações dos metabólitos foram determinadas utilizando os detectores PDA (Detector de Arranjo de Diodos) e RID (Detector de Índice de Refração) e foram calculadas por meio da comparação com a área do pico obtido no cromatograma, utilizando uma curva padrão previamente construída. Essa curva padrão permite a quantificação dos metabólitos glicose, xilose, xilitol, etanol EG, AG e GA com base na sua resposta de detecção em relação a concentrações conhecidas.

Tabela 14. Metodologia empregada na análise quantitativa de amostras por HPLC e UPLC.

Detector	Coluna	Temperatura da coluna	Fase Móvel	Fluxo da fase móvel	Tempo de Análise
HPLC/ RID	Açúcares orgânicos - Aminex HPX 87H	45° C	Ácido sulfúrico (5mM)	0,6 ml/min	24 min
UPLC/ PDA	Ácidos carboxílicos - C18 HSS T3 2,1 x 150 mm, 1,8 µl	30° C	Solvente(A): Ácido Fosfórico (125%) Solvente (B): Metanol (100%)	0,3 ml/min	15 min
HUPC/ ELSD	BEH Amida	30°C	Solvente (A): Metanol (80%) + Acetato de amônio (10Mm) + Hidróxido de amônio (0,2%) Solvente B: acetonitrila (40%) + acetato de amônio (10 mM) + Hidróxido de amônio (0,2%)	0,3 ml/min	11 min

■ Preparo das amostras para o peso seco

Foram retiradas as alíquotas de 5 mL do pré inóculo e de último ponto de cada fermentação para a realização do peso seco. Essas amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos,

e o *pellet* celular resultante foi ressuspensionado em 3 mL água destilada e transferido para um tubo de vidro de 10 mL (previamente pesado). Os tubos foram colocados em estufa de 60° C até que estivessem totalmente secos. Em seguida os tubos eram pesados novamente e o peso seco foi calculado usando como base a diferença entre os valores obtidos.

■ Resultados e Discussão

■ Seleção dos genes putativos para ALDH e ALDR

Com o objetivo de atenuar via competitiva e direcionar a conversão de GA para EG, foi realizada uma seleção *in silico* de possíveis ALDR e ALDH. A identificação dos genes codificantes para tais atividades permitirá posterior deleção e superexpressão dos genes em levedura com via completa para produção de EG. Com base nas análises de sequências e em estudos anteriores foram escolhidos os genes *ALD4*, *ALD5*, *ALD6*, *ADH7*, *SORI* e *YDR541C*. A *ALD4* em *S. cerevisiae* demonstrou atividade de aldeído redutase ao converter o 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) em furano-2,5-dimetanol (FDM) e 2,5-furandimetanol (FM), enquanto a *ADH7* exibiu atividade significativa de redutase para os compostos furfural, HMF e outros aldeídos, como o cinamaldeído, sugerindo sua possível função como aldeído redutase (LEWIS LIU et al., 2008). As *ALD5* e *ALD6* foram previamente descritas ao desempenhar funções semelhantes (Kurita & Nishida, 1999; Gupta et al., 2021). A *SORI* foi recentemente identificada como um gene putativo para xilitol desidrogenase em *K. phaffii* (HEISTINGER et al., 2022). Além disso, o trabalho de Paes também demonstrou que esse gene é regulado positivamente na presença de furaldeídos (PAES et al., 2021).

A *YDR541C* de *S. cerevisiae* demonstrou altos níveis de atividade de redução para aldeídos aromáticos e alifáticos em ensaios enzimáticos, além de evidências de ensaios enzimáticos diretos contra compostos com aldeídos que são inibidores frequentemente encontrados em hidrolisados de biomassa lignocelulósica (Moon & Liu, 2015). A seleção desses genes como alvos para este trabalho foi baseada em suas características e atividades relacionadas à redução e oxidação de aldeídos, tornando-os candidatos promissores para a notação de genes em *K. phaffii*.

■ Construção dos módulos de deleção

A estratégia de construção dos módulos de deleção está resumida na Figura 7 e envolve duas etapas de clonagem. Primeiramente, os genes alvo são amplificados por PCR a partir do genoma da levedura *K. phaffii*, seguidos pela subclonagem dos mesmos no vetor pGEM-T Easy. Em seguida, o vetor é digerido por enzimas de restrição para permitir a inserção do cassete de seleção e contrasseleção. Posteriormente, é realizada uma nova digestão para remover o módulo completo antes da transformação na levedura.

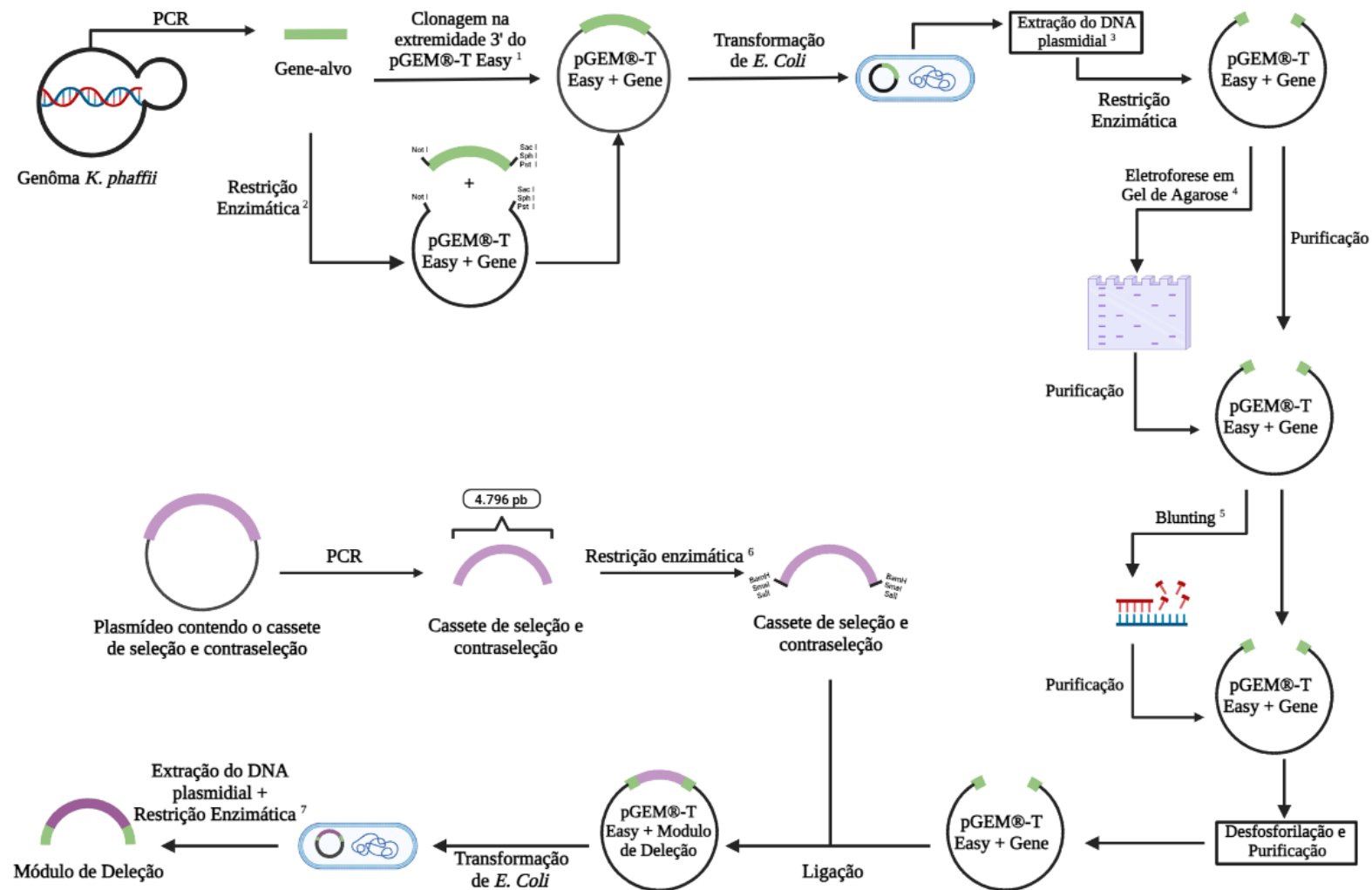


Figura 7. Esquema de construção do módulo de deleção.¹Etapa realizada para seqüências amplificadas dos genes *ALD4*, *ALD5* e *ADH7*. ²Etapa realizada para seqüências amplificadas dos genes *ALD6*, *SORI* e *YDR541C*. ³Restrição enzimática realizada de acordo com a enzimas da Tabela 9. ⁴Realizado para a seqüência amplificada para a deleção do gene *SORI*. ⁵Realizado para a seqüências amplificada do gene *ALD4*. ⁶Realizada de acordo com a Tabela 10. ⁷Restrição realizada com a enzima *NotI*.

4.2.1. Amplificação por PCR dos genes alvo

A amplificação dos genes selecionados foi realizada por PCR a partir do genoma da levedura *K. phaffii* X-33, utilizando os primers listados na Tabela 6. O cassete de seleção e contrasseleção foi amplificado a partir de DNA molde recebido pelo grupo. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos esperados, *ALD4* (1606 pb), *ALD5* (1916 pb), *ALD6* (1.524 pb), *ADH7* (1.437 pb), *SOR1* (1.561 pb), *YDR541C* (1.421 pb) e DR2-mazF-hyg (4.796), foram corretamente amplificados (Figura 8). A presença de bandas inespecíficas não prejudicou o processo de clonagem pois os fragmentos foram purificados do gel com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), antes de seguirem para as próximas etapas.

