



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

**Estabelecimento de processo produtivo de ácido xilônico por linhagens
recombinantes de *Komagataella phaffii***

Isadora Yano Correa Esselin

Brasília, 2026

Isadora Yano Correa Esselin

Estabelecimento de processo produtivo de ácido xilônico por linhagens recombinantes de *Komagataella phaffii*

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

Orientador: Prof. Dr. João Ricardo Moreira de Almeida

Brasília

2026

RESUMO

O ácido xilônico (AX) é um composto orgânico com aplicações promissoras nas indústrias farmacêutica, química e têxtil. Ele pode ser produzido a partir da oxidação da xilose, presente na fração hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos, pela ação da enzima xilose desidrogenase (XDH). A levedura *Komagataella phaffii* tem sido amplamente utilizada na produção de compostos químicos de interesse industrial. Previamente, linhagens recombinantes de *K. phaffii* capazes de produzir AX foram obtidas pela expressão de genes bacterianos codificadores da XDH. Embora essas linhagens apresentem rendimento g AX/g xilose e produtividade volumétrica em meio sintético, o desempenho em hidrolisado necessita ser melhorado. Este trabalho teve como objetivo estabelecer parâmetros físico-químicos adequados para a produção de AX e aplicá-los em hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar. Para isso, foram avaliados, de forma sequencial e em ensaios independentes, cinco parâmetros: concentração inicial de xilose (20, 40, 80 e 120 g/L), pH (3,5; 4,5; 5,5 e 6,5), concentração inicial de biomassa celular (0,5; 1,5; 3,0; 5,0 e 10,0 g/L), temperatura (26, 28, 30 e 32 °C) e nível de oxigênio dissolvido (1, 10 e 20%). Os cultivos foram conduzidos em frascos agitados e em biorreatores de bancada, com quantificação de AX e açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados indicaram melhor desempenho do processo em 40 g/L de xilose; pH 5,5; temperatura de 30 °C, biomassa celular inicial de 5,0 g/L e oxigênio dissolvido de 10%. Nessas condições, a partir de experimento em batelada de 24 h, foi obtido $20,12 \pm 0,17$ g/L de AX, produtividade específica de $0,08 \pm 0,01$ g/g.h, produtividade volumétrica de $0,84 \pm 0,01$ g/L.h e rendimento de $0,61 \pm 0,01$ g AX/g xilose. Com base nesses resultados, os parâmetros estabelecidos em meio sintético foram aplicados em cultivo em batelada alimentada utilizando hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar, alcançando $5,56 \pm 0,35$ g/L de AX, produtividade volumétrica de $0,05 \pm 0,00$ g/L.h e rendimento de $1,02 \pm 0,05$ g/g. Embora a produtividade e concentração final de AX tenham sido inferiores às reportadas na literatura para a linhagem *K. phaffii* XDH-HL, o rendimento obtido foi superior ao previamente descrito em hidrolisado. Em conclusão, os resultados demonstram que a definição criteriosa de parâmetros físico-químicos constitui uma base para a aplicação do processo em hidrolisado lignocelulósico, evidenciando o potencial de aprimoramento da produção de AX por *K. phaffii*.

Palavras chaves: Ácido xilônico; Xilose; *Komagataella phaffii*; Bioprocessos.

ABSTRACT

Xylonic acid (AX) is an organic compound with promising applications in the pharmaceutical, chemical, and textile industries. It can be produced from the oxidation of xylose, present in the hemicellulosic fraction of lignocellulosic materials, by the action of the enzyme xylose dehydrogenase (XDH). The yeast *Komagataella phaffii* has been widely used in the production of chemical compounds of industrial interest. Previously, recombinant strains of *K. phaffii* capable of producing AX were obtained by expressing bacterial genes encoding XDH. Although these strains show yield g AX/g xylose and volumetric productivity in synthetic media, their performance in hydrolysate needs to be improved. This work aimed to establish suitable physicochemical parameters to produce AX and apply them to sugarcane biomass hydrolysate. To this end, five parameters were evaluated sequentially and in independent assays: initial xylose concentration (20, 40, 80, and 120 g/L), pH (3.5, 4.5, 5.5, and 6.5), initial cell biomass concentration (0.5, 1.5, 3.0, 5.0, and 10.0 g/L), temperature (26, 28, 30, and 32 °C), and dissolved oxygen level (1, 10, and 20%). The cultures were conducted in shaken flasks and benchtop bioreactors, with quantification of AX and sugars by high-performance liquid chromatography (HPLC). The results indicated better process performance at 40 g/L xylose; pH 5.5; temperature of 30 °C; initial cell biomass of 5.0 g/L; and dissolved oxygen of 10%. Under these conditions, from a 24-h batch experiment, 20.12 ± 0.17 g/L of AX, a specific productivity of 0.08 ± 0.01 g/g.h, a volumetric productivity of 0.84 ± 0.01 g/L.h, and a yield of 0.61 ± 0.01 g AX/g xylose were obtained. Based on these results, the parameters established in synthetic medium were applied in fed-batch cultivation using sugarcane biomass hydrolysate, achieving 5.56 ± 0.35 g/L of AX, a volumetric productivity of 0.05 ± 0.00 g/L.h, and a yield of 1.02 ± 0.05 g/g. Although the productivity and final concentration of AX were lower than those reported in the literature for the *K. phaffii* XDH-HL strain, the yield obtained was higher than that previously described in hydrolysate. In conclusion, the results demonstrate that the careful definition of physicochemical parameters constitutes a basis for the application of the process in lignocellulosic hydrolysate, highlighting the potential for improving AX production by *K. phaffii*.

Keywords: Xylonic acid; Xylose; *Komagataella phaffii*; Bioprocesses.

Lista de Abreviações e símbolos

XDH: Xilose desidrogenase

p/v: Peso sobre volume

μ: Micro

g: Gramas

mL: Mililitros

L: Litros

M: Molar

pH: Potencial hidrogeniônico

OD₆₀₀: Densidade óptica a 600nm

nm: Nanômetros

rpm: Rotações por minuto

h: Horas

°C: Graus Celsius

min: Minutos

mM: Millimolar

mm: Milímetro

YPD: Yeast Extract – Peptone – Dextrose

HPLC: High-performance liquid chromatography

UPLC: Ultra-high Performance Liquid Chromatography

PDA: Arranjo de Fotodiodos

ELS: Espalhamento de Luz Evaporativo

RID: Índice de Refração

psi: Pounds per Square Inch

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura da biomassa lignocelulósica, com representação da celulose (A), hemicelulose (B) e lignina (C).....	11
Figura 2. Representação esquemática das principais etapas e rotas de conversão da biomassa lignocelulósica em etanol de segunda geração e outros bioprodutos.....	13
Figura 3. Esquema representativo das três rotas metabólicas principais de degradação da xilose: Isomerase, Oxidativa da Xilose e Oxidorredutiva	16
Figura 4. Fórmulas estruturais do AX: forma protonada (A) e desprotonada (B).....	17
Figura 5. Equações de formação de AX a partir da oxidação da xilose eletro catalisada em eletrodo de ouro em meio alcalino.....	18
Figura 6. Rota de oxidação da xilose em AX por microrganismos produtores.....	18
Figura 7. Esquema das reações metabólicas envolvidas no metabolismo da xilose e na produção de AX em <i>E. coli</i> geneticamente modificada.....	20
Figura 8. Produtos químicos obtidos por <i>K. phaffii</i> a partir de diversos substratos.....	23
Figura 9. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos das linhagens <i>K. phaffii</i> XDH-HL e XDH-AM em 20 g/L de xilose.....	36
Figura 10. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos das linhagens <i>K. phaffii</i> XDH-HL e XDH-AM em 40 g/L de xilose.....	37
Figura 11. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos das linhagens <i>K. phaffii</i> XDH-HL e XDH-AM em 80 g/L de xilose.....	37
Figura 12. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos das linhagens <i>K. phaffii</i> XDH-HL e XDH-AM em 120 g/L de xilose.....	38
Figura 13. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem <i>K. phaffii</i> XDH-HL em diferentes pH.....	41
Figura 14. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem <i>K. phaffii</i> XDH-HL em diferentes temperaturas.....	43

Figura 15. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem <i>K. phaffii</i> XDH-HL inoculada em concentrações iniciais de 0,5 e 1,5 g/L.....	45
Figura 16. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem <i>K. phaffii</i> XDH-HL inoculada em concentrações iniciais de 3,0, 5,0 e 10,0 g/L.....	46
Figura 17. Perfil de crescimento celular e taxas específicas de crescimento da linhagem <i>K. phaffii</i> XDH-HL sob diferentes pO ₂	48
Figura 18. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem <i>K. phaffii</i> XDH-HL a partir de dados medidos experimentalmente e corrigidos considerando a evaporação.....	49
Figura 19. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem <i>K. phaffii</i> XDH-HL sob diferentes pO ₂	50
Figura 20. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem <i>K. phaffii</i> XDH-HL em meio sintético e hidrolisado.....	54