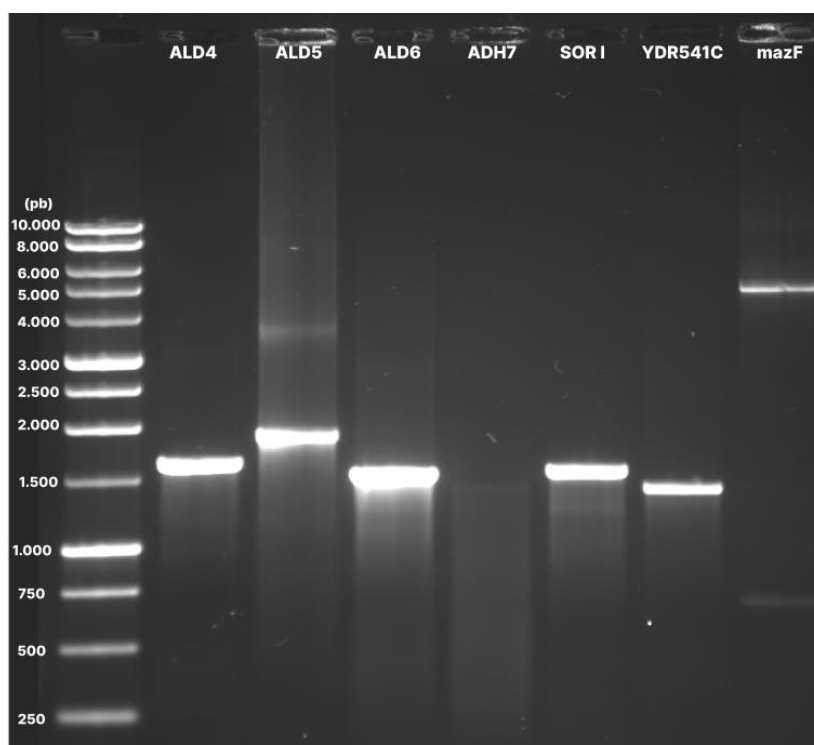


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) mostrando a amplificação por PCR dos seis genes alvo a partir do DNA molde da *K. phaffii* e do cassete de seleção e contrasseleção DR2-mazF-hyg (indicado como mazF) a partir do plasmídeo de origem.

4.2.2. Clonagem dos fragmentos gênicos e do cassete de seleção e contrasseleção no pGEM-T Easy

Após a purificação dos fragmentos amplificados por PCR, realizou-se a clonagem no vetor pGEM-T Easy. Para tanto, as sequências dos genes *ALD6*, *SORI* e *YDR541C* foram ligados ao vetor pelo sítio múltiplo de clonagem enquanto a sequência dos genes *ALD4*, *ALD5* e *ADH7* passaram por uma etapa adicional de restrição enzimática com as enzimas *SphI*, *NotI*, *PstI*, e *SacI*. O sistema de ligação foi montado em uma proporção de 3:1 de inserto para vetor, seguido por uma etapa de diálise em água ultrapura por 20 minutos. Essa diálise foi realizada para remover o sal residual e evitar o rompimento das células eletrocompetentes durante a transformação. Após a transformação das células de *E. coli* com os sistemas de ligação, as colônias resultantes foram selecionadas pela resistência ao antibiótico ampicilina e pela coloração branca ou azul. Foram selecionadas de 5 a 7 colônias brancas que crescidas na placa de transformação, em seguida foram inoculadas em meio LB e incubadas a 37 °C com agitação a 200 rpm durante a noite. Em seguida, o DNA plasmidial foi extraído usando o kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo) de acordo com as instruções do fabricante. A confirmação da construção desejada foi realizada por meio de reação de restrição do DNA plasmidial utilizando as enzimas de restrição listadas na Tabela 15. Essa reação de digestão foi seguida pela análise em gel de eletroforese em agarose ilustrada na Figura 9 onde eram esperadas duas bandas, uma correspondente ao vetor de expressão e outra banda corresponde ao tamanho aproximado dos genes.

Como pode-se observar na Figura 9, os genes *ALD4*, *ALD6*, *ADH7*, *SORI* e *YDR541C* foram clonados corretamente, assim como o cassete de seleção e contrasseleção. Dessa forma, entre as sete construções propostas nessa etapa, seis foram bem-sucedidas. Posteriormente, os fragmentos gênicos foram sequenciados para confirmação da sequência desejada pela empresa CLINILAB - laboratório veterinário LTDA). Mesmo após várias tentativas de clonagem (com e sem digestão do produto de PCR) não foi possível clonar o gene *ALD5* no vetor pGEM-T Easy. Essa dificuldade pode ter sido causada por problemas no sistema de ligação ou por outras razões que requerem uma investigação mais detalhada. Dessa forma, prosseguimos para as próximas etapas com os demais genes.

Tabela 15. Enzimas de restrição usadas para confirmar a clonagem dos genes alvo e o cassete de seleção e contrasseleção no vetor comercial.

Plasmídeos	Enzima para confirmação	Fragmentos esperados (pb)
------------	-------------------------	---------------------------

pGEM-T Easy_ALD4	<i>NotI e SphI</i>	2.964 e 1.583
pGEM-T Easy_ALD5	<i>NotI e PstI</i>	3.015 e 1916
pGEM-T Easy_ALD6	<i>XhoI</i>	3.027 e 1.512
pGEM-T Easy_SORI	<i>XhoI</i>	3.027 e 1.549
pGEM-T Easy_ADH7	<i>Sall e ScaI</i>	2.628 e 1.748
pGEM-T Easy_YDR541C	<i>NotI e</i>	2.970 e 1.410
pGEM-T Easy_DR2-MazF-Hyg	<i>BamHI</i>	4.784 e 3.027

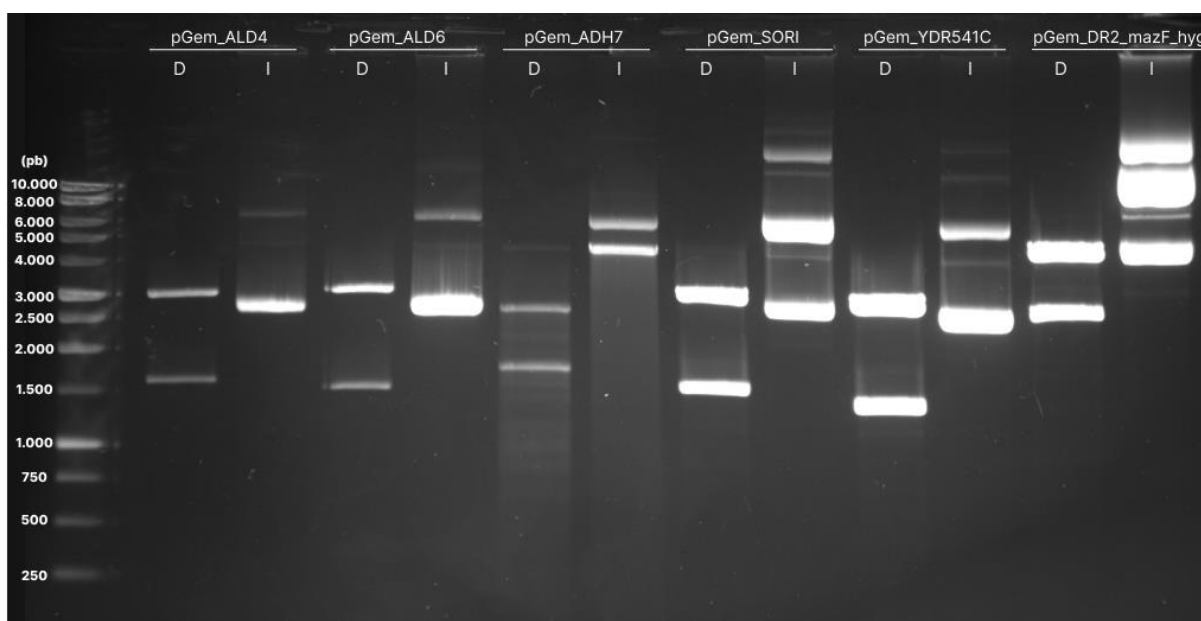


Figura 9. Gel de agarose (0.8%) mostrando a digestão de confirmação para os seis plasmídeos construídos. Plasmídeo digerido (D) e plasmídeo intacto (I).

4.2.3. -Clonagem do cassete de seleção e contrasseleção no vetor com o gene alvo.