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição de diferentes biomassas lignocelulósicas.....	12
Tabela 2. Composição de açúcares e compostos inibitórios em hidrolisados lignocelulósicos de diferentes fontes. NR: não reportado (Fonte: autor).....	14
Tabela 3. Títulos, rendimentos e produtividades da produção de AX por microrganismos naturais e rendimentos.....	21
Tabela 4. Coluna e detector utilizados e tempos de retenção dos metabólitos quantificados.....	34
Tabela 5. Consumo de xilose e desempenho do cultivo de <i>K. phaffii</i> XDH-HL e <i>K. phaffii</i> XDH-AM no meio mineral FM22, suplementado com xilose 20, 40 80 e 120 g/L após 96 h.....	39
Tabela 6. Consumo de xilose e parâmetros de desempenho do cultivo de <i>K. phaffii</i> XDH-HL sob diferentes pH após 120 h.....	42
Tabela 7. Consumo de xilose e parâmetros de desempenho do cultivo de <i>K. phaffii</i> XDH-HL sob diferentes temperaturas de cultivo após 96 h.....	44
Tabela 8. Consumo de xilose e parâmetros de desempenho do cultivo de <i>K. phaffii</i> XDH-HL sob diferentes concentrações iniciais de biomassa celular após 96 h.....	47
Tabela 9. Consumo de xilose e parâmetros de desempenho do cultivo de <i>K. phaffii</i> XDH-HL sob diferentes níveis de oxigenação após 48 h.....	51
Tabela 10. Desempenho produtivo da linhagem <i>K. phaffii</i> XDH-HL em cultivo em batelada em meio sintético sob aplicação dos parâmetros físico-químicos selecionados após 24 h.....	52
Tabela 11. Balanço de substratos e parâmetros de desempenho do cultivo de <i>K. phaffii</i> XDH-HL em batelada alimentada, em meio sintético e meio contendo hidrolisado, após 120 h de cultivo.....	55

SUMÁRIO

1.	Introdução	10
1.1.	Biomassa lignocelulósica	10
1.2.	Metabolismo da xilose por microrganismos	15
1.3.	Ácido xilônico	16
1.4.	<i>Komagataella phaffii</i>	22
1.5.	Determinação de parâmetros físico-químicos para a produção de AX	24
2.	Objetivos	26
2.1.	Objetivo geral.....	26
2.2.	Objetivos específicos	26
3.	Justificativa	27
4.	Materiais e métodos	28
4.1.	Materiais	28
4.1.1.	Linhagem	28
4.1.2.	Meio de cultura	28
4.1.3.	Soluções.....	29
4.2.	Métodos.....	30
4.2.1.	Efeito de parâmetros físico-químicos na produção de AX por <i>K. phaffii</i> : ensaio padrão	30
4.2.1.1.	Efeito de parâmetros físico-químicos na produção de AX por <i>K. phaffii</i> : concentração inicial de xilose.....	31
4.2.1.2.	Efeito de parâmetros físico-químicos na produção de AX por <i>K. phaffii</i> : pH	31
4.2.1.3.	Efeito de parâmetros físico-químicos na produção de AX por <i>K. phaffii</i> : temperatura	31
4.2.1.4.	Efeito de parâmetros físico-químicos na produção de AX por <i>K. phaffii</i> : concentração inicial de biomassa celular.....	32
4.2.1.5.	Efeito de parâmetros físico-químicos na produção de AX por <i>K. phaffii</i> : pressão parcial de oxigênio.....	32
4.2.2.	Produção de AX por <i>K. phaffii</i> a partir de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar.....	32
4.2.3.	Quantificação de metabólitos por cromatografia líquida	33
4.2.4.	Determinação dos parâmetros cinéticos em processos produtivos	34
5.	Resultados e Discussões	36
5.1.	Efeito da concentração inicial de xilose na produção de AX	36
5.2.	Efeito do pH na produção de AX	40
5.3.	Efeito da temperatura na produção de AX	43
5.4.	Efeito da concentração inicial de biomassa celular na produção de AX	45
5.5.	Efeito da pressão parcial de oxigênio na produção de AX.....	48
5.6.	Produção de AX por <i>K. phaffii</i> a partir de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar	53
6.	Conclusão	57
7.	Referências bibliográficas	58