Com o objetivo de construir os módulos de deleção, o cassete de seleção e contrasseleção foi inserido nos plasmídeos contendo os fragmentos gênicos, que foram obtidos na etapa anterior. Para isso, o plasmídeo pGEM-T Easy_DR2-mazF-hyg foi previamente digerido com *Bam*HI (para o gene *ALD6*), *Sma*I (para o gene *ALD4*), *Sal*II (para o gene *ADH7*) e *Kpn*I/*Bam*HI (para o gene *SORI*) para excisão e purificação do cassete de seleção e contrasseleção. De igual forma os plasmídeos contendo os genes a serem interrompidos também foram digeridos e linearizados com as enzimas *Nco*I, *Eco*RV, *Bam*HI, *Sal*II, *Xho*I e *Kpn*I (conforme a Tabela 9). A ligação entre o cassete de seleção e contrasseleção e os plasmídeos pGEM-T_Easy-*ALD4*, pGEM-T_Easy-*ALD6*, pGEM-T_Easy-*ADH7*, pGEM-T_Easy-*SORI*, pGEM-T_Easy-*YDR541C* foi realizada e em seguida, o sistema de ligação foi usado para transformar células de *E. coli*. As colônias que cresceram na placa de transformação, apresentaram resistência à ampicilina e por isso foram selecionadas. Essas colônias foram então inoculadas em meio LB e incubadas a 37 °C com agitação a 200 rpm durante a noite. A etapa de extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando o kit GeneJET Plasmid Miniprep conforme as instruções do fabricante. Em seguida, o DNA plasmidial foi submetido a análise de restrição com a enzima *Pvu*II visando confirmar a inserção do cassete de seleção e contrasseleção. Na Figura 10 é possível visualizar as bandas de 4.708, 2.564, 1.187 e 864 pb esperadas para a construção pGEM-T Easy-*ALD6*_mazF e bandas de 4.014, 2.564, 1.941 e 683 pb para construção pGemT-Easy-*YDR541C*_mazF. Esses resultados indicam que a inserção do cassete de seleção e contrasseleção nos plasmídeos construídos foi bem-sucedida para dois genes que posteriormente foram usados para a transformação em *K. phaffii*.

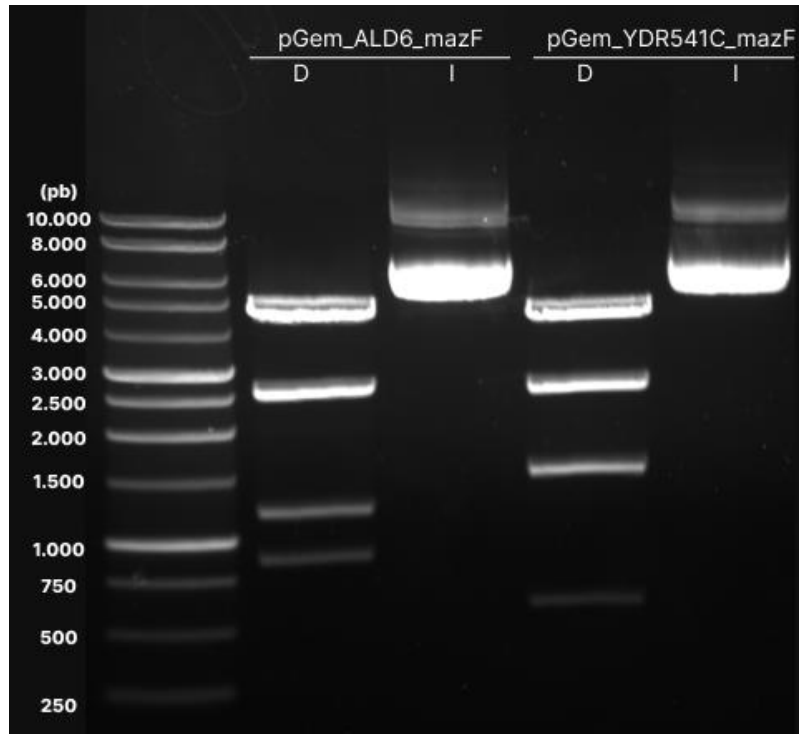


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) que confirma a construção dos plasmídeo pGEM-T Easy_*ALD6*_mazF (4.014, 2.564, 1.941 e 683 pb) e pGEM-T Easy_*YDR541C*_mazF (4.014, 2.564, 1.941 e 683 pb).

As construções dos demais genes não foram bem-sucedidas, pois em algumas colônias foi observado um padrão de recombinação ou a presença do plasmídeo vazio. Como por exemplo na Figura 11 para o gene *ALD4* possível observar a digestão com *PvuII* em A para três clones e em B para 1 clone de outra transformação. O padrão esperado era de 3.786, 2.564, 1.837 e 1.132 bp totalizando aproximadamente 9.300 pb sendo o primeiro fragmento correspondente ao cassete de seleção e contrasseleção, porém o observado é que para os três clones da Figura 11-A apresentaram bandas de 2.500, 2.000, 1.100 e 800 pb totalizando 6.400 pb o que corresponderia a um padrão de recombinação do cassete de seleção e contrasseleção, pois o plasmídeo contendo somente o gene tem em torno de 4.500 pb e a banda correspondente ao cassete de seleção e contrasseleção teria em torno de 3.786 pb e não aparece em nenhum clone. Na Figura 11-B o padrão de recombinação ocorre novamente com diferença da banda de 1.100 que está um pouco mais alta.

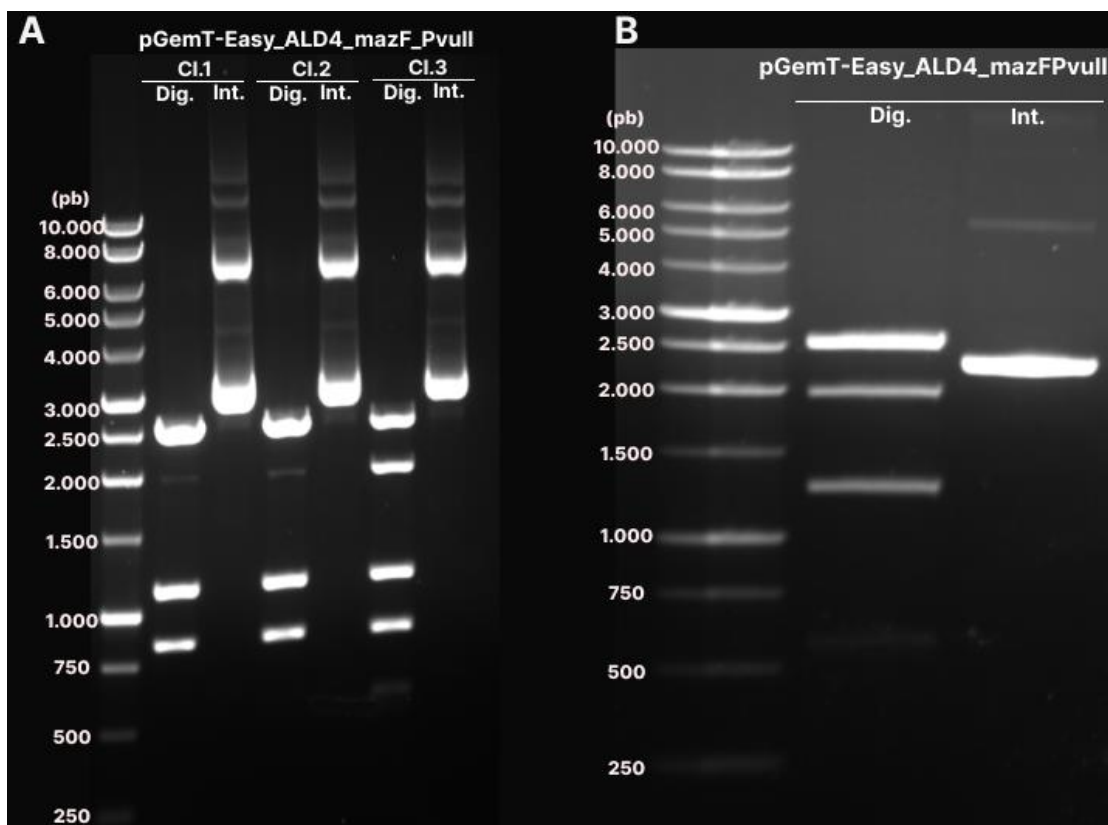


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose (0,8%). Em A digestões com *PvuII* para as colônias 1-3 dos transformantes do pGemT-Easy_ALD4_mazF. Bandas esperadas: 3.786, 2.564, 1.837 e 1.132 bp. Em B a mesma digestão com um clone de outra transformação. Plasmídeo digerido (Dig.) e plasmídeo intacto (Int.).

Para o gene *ADH7*, na Figura 12, pode-se observar duas imagens de géis de eletroforese em agarose correspondentes à digestão com *PvuII* de diferentes clones de transformações distintas. Na Figura 12-A, as colônias testadas apresentam bandas de 2.500, 2.000 e uma acima de 1.500 pb, enquanto o esperado era 4.718, 2.564 e 1.860 pb, indicando que o plasmídeo estava vazio e provavelmente ocorreu algum problema na ligação. Na Figura 12-B, ocorre um padrão de recombinação, pois somando todas as bandas correspondentes dos clones 1 e 2, obtém-se um vetor de aproximadamente 6.800 pb, diferente do esperado, que, somando o vetor com o gene e o cassete de seleção e contrasseleção, apresentariam um tamanho final de aproximadamente 9.100 pb. A colônia 3 também não apresentou as bandas esperadas; além disso, as várias bandas presentes não se justificariam pelo efeito estrela da enzima, uma vez que o tempo de reação foi o mesmo para as três colônias.

A dificuldade de se obter clones positivos mesmo após diferentes transformações se dão principalmente pela região DR2 (região repetitiva) do cassete de seleção e contrasseleção facilitando o processo de recombinação.