1. Introdução

1.1. Biomassa lignocelulósica

A população global demanda recursos fósseis para a produção de combustíveis e compostos químicos de interesse industrial, os quais são amplamente empregados na fabricação de produtos de uso cotidiano, como plástico, fertilizante, solventes e fármacos (Das, 2025; Jiang et al., 2024). Nesse contexto, o relatório mensal do mercado de petróleo da OPEC estimou a demanda brasileira por petróleo em 6,8 milhões de barris por dia em 2025, com projeção de aumento para 7,1 milhões em 2026.

Esse cenário é relevante quando se considera o caráter finito e os impactos ambientais associados ao uso intensivo de fontes fósseis. Diante dos efeitos das mudanças climáticas e de questões econômicas, as indústrias buscam reduzir a dependência de produtos petroquímicos, direcionando esforços para alternativas sustentáveis de base biológica (MUJTABA et al., 2023). Nesse contexto, o uso de biomassa renovável tem se destacado como matéria prima para a produção de combustíveis, produtos químicos, energia e materiais (YAMAKAWA et al., 2018).

Tradicionalmente, a economia opera de forma linear, baseada na extração de recursos naturais, produção e descarte de resíduos. Esse modelo não considera a finitude dos recursos naturais, bem como a capacidade limitada de regeneração dos ecossistemas e de absorção de resíduos. Como alternativa, o modelo de economia circular tem sido discutido como uma abordagem para reorganizar sistemas produtivos, promovendo maior integração entre produção, sociedade e meio ambiente e possibilitando a geração de produtos de interesse comercial a partir de uma nova cadeia econômica, fundamentada no princípio dos 3Rs (reduzir, reutilizar e reciclar) (LU, ZHAO e LIU, 2022; MUJTABA et al., 2023).

A economia circular propõe manter um fluxo circular de uso de materiais, no qual resíduos que antes seriam descartados podem ser reutilizados como matéria prima para a geração de combustíveis e produtos químicos de alto valor agregado (LU, ZHAO e LIU, 2022; MUJTABA et al., 2023). Nesse cenário, a produção mundial anual de biomassa lignocelulósica é estimada em cerca de 181,5 bilhões de toneladas, das quais apenas 8,2 bilhões são reutilizadas em áreas de aplicações (BANU et al., 2021; MUJTABA et al., 2023). Assim, o aproveitamento dessa biomassa apresenta potencial de integração aos

princípios da economia circular, ao possibilitar a valorização de subprodutos agroindustriais (BANU et al., 2021).

A biomassa lignocelulósica é um recurso abundante na natureza, barato e capaz de reduzir conflitos alimentares (PARK et al., 2024). Trata-se de um polímero complexo pertencente à matriz da parede celular vegetal, constituído principalmente por três frações: celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1), além de menores proporções de compostos inorgânicos, compostos de nitrogênio e pectina (CARNEIRO et al., 2022; TRICHEZ et al., 2022).

A celulose é formada pela junção de moléculas de glicose interligadas por ligações glicosídicas β (1–4). A hemicelulose, por sua vez, é o segundo componente mais abundante, formada por cadeias curtas de açúcares piranoses e furanoses, incluindo D-manose, D-glicose, D-galactosil, L-arabinose, ácido glicurônico, ácido galacturônico e D-xilose (RAO et al., 2023). Já a lignina apresenta estrutura amorfa, não cristalina, não baseada em açúcares, composta por diversos grupos funcionais, como metoxil e fenilpropanos. Essa macromolécula envolve a celulose e a hemicelulose, conferindo rigidez e estabilidade à matriz vegetal (Figura 1) (ASHOKKUMAR et al., 2022; JAYAKUMAR et al., 2023).

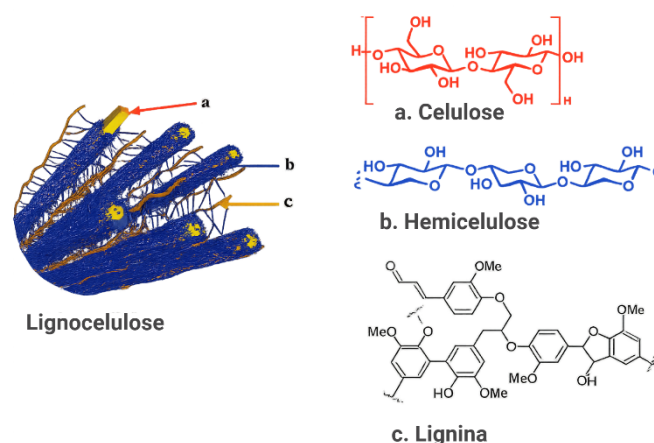


Figura 1. Estrutura da biomassa lignocelulósica, com representação da celulose (A), hemicelulose (B) e lignina (C). (Fonte: Adaptado de Yusuf e Inambao, 2019)

Esse tipo de biomassa inclui uma ampla variedade de materiais de origem vegetal, especialmente resíduos agroindustriais, como palha de trigo, casca de coco, palha de milho, madeira e bagaço de cana de açúcar. Sua composição varia de acordo a origem do

material vegetal. No caso do bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, são encontrados 32-55% de celulose, 22-36% de hemicelulose e 14-30% de lignina (Tabela 1).

Tabela 1. Composição de diferentes biomassas lignocelulósicas. (Fonte: Adaptado de Riaz et al., 2025).

Biomassa	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Referências
Palha de trigo	32-45%	20-45%	11-26%	Sharma et al. 2023
Palha de arroz	30-36%	19-32%	5-18%	Silva et al. 2010
Bagaço de cana-de-açúcar	32-55%	22-36%	14-30%	Risanto et al. 2023
Fibras de coroa de abacaxi	79-83%	19%	5-15%	Shah et al. 2022
Talos e caules de cebola e alho	41-50%	16-26%	26-39%	Bhukya et al. 2022

No conceito de biorrefinaria, essa biomassa pode ser convertida em uma ampla gama de produtos de interesse industrial, por meio de rotas de conversão, incluindo métodos termoquímicos e bioquímicos. Entre estes, destacam-se os bioprocessos microbianos, nos quais microrganismos são empregados na conversão de fontes renováveis de carbono em bioprodutos, utilizando os açúcares derivados das frações da celulose e hemicelulose como substratos nos processos produtivos (BANU et al., 2021; CARNEIRO et al., 2022; TRICHEZ et al., 2022). Apesar desse potencial, a utilização direta desses açúcares é limitada pela complexidade estrutural da matriz lignocelulósica. Antes da conversão em produtos de interesse industrial, suas estruturas precisam ser desconstruídas, uma vez que a forte estrutura cristalina da celulose e o entrelaçamento entre a lignina, celulose e hemicelulose conferem elevada resistência e estabilidade à matriz vegetal, dificultando a atuação microbiana (JAYAKUMAR et al., 2023).

Devido à elevada recalcitrância estrutural da lignocelulose, esse material necessita ser submetido a etapas prévias de processamento para viabilizar seu aproveitamento microbiano, como o pré-tratamento e a hidrólise. O pré-tratamento promove a desestruturação da matriz vegetal, reduzindo a recalcitrância e aumentando a

acessibilidade da celulose e da hemicelulose às etapas subsequentes (SONG et al., 2024). Diferentes abordagens podem ser empregadas, incluindo métodos biológicos, físicos, químicos e físico-químicos, sendo estes dois últimos considerados os mais eficientes (ASHOKKUMAR et al., 2022). Entre os métodos químicos, destaca-se o pré-tratamento com ácido diluído, amplamente empregado em aplicações industriais. Nesse processo, a hemicelulose é rapidamente hidrolisada e solubilizada, enquanto a celulose e lignina permanecem na fração sólida, sendo posteriormente submetidas à hidrólise (KEMITA, SILVA e PRATTO, 2024; PORNINTA et al., 2024; ROBAK et al., 2019).

Na etapa de hidrólise, a celulose e a fração residual da hemicelulose podem ser hidrolisadas, gerando hidrolisados lignocelulósicos, ricos em açúcares monoméricos por meio de processos ácidos ou enzimáticos (KEMITA, SILVA e PRATTO, 2024; PORNINTA et al., 2024, ROBAK et al., 2019), tornando-os disponíveis para posterior conversão microbiana em etanol de segunda geração ou outros bioprodutos (Figura 2) (FERREIRA, ALARCÓN e ROBERTO, 2026; HAHN-HAGERDAL et al., 2007).