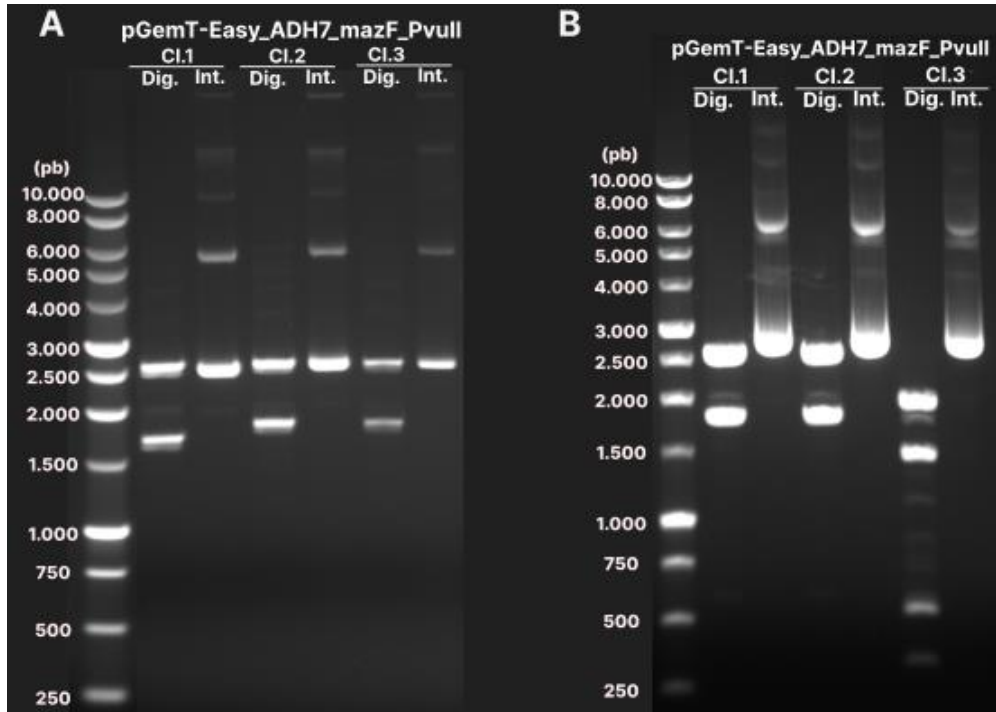


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose (0,8%). Em A digestões com PvuII para as colônias 1-3 dos transformantes do pGemT-Easy_ADH7_mazF. Bandas esperadas: 4.718, 2.564 e 1.860 bp. Em B a mesma digestão com 3 clones de transformações distintas. Plasmídeo digerido (Dig.) e plasmídeo intacto (Int.).

E por fim para a construção do módulo do último *SORI* era necessário digerir o vetor pGemT-Easy_*SorI* com as enzimas *BamHI* e *KpnI* com o objetivo de linearizar (fragmento de 4.283 pb) e liberar um fragmento de 293 pb, para posterior ligação com o cassete de seleção e cotrarseleção. Porém na Figura 13-A é possível notar que a digestão não foi bem-sucedida, então levantou-se a suspeita de que alguma das enzimas não estavam funcionando. Para confirmar essa hipótese foram realizadas duas digestões, uma com *PvuII* (caso nenhuma das enzimas estivessem funcionando) e outra começando com *KpnI* e após 1 hora foi adicionado a enzima *BamHI*. Em B é possível notar que a enzima pvuII liberou os fragmentos esperados de 2.500 e 2.000 pb, curiosamente uma banda de acima de 1.500 pb também apareceu, indicando um sitio não esperado para essa enzima. A digestão seguinte é possível visualizar que a enzima BamHI foi capaz de linearizar o plasmídeo, porém sem o efeito da *KpnI* o fragmento de 253 pb não foi liberado.

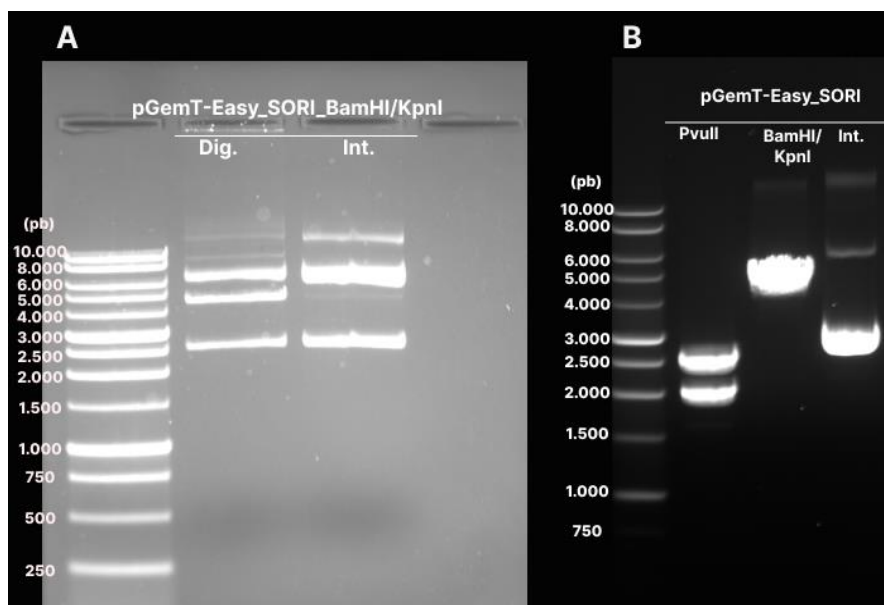


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose (0,8%). Na Figura A, digestão do vetor pGemT-Easy_SORI com as enzimas *BamHI* e *KpnI*, com bandas esperadas de 4.283 e 293 pb. Na Figura B, uma nova digestão com *PvuII*, com fragmentos esperados de 2.500 e 2.000 pb. Um fragmento acima de 1.500 pb pode indicar a presença de outros locais de digestão no plasmídeo. Seguida por uma digestão com *KpnI* e, após 1 hora, adição de *BamHI*.

4.2.4. Deleção dos genes alvo em *K. phaffii*

Antes da transformação em *K. phaffii*, foi realizada uma etapa de extração do DNA plasmidial utilizando o kit QIAGEN Plasmid Plus Midi conforme as instruções do fabricante para se obter uma grande quantidade de material para transformação de *K. phaffii*. Em seguida, o módulo de deleção foi obtido pela restrição do plasmídeo com a enzimas *NotI*. Finalmente, a purificação do cassete foi feita usando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up para assegurar que nenhuma outra parte do vetor pudesse integrar-se ao genoma da levedura. Na Figura 14 é possível visualizar os módulos *ALD6_mazF* e *YDR541C_mazF* purificados,

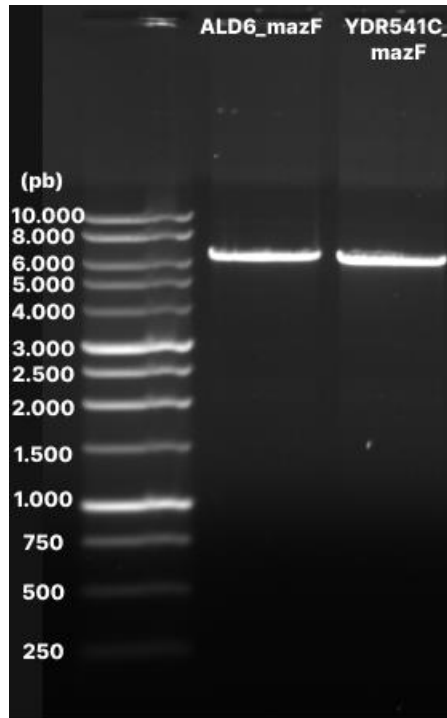


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) que a purificação dos módulos *ALD6_mazF* com aproximadamente 6.400 pb e *YDR541C_mazF* com aproximadamente 6.200 pb.

Para a deleção dos genes *ALD6* e *YDR541C* em *K. phaffii*, os módulos construídos e purificados na etapa anterior foram linearizados e usados para a transformação da levedura. Após a transformação, 9 colônias correspondentes do gene *ALD6* e 18 colônias correspondentes do gene *YDR541C* foram crescidas em meio seletivo (YPD com higromicina 200 µg/mL) foram repicadas para uma nova placa. As colônias foram selecionadas para a realização de uma PCR multiplex utilizando os primer *forwards*, *reverse* do gene, e Seq-MDH-R ou InpLRA-R. O objetivo foi verificar se o módulo de deleção havia sido integrado no genoma da levedura na localização correta (Figura 15). Caso a inserção do módulo fosse bem-sucedida, o par de primers *forwards* e Seq-MDH-R do gene deveria amplificar um fragmento de aproximadamente 2.500 pb para o gene *ALD6* (Figura 15-A) e 1.500 pb para *YDR541C* (Figura 15-D). Por outro lado, se a inserção não fosse bem-sucedida os primers *forwards* e *reverse* do gene amplificaram o seu tamanho original, de aproximadamente 1.500 pb para a *ALD6* (Figura 15-B) e 1.400 para *YDR541C* (Figura 15-E).