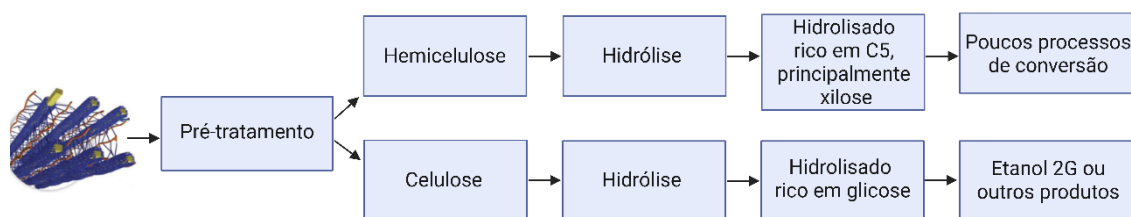


Figura 2. Representação esquemática das principais etapas e rotas de conversão da biomassa lignocelulósica em etanol de segunda geração e outros bioprodutos (Fonte: Autor).

O hidrolisado lignocelulósico é composto por açúcares, incluindo glicose e xilose, além de substâncias formadas durante o processamento (Figura 2). Entre elas destacam-se hidroximetilfurfural (HMF), furfural e ácido acético, os quais podem atuar como inibidores do metabolismo microbiano (PORNINTA et al., 2024). A composição do hidrolisado varia em função das condições adotadas no pré-tratamento e na hidrólise (Tabela 2) (MORAIS JUNIOR et al., 2018). A presença desses compostos inibidores é um dos principais desafios para a conversão microbiana eficiente, justificando a adoção de estratégias operacionais, como o cultivo em batelada alimentada, a fim de reduzir efeitos tóxicos e melhorar o desempenho do processo (HUANG et al., 2024).

Tabela 2. Composição de açúcares e compostos inibitórios em hidrolisados lignocelulósicos de diferentes fontes. NR: não reportado (Fonte: autor).

Biomassa	Pré tratamento	Hidrólise	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)	Ácido acético (g/L)	Referências
Sabugo de milho	Ácido	Enzimática	51,50	10,60	0,32	0,12	3,11	Porninta et al. 2024
Palha de arroz	Ácido	Enzimática	34,60	7,34	0,05	0,06	1,11	Porninta et al. 2024
Bagaço de cana de açúcar	Ácido	Enzimática	21,30	5,92	0,12	0,04	1,07	Porninta et al. 2024
Bagaço de cana de açúcar	Explosão a vapor	Ácida	5,81	91,15	NR	NR	21,47	Almeida et al. 2025
Bagaço de cana de açúcar	Explosão a vapor	Ácida	5,08	95,24	0,38	3,13	21,62	Ramos et al. 2021
Palha de arroz	Ácido	Enzimático (alto teor de sólidos)	107,00	9,00	0,05	0,02	0,13	Ferreira, Alarcón e Roberto, 2016
Palha de centeio	Ácido	Enzimático	18,20	19,30	0,05	0,36	NR	Robak et al. 2019
Palha de trigo	Micro-ondas + hidrótopo	Enzimático	109,26	19,30	1,34	1,22	NR	Mikulski e Klosowki, 2023
Palha de sorgo	Peróxido alcalino	Enzimático	19,35	6,64	NR	NR	1,30	Santos et al. 2021

Os microrganismos desempenham papel fundamental tanto no fornecimento de enzimas hidrolíticas no processo da hidrólise quanto na etapa de bioconversão, consumindo os açúcares presentes no hidrolisado lignocelulósico (GUO et al., 2023;

TRICHEZ et al., 2022). Enquanto a glicose é preferencialmente metabolizada pelos microrganismos e amplamente utilizada na produção de etanol e outros bioprodutos, a xilose é ainda subutilizada e pouco usada em processos de conversão (CARNEIRO et al., 2022; DEV, JILANI e YAZDANI, 2022; FERREIRA, ALARCÓN e ROBERTO, 2016; KIM et al., 2019; PARK et al., 2024). Para que esse recurso renovável seja plenamente aproveitado de forma econômica, é fundamental a valorização da xilose como matéria prima em rotas biotecnológicas para a geração de bioprodutos.

1.2. Metabolismo da xilose por microrganismos

A D-xilose é uma aldopentose, ou seja, um açúcar C5 com um grupo funcional aldeído (-CHO) em sua estrutura (MORTLOCK, 1984). Após a glicose, essa pentose é o segundo