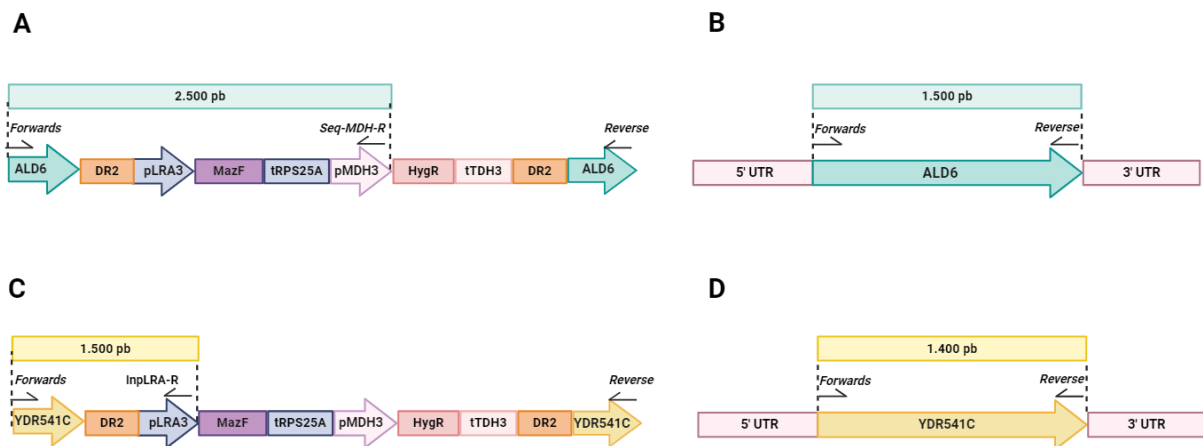


Figura 15. Ilustração representativa dos fragmentos esperados da PCR multiplex para confirmação da integração do módulo de deleção no genoma de *K. phaffii*. Na Figura A, é possível observar o fragmento resultante com aproximadamente 2.500 pb, enquanto na Figura B, visualiza-se o fragmento resultante da amplificação do tamanho do gene, aproximadamente 1.500 pb, correspondente ao gene *ALD6*. Já em C, nota-se o fragmento resultante de aproximadamente 1.500 pb, enquanto em D, observa-se o tamanho original do gene *YDR541C*, com aproximadamente 1.400 pb.

Foram testadas 18 colônias correspondentes para o gene *YDR541C*. Na Figura 16 é possível visualizar que os clones 1, 2, 5, 6, 7, 8, 14 e 18 apresentaram duas bandas, uma de 1.500 pb e outra abaixo de 2.000 pb diferente dos controles e do padrão esperado. Para o controle positivo no caso de êxito na inserção do módulo foi usado o plasmídeo pGemT-Easy_*YDR541C_mazF*, o plasmídeo pGemT-Easy_*YDR541C* foi utilizado para o controle caso a levedura não tivesse integrado o módulo e o DNA genômico da *K. phaffii* X-33 foi usado para ter como base o tamanho do gene da levedura não transformada. O controle negativo foi feito para assegurar e garantir que a reação não estava contaminada, gerando possíveis bandas inespecíficas.

Os clones 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 15 e 17 apresentaram somente uma banda acima de 1.500 pb. Essas linhagens foram nomeadas como *K. phaffii* X-33_*YDR541C_mazF* e o DNA genômico foi extraído com o intuito de realizar uma nova PCR que fosse mais esclarecedora. Os demais clones que apresentaram duas bandas foram descartados.



Figura 16. Eletroforese em gel de agarose (0,8%). PCR multiplex utilizando os primers *YDR541C*-NotI-F, *YDR541C*-PstI-R e *InpLRA*-R. Para o controle positivo (C+) foi usado a construção pGemT-Easy_*YDR541C_mazF* resultando em bandas de 1.500 pb.

Para o gene *ALD6*, foram avaliadas diversas colônias resultantes de diferentes transformações. Na Figura 17, são apresentados exemplos dos padrões observados nas PCR de colônias. Para o controle negativo (C-) foi usado o plasmídeo sem o *mazF* (pGemT-Easy_*ALD6*) resultando na amplificação do gene do tamanho original de aproximadamente 1.500 pb e para o controle positivo (C+) foi usado o plasmídeo contendo o *mazF* (pGemT-Easy_*ALD6_mazF*) resultando na amplificação de parte do gene e parte do *mazF* (Figura 17-A). O DNA genômico da *K. phaffii* X-33 foi usado como controle de uma levedura não transformada.

Para as colônias 1, 2 e 9 não houve o aparecimento de bandas e por se tratar de uma PCR de colônia fatores como uma grande quantidade de material ou tempo insuficiente para desnaturar a parede celular da levedura podem ter interferido na reação. Uma nova reação foi realizada e novamente nada apareceu no gel. As colônias 3, 4, 5, 6, 7 e 8 apresentaram bandas do tamanho correspondente ao controle negativo e ao DNA genômico da levedura selvagem amplificando o tamanho original do gene.

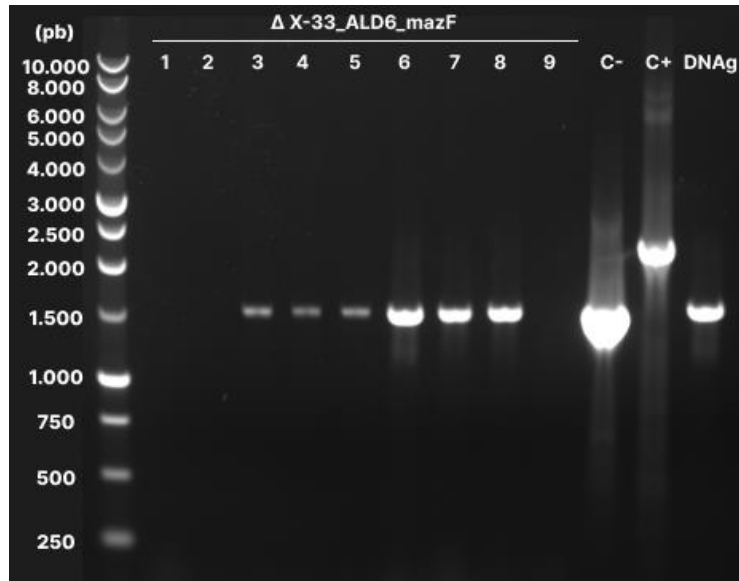
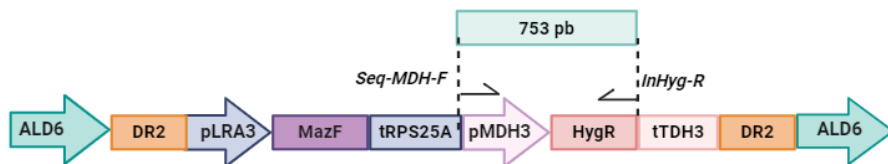


Figura 17. 13 Eletroforese em gel de agarose (0,8%). PCR multiplex utilizando os primers ALD6-XhoI-F, ALD6-XhoI-R e Seq-MDH-R para confirmar a deleção do gene ALD6. Para o controle negativo (C-) usou-se o plasmídeo pGemT-Easy_ALD6 com banda de 1.500 pb e para o controle para o (C+) usou-se o plasmídeo pGemT-Easy_ALD6_mazF.

As leveduras transformadas levaram cerca de 96 horas para crescerem, por tanto levantou-se a hipótese de que o crescimento das colônias só ocorria depois que o antibiótico começava a ser degradado, para confirmar essa hipótese foi realizada uma PCR usando os primers Seq-MDH-F e InHyg-R para amplificar uma banda de aproximadamente 753 pb, correspondente ao gene responsável por conferir resistência a higromicina nas leveduras (Figura 18) confirmando que o cassete havia sido integrado no genoma.

A



B



Figura 18. Ilustração representativa dos fragmentos esperados da PCR usando os primers Seq-MDH-F e InHyg-R com o intuito de amplificar o fragmento de 753 pb corresponde ao gene da higromicina.

Na Figura 19 os controles usados na reação de PCR anterior foram os mesmos, porém, dentre eles somente o plasmídeo pGemT-Easy_*ALD6*_mazF apresentaria a banda esperada uma vez que continha o gene da higromicina. Como observado, nenhum dos clones apresentou a banda de 753 pb indicando que para as transformações do gene *ALD6* a integração do módulo de deleção não estava ocorrendo e as colônias observadas nas placas poderiam estar crescendo somente após a degradação do antibiótico.



Figura 19. Eletroforese em gel de agarose (0,8%). PCR de colônia dos transformantes do gene *ALD6* usando os primers Seq-MDH-F e InHyg-R a fim de se obter um fragmento de 753 pb. Controles: vetor com o gene (pGemT-Easy_*ALD6*); vetor contendo gene e o cassete de seleção e contrasseleção (pGemT-Easy_*ALD6*_mazF); DNA genômico de uma levedura selvagem (DNAg) e controle negativo da reação (C-).

Para as colônias obtidas na transformação da *K. phaffi* X-33_*YDR541C*_mazF as colônias 3, 4, 9, 10, 11 e 12 foram selecionadas para uma etapa de extração de DNA genômico antes da PCR com o intuito de obter o material genético com uma melhor qualidade. Na Figura 20 é possível observar o fragmento esperado, conforme realizado para o gene anterior. Na Figura 20 os controles usados foram os mesmo da PCR anterior e foi possível observar que em todos os clones testados a banda de 753 pb esperada apareceu, confirmando que esses clones foram transformados e integraram o módulo de deleção. Eles foram preservados para posteriores análises (como sequenciamento e cultivo).



Figura 20. Eletroforese em gel de agarose (0,8%). PCR de colônia dos transformantes do gene YDR541C usando os primers Seq-MDH-F e InHyg-R a fim de se obter um fragmento de 753 pb. Controles: vetor com o gene (pYDR541C); vetor contendo gene e o cassete de seleção e contrasseleção (pYDR541C_mazF); DNA genômico de uma levedura selvagem (DNAg) e controle negativo da reação (C-).

■ Fermentação em biorreator

O DCCR foi adotado como técnica estatística para otimizar os processos e experimentos realizados neste estudo. O objetivo principal do DCCR é investigar o efeito simultâneo de múltiplos fatores em um sistema ou processo, utilizando análises estatísticas visando estabelecer uma relação controlada entre os efeitos das variáveis de pH e aeração e a resposta do sistema, visando maximizar a eficiência e a produtividade, enquanto se minimizam os custos e o tempo envolvidos. O DCCR foi empregado para avaliar os efeitos dos fatores pO₂ (pressão parcial de oxigênio) e pH na formação de EG utilizando quatro pontos axiais ($\alpha = 1,41$), quatro pontos fatoriais e três repetições do ponto central, totalizando 11 experimentos conforme apresentado na Tabela 13. Para este experimento, foi utilizado a linhagem *K. phaffii* JA122 cultivada em meio FM22 com uma proporção de 40 g/L de xilose para 20 g/L de glicose. Os dados de produção obtidos ao final do experimento podem ser observados na Tabela 16. Nas condições 5, 7 e 8 foram obtidos 5,5, 5,9 e 5,1 g/L de EG respectivamente, o que supera a maior produção descrita na literatura para levedura modificadas geneticamente para o uso de xilose como fonte de carbono por meio da via de Dahmas com produção de 0,0014 g/L pela cepa *S. cerevisiae* H4099 (Salusjärvi et al., 2017) e 4,0 g/L pela cepa *S. cerevisiae* H131-A3CS que tem a inserção da via da Xilulose-1-fosfato para o uso de xilose como substrato (Uranukul et al., 2019).

Tabela 16. Dados da Produção de EG por cada condição realizada.

Condição	pH	pO ₂	Biomassa (g)	EG (g/L)	Produtividade (g/L/h ⁻¹)	AG (g/L)
1	5,44	4,62	47,2	1,448	0,04	1,595
2	7,56	4,62	49,1	4,399	0,11	0,419
3	5,44	17,38	46,5	0,908	0,02	1,48
4	7,56	17,38	53,6	0,516	0,01	0,585
5	5	11	44,2	5,5	0,14	0,313
6	8	11	62,7	0,266	0,01	0,44

7	6,5	2	37,9	5,958	0,16	0,44
8	6,5	20	46,8	5,15	0,13	0,165
9	6,5	11	44,7	4,447	0,12	0,465
10	6,5	11	49,9	4,945	0,13	0,47
11	6,5	11	52,3	0,536	0,01	0,565

Embora toda a parte experimental e de análise tenha sido concluída, o modelo preditivo construído não demonstrou significância estatística. Na Figura 21 é possível observar os gráficos da superfície de resposta juntamente com o gráfico de pareto gerado pelo programa *statistics*. É possível observar que em nenhum dos tempos de cultivo escolhidos para realizar a análise obteve-se significância, em todos os dados analisados a significância foi maior que $p > 0,5$.

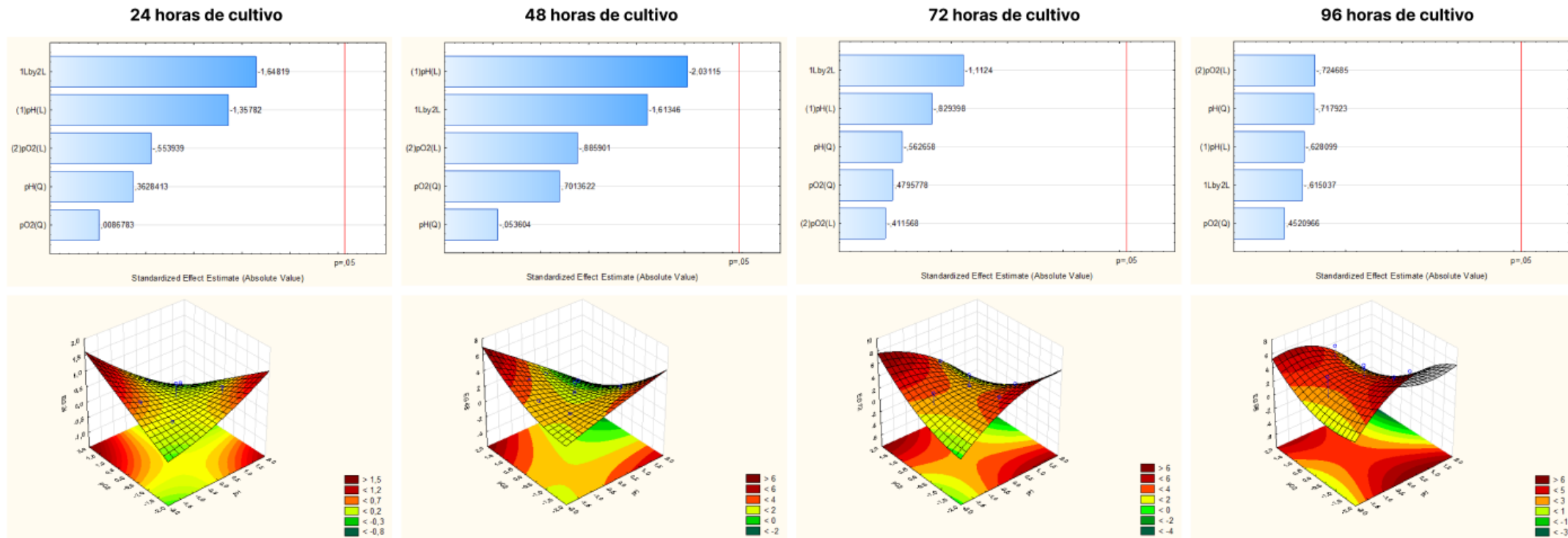


Figura 21. Gráficos gerados pelo programa statistics. Gráficos de Pareto mostrando que nenhuma das variáveis testadas atingiu $p < 0,5$. Gráficos de correlação entre as variáveis pH e pO₂ em relação a produção de EG para as diferentes horas de cultivo.

Diversas hipóteses foram levantadas para elucidar essa não significância, incluindo a discrepância na quantidade de açúcares quantificados no início de cada fermentação. O experimento foi planejado em três blocos distintos Tabela 17, cada um contendo um ponto central para garantir a triplicação dos dados. Entretanto, em um dos blocos, os dados se mostraram bastante discrepantes tanto em relação ao ponto central quanto às condições avaliadas, possivelmente causando variações na construção do modelo.

Na construção do modelo, foram utilizados os dados da produção de EG, juntamente com as variáveis pH e pO₂ (que estão codificadas na Tabela 13). Na tentativa de obter significância no modelo, também foram testadas as produções de EG nos tempos de 24, 48 e 72 horas, as quais não apresentaram significância estatística. A produção de EG em algumas condições serve como um indicativo para o aprimoramento dessa linhagem, visando a deleção dos demais genes propostos neste trabalho.

Tabela 17. Tabela com os blocos e as respectivas condições testadas e o número do vaso do fermentador usado.

	Vasos			
	1	2	3	4
Bloco 1	Cond. 9	Cond. 7	Cond. 3	Cond. 2
Bloco 2	Cond. 10	Cond. 8	Cond. 2	Cond. 5
Bloco 3	Cond. 11	Cond. 6	Cond. 4	Cond. 1

■ Conclusão

Através deste estudo, foram desenvolvidos módulos para a deleção dos genes ALD6 e *YDR541C*. Confirmou-se a integração bem-sucedida do módulo para o gene *YDR541C* no genoma de *K. phaffii*. No entanto, devido à limitação de recursos ou protocolos, não foi possível conduzir análises bioquímicas abrangentes para avaliar o impacto da deleção. Em relação ao gene ALD6, os resultados não corroboraram o sucesso das transformações realizadas.

Os plasmídeos adicionais construídos foram preservados para uso futuro, garantindo recursos valiosos para pesquisas subsequentes. Quanto à otimização do bioprocesso para a produção de EG a partir de xilose, embora não tenha sido possível desenvolver um modelo preditivo robusto e válido estatisticamente, é digno de nota que, em diversas condições testadas, foram alcançadas concentrações de cerca de 5 g/L de EG.

Este resultado é notável, superando a produção máxima previamente registrada na literatura para leveduras que empregam a via de Dham, utilizando xilose como substrato. Esses resultados promissores fornecem uma base sólida para investigações futuras e sugerem novas estratégias para otimizar o processo de produção de etanol a partir de glicerol.

Perspectivas

Os planos futuros incluem a clonagem da sequência do gene ALD5 e linhagens de *K. phaffii* com os genes selecionados deletados. Além disso, pretende-se investigar como os parâmetros pH e pO₂ influenciam a fermentação em biorreator para a produção de EG pela linhagem *K. phaffii* JA122. Com o uso de linhagens recombinantes e otimização do bioprocesso, esperamos um aumento significativo da produção de EG por *K. phaffii* a partir de fontes renováveis, abrindo caminho para a aplicação comercial deste bioproduto de alto valor agregado.

■ Referências

- Alper, H.; Stephanopoulos, G. Engineering For Biofuels: Exploiting Innate Microbial Capacity Or Importing Biosynthetic Potential?. **Nature Reviews Microbiology**, [S. L.], V. 7, N. 10, P. 715–723, 2009.
- Antifreeze Market Size, Share, Trends Analysis [2023 Report]. [S. L.: S. N.], [S. D.]. Disponível Em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/antifreeze-market>. Acesso Em: 28 Jun. 2023.
- Antwi, E.; Engler, N.; Nelles, M.; Schüch, A. Anaerobic Digestion And The Effect Of Hydrothermal Pretreatment On The Biogas Yield Of Cocoa Pods Residues. **Waste Management**, [S. L.], V. 88, P. 131–140, 2019.
- Anu; Kumar, A.; Rapoport, A.; Kunze, G.; Kumar, S.; Singh, D.; Singh, B. Multifarious Pretreatment Strategies For The Lignocellulosic Substrates For The Generation Of Renewable And Sustainable Biofuels: A Review. **Renewable Energy**, [S. L.], V. 160, P. 1228–1252, 2020.
- Ashokkumar, V.; Venkatkarthick, R.; Jayashree, S.; Chuetor, S.; Dharmaraj, S.; Kumar, G.; Chen, W.-H.; Ngamcharussrivichai, C. Recent Advances In Lignocellulosic Biomass For Biofuels And Value-Added Bioproducts - A Critical Review. **Bioresource Technology**, [S. L.], V. 344, P. 126195, 2022.
- Bamba, T.; Yukawa, T.; Guirimand, G.; Inokuma, K.; Sasaki, K.; Hasunuma, T.; Kondo, A. Produção De 1,2,4-Butanotriol A Partir De Xilose Por *Saccharomyces Cerevisiae* Através De Engenharia Metabólica De Fe. **Metabolic Engineering**, [S. L.], V. 56, P. 17–27, 2019.
- Bonfiglio, F.; Cagno, M.; Yamakawa, C. K.; Mussatto, S. I. Production Of Xylitol And Carotenoids From Switchgrass And Eucalyptus Globulus Hydrolysates Obtained By Intensified Steam Explosion Pretreatment. **Industrial Crops And Products**, [S. L.], V. 170, P. 113800, 2021.
- Carneiro, C. V. G. C.; Serra, L. A.; Pacheco, T. F.; Ferreira, L. M. M.; Brandão, L. T. D.; Freitas, M. N. De M.; Trichez, D.; Almeida, J. R. M. De. Advances In *Komagataella Phaffii* Engineering For The Production Of Renewable Chemicals And Proteins. **Fermentation**, [S. L.], V. 8, N. 11, P. 575, 2022.

Chae, T. U.; Choi, S. Y.; Ryu, J. Y.; Lee, S. Y. Production Of Ethylene Glycol From Xylose By Metabolically Engineered Escherichia Coli. **Aiche Journal**, [S. L.], V. 64, N. 12, P. 4193–4200, 2018.

Chai, W. S.; Bao, Y.; Jin, P.; Tang, G.; Zhou, L. A Review On Ammonia, Ammonia-Hydrogen And Ammonia-Methane Fuels. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S. L.], V. 147, P. 111254, 2021.

Chen, Z.; Huang, J.; Wu, Y.; Wu, W.; Zhang, Y.; Liu, D. Metabolic Engineering Of Corynebacterium Glutamicum For The Production Of 3-Hydroxypropionic Acid From Glucose And Xylose. **Metabolic Engineering**, [S. L.], V. 39, P. 151–158, 2017.

David, A. J.; Abinandan, S.; Vaidyanathan, V. K.; Xu, C. C.; Krishnamurthi, T. `A Critical Review On Current Status And Environmental Sustainability Of Pre-Treatment Methods For Bioethanol Production From Lignocellulose Feedstocks. **3 Biotech**, [S. L.], V. 13, N. 7, P. 233, 2023.

David, A. J.; Abinandan, S.; Vaidyanathan, V. K.; Xu, C. C.; Krishnamurthi, T. `A Critical Review On Current Status And Environmental Sustainability Of Pre-Treatment Methods For Bioethanol Production From Lignocellulose Feedstocks. **3 Biotech**, [S. L.], V. 13, N. 7, P. 233, 2023.

Dharmaraja, J.; Shobana, S.; Arvindnarayan, S.; Francis, R. R.; Jeyakumar, R. B.; Saratale, R. G.; Ashokkumar, V.; Bhatia, S. K.; Kumar, V.; Kumar, G. Lignocellulosic Biomass Conversion Via Greener Pretreatment Methods Towards Biorefinery Applications. **Bioresource Technology**, [S. L.], V. 369, P. 128328, 2023.

Epe. 2020. Análise Do Perspectiva Atual Dos Biocombustíveis 2019.

Fan, D.; Dai, D.-J.; Wu, H.-S. Ethylene Formation By Catalytic Dehydration Of Ethanol With Industrial Considerations. **Materials**, [S. L.], V. 6, N. 1, P. 101–115, 2013.

Fonseca, B. G.; Mateo, S.; Roberto, I. C.; Sánchez, S.; Moya, A. J. Bioconversion In Batch Bioreactor Of Olive-Tree Pruning Biomass Optimizing Treatments For Ethanol Production. **Biochemical Engineering Journal**, [S. L.], V. 164, P. 107793, 2020.

Gu, P.; Li, F.; Huang, Z. Engineering Escherichia Coli For Isobutanol Production From Xylose Or Glucose–Xylose Mixture. **Microorganisms**, [S. L.], V. 11, N. 10, P. 2573, 2023.

Gupta, A.; Krishna Rao, K.; Sahu, U.; Rangarajan, P. N. Characterization Of The Transactivation And Nuclear Localization Functions Of Pichia Pastoris Zinc Finger Transcription Factor Mxr1p. **The Journal Of Biological Chemistry**, [S. L.], V. 297, N. 4, P. 101247, 2021.

Hamraoui, K.; Gil, A.; El Bari, H.; Siles, J. A.; Chica, A. F.; Martín, M. A. Evaluation Of Hydrothermal Pretreatment For Biological Treatment Of Lignocellulosic Feedstock (Pepper Plant And Eggplant). **Waste Management**, [S. L.], V. 102, P. 76–84, 2020.

Heistingering, L.; Dohm, J. C.; Paes, B. G.; Koizar, D.; Troyer, C.; Ata, Ö.; Steininger-Mairinger, T.; Mattanovich, D. Genotypic And Phenotypic Diversity Among Komagataella Species Reveals A Hidden Pathway For Xylose Utilization. **Microbial Cell Factories**, [S. L.], V. 21, N. 1, P. 70, 2022.

Jasmine, A.; Rajendran, M.; Thirunavukkarasu, K.; Abinandan, S.; Vaidyanathan, V. K.; Krishnamurthi, T. Microwave-Assisted Alkali Pre-Treatment Medium For Fractionation Of Rice Straw And Catalytic Conversion To Value-Added 5-Hydroxymethyl Furfural And Lignin Production. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S. L.], V. 236, P. 123999, 2023.

Jiao, J.; Wang, S.; Liang, M.; Zhang, Y.; Xu, X.; Zhang, W.; Liu, B. Basal Transcription Profiles Of The Rhamnose-Inducible Promoter Plra3 And The Development Of Efficient Plra3-Based Systems For Markerless Gene Deletion And A Mutant Library In Pichia Pastoris. **Current Genetics**, [S. L.], V. 65, N. 3, P. 785–798, 2019.

Kawabe, K. Development Of Highly Selective Process For Mono-Ethylene Glycol Production From Ethylene Oxide Via Ethylene Carbonate Using Phosphonium Salt Catalyst. **Catalysis Surveys From Asia**, [S. L.], V. 14, N. 3, P. 111–115, 2010.

Khalil, A. S.; Collins, J. J. Synthetic Biology: Applications Come Of Age. **Nature Reviews Genetics**, [S. L.], V. 11, N. 5, P. 367–379, 2010.

Khalil, A. S.; Collins, J. J. Synthetic Biology: Applications Come Of Age. **Nature Reviews Genetics**, [S. L.], V. 11, N. 5, P. 367–379, 2010.

Kurita, O.; Nishida, Y. Involvement Of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Ald5 In Maintenance Of The Mitochondrial Electron Transport Chain In Saccharomyces Cerevisiae. **Fems Microbiology Letters**, [S. L.], V. 181, N. 2, P. 281–287, 1999.

Kuroda, K.; Narihiro, T.; Shinshima, F.; Yoshida, M.; Yamaguchi, H.; Kurashita, H.; Nakahara, N.; Nobu, M. K.; Noguchi, T. Q. P.; Yamauchi, M.; Yamada, M. High-Rate Cotreatment Of Purified Terephthalate And Dimethyl Terephthalate Manufacturing Wastewater By A Mesophilic Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor And The Microbial Ecology Relevant To Aromatic Compound Degradation. **Water Research**, [S. L.], V. 219, P. 118581, 2022.

Leong, H. Y.; Chang, C.-K.; Khoo, K. S.; Chew, K. W.; Chia, S. R.; Lim, J. W.; Chang, J.-S.; Show, P. L. Waste Biorefinery Towards A Sustainable Circular Bioeconomy: A Solution To Global Issues. **Biotechnology For Biofuels**, [S. L.], V. 14, N. 1, P. 87, 2021.

Lewis Liu, Z.; Moon, J.; Andersh, B. J.; Slininger, P. J.; Weber, S. Multiple Gene-Mediated Nad(P)H-Dependent Aldehyde Reduction Is A Mechanism Of In Situ Detoxification Of Furfural And 5-Hydroxymethylfurfural By *Saccharomyces Cerevisiae*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S. L.], V. 81, N. 4, P. 743–753, 2008.

Li, K.; Sun, W.; Meng, W.; Yan, J.; Zhang, Y.; Guo, S.; Lü, C.; Ma, C.; Gao, C. Production Of Ethylene Glycol From Glycerol Using An In Vitro Enzymatic Cascade. **Catalysts**, [S. L.], V. 11, N. 2, P. 214, 2021.

Li, Y.; Yue, B.; Yan, S.; Yang, W.; Xie, Z.; Chen, Q.; He, H. Preparation Of Ethylene Glycol Via Catalytic Hydration With Highly Efficient Supported Niobia Catalyst. **Catalysis Letters**, [S. L.], V. 95, N. 3, P. 163–166, 2004.

Liu, H.; Ramos, K. R. M.; Valdehuesa, K. N. G.; Nisola, G. M.; Lee, W.-K.; Chung, W.-J. Biosynthesis Of Ethylene Glycol In *Escherichia Coli*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S. L.], V. 97, N. 8, P. 3409–3417, 2013.

Liu, Y.; Zheng, X.; Tao, S.; Hu, L.; Zhang, X.; Lin, X. Process Optimization For Deep Eutectic Solvent Pretreatment And Enzymatic Hydrolysis Of Sugar Cane Bagasse For Cellulosic Ethanol Fermentation. **Renewable Energy**, [S. L.], V. 177, P. 259–267, 2021.

Liu, Z.-H.; Hao, N.; Wang, Y.-Y.; Dou, C.; Lin, F.; Shen, R.; Bura, R.; Hodge, D. B.; Dale, B. E.; Ragauskas, A. J.; Yang, B.; Yuan, J. S. Transforming Biorefinery Designs With ‘Plug-In Processes Of Lignin’ To Enable Economic Waste Valorization. **Nature Communications**, [S. L.], V. 12, N. 1, P. 3912, 2021.

Lorenci Woiciechowski, A.; Dalmas Neto, C. J.; Porto De Souza Vandenberghe, L.; De

Carvalho Neto, D. P.; Novak Sydney, A. C.; Letti, L. A. J.; Karp, S. G.; Zevallos Torres, L. A.; Soccol, C. R. Lignocellulosic Biomass: Acid And Alkaline Pretreatments And Their Effects On Biomass Recalcitrance – Conventional Processing And Recent Advances. **Bioresource Technology**, [S. L.], V. 304, P. 122848, 2020.

Ma, Yingqun; Shen, Yanqing; Liu, Yu. The State Of The Art Of Straw Treatment Technology: Challenges And Future Solutions. **Bioresource Technology**, V. 313, P. 123656, 2020.

Mankar, A. R.; Pandey, A.; Modak, A.; Pant, K. K. Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass: A Review On Recent Advances. **Bioresource Technology**, [S. L.], V. 334, P. 125235, 2021.

Mccarty, N. S.; Ledesma-Amaro, R. Synthetic Biology Tools To Engineer Microbial Communities For Biotechnology. **Trends In Biotechnology**, [S. L.], V. 37, N. 2, P. 181–197, 2019.

Montoya-Rosales, J. J.; Peces, M.; González-Rodríguez, L. M.; Alatraste-Mondragón, F.; Villa-Gómez, D. K. A Broad Overview Comparing A Fungal, Thermal And Acid Pre-Treatment Of Bean Straw In Terms Of Substrate And Anaerobic Digestion Effect. **Biomass And Bioenergy**, [S. L.], V. 142, P. 105775, 2020.

Ndayisenga, Fabrice Et Al. Célula De Eletrohidrogênese Microbiana E Sistema Integrado De Fermentação Escura Aumentam A Produção De Biohidrogênio A Partir De Resíduos Agrícolas Lignocelulósicos: Pré-Tratamento Do Substrato Para Otimização. **Revisões Sobre Energia Renovável E Sustentável**, V. 145, P. 111078, 2021. See More

Nurika, I. O Padrão De Degradação Da Lignocelulose Da Vagem Do Cacau Usando Os Fungos Da Podridão Parda (*Serpula Lacrymans*) E Da Podridão Branca (*Schizophyllum Commune*). In: **Série De Conferências Iop: Terra E Ciências Ambientais**. Editora Iop, 2019. P. 012080.

Ogata, Koichi; Nishikawa, Hideo; Ohsugi, Masahiro. A Yeast Capable Of Utilizing Methanol. **Agricultural And Biological Chemistry**, V. 33, N. 10, P. 1519-1520, 1969.

Pan, S.; Chi, Y.; Zhou, L.; Li, Z.; Du, L.; Wei, Y. Evaluation Of Squeezing Pretreatment For Improving Methane Production From Fresh Banana Pseudo-Stems. **Waste Management**, [S. L.], V. 102, P. 900–908, 2020.

Pereira, B.; Li, Z.-J.; De Mey, M.; Lim, C. G.; Zhang, H.; Hoeltgen, C.; Stephanopoulos, G. Efficient Utilization Of Pentoses For Bioproduction Of The Renewable Two-Carbon

Compounds Ethylene Glycol And Glycolate. **Metabolic Engineering**, [S. L.], V. 34, P. 80–87, 2016.

Salusjärvi, L.; Havukainen, S.; Koivistoinen, O.; Toivari, M. Biotechnological Production Of Glycolic Acid And Ethylene Glycol: Current State And Perspectives. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S. L.], V. 103, N. 6, P. 2525–2535, 2019.

Salusjärvi, L.; Toivari, M.; Vehkomäki, M.-L.; Koivistoinen, O.; Mojzita, D.; Niemelä, K.; Penttilä, M.; Ruohonen, L. Production Of Ethylene Glycol Or Glycolic Acid From D-Xylose In *Saccharomyces Cerevisiae*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S. L.], V. 101, N. 22, P. 8151–8163, 2017.

Scelsi, E.; Angelini, A.; Pastore, C. Deep Eutectic Solvents For The Valorisation Of Lignocellulosic Biomasses Towards Fine Chemicals. *Biomass*, [S. L.], V. 1, N. 1, P. 29–59, 2021.

Singh, S. K. Biological Treatment Of Plant Biomass And Factors Affecting Bioactivity. **Journal Of Cleaner Production**, [S. L.], V. 279, P. 123546, 2021.

Tripathi, Nimisha Et Al. Utilização De Resíduos De Biomassa Em Produtos De Baixo Carbono: Aproveitando Um Importante Recurso Potencial. **Npj Clima E Ciência Atmosférica**, V. 2, N. 1, Pág. 35 De 2019.

Uranukul, B.; Woolston, B. M.; Fink, G. R.; Stephanopoulos, G. Biosynthesis Of Monoethylene Glycol In *Saccharomyces Cerevisiae* Utilizing Native Glycolytic Enzymes. **Metabolic Engineering**, [S. L.], V. 51, P. 20–31, 2019.

Van Dyk, J. S.; Pletschke, B. I. A Review Of Lignocellulose Bioconversion Using Enzymatic Hydrolysis And Synergistic Cooperation Between Enzymes--Factors Affecting Enzymes, Conversion And Synergy. **Biotechnology Advances**, [S. L.], V. 30, N. 6, P. 1458–1480, 2012.

Wang, Z.; He, X.; Yan, L.; Wang, J.; Hu, X.; Sun, Q.; Zhang, H. Enhancing Enzymatic Hydrolysis Of Corn Stover By Twin-Screw Extrusion Pretreatment. **Industrial Crops And Products**, [S. L.], V. 143, P. 111960, 2020.

Yousuf, A.; Pirozzi, D.; Sannino, F. Chapter 1 - Fundamentals Of Lignocellulosic Biomass. *Em: Yousuf, Abu; Pirozzi, Domenico; Sannino, Filomena (Org.)*. **Lignocellulosic Biomass To**

Liquid Biofuels. [S. L.]: Academic Press, 2020. P. 1–15. Disponível Em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128159361000010>. Acesso Em: 26 Jun. 2023.

Yuan, Z.; Li, G.; Wei, W.; Wang, J.; Fang, Z. A Comparison Of Different Pre-Extraction Methods Followed By Steam Pretreatment Of Bamboo To Improve The Enzymatic Digestibility And Ethanol Production. **Energy**, [S. L.], V. 196, P. 117156, 2020.

Yue, H.; Zhao, Y.; Ma, X.; Gong, J. Ethylene Glycol: Properties, Synthesis, And Applications. **Chemical Society Reviews**, [S. L.], V. 41, N. 11, P. 4218–4244, 2012.

Zahoor; Wang, W.; Tan, X.; Imtiaz, M.; Wang, Q.; Miao, C.; Yuan, Z.; Zhuang, X. Rice Straw Pretreatment With Koh/Urea For Enhancing Sugar Yield And Ethanol Production At Low Temperature. **Industrial Crops And Products**, [S. L.], V. 170, P. 113776, 2021.

Zhao, C.; Shao, Q.; Chundawat, S. P. S. Recent Advances On Ammonia-Based Pretreatments Of Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, [S. L.], V. 298, P. 122446, 2020.

Zhao, L.; Sun, Z.-F.; Zhang, C.-C.; Nan, J.; Ren, N.-Q.; Lee, D.-J.; Chen, C. Advances In Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass For Bioenergy Production: Challenges And Perspectives. **Bioresource Technology**, [S. L.], V. 343, P. 126123, 2022.

Zhao, Z.; Xian, M.; Liu, M.; Zhao, G. Biochemical Routes For Uptake And Conversion Of Xylose By Microorganisms. **Biotechnology For Biofuels**, [S. L.], V. 13, P. 21, 2020.

Zheng, B.; Yu, S.; Chen, Z.; Huo, Y.-X. A Consolidated Review Of Commercial-Scale High-Value Products From Lignocellulosic Biomass. **Frontiers In Microbiology**, [S. L.], V. 13, P. 933882, 2022.

Ziaei-Rad, Z.; Fooladi, J.; Pazouki, M.; Gummadi, S. N. Lignocellulosic Biomass Pre-Treatment Using Low-Cost Ionic Liquid For Bioethanol Production: An Economically Viable Method For Wheat Straw Fractionation. **Biomass And Bioenergy**, [S. L.], V. 151, P. 106140, 2021.

Zoghalmi, A.; Paës, G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance And Predicting Hydrolysis. **Frontiers In Chemistry**, [S. L.], V. 7, P. 874, 2019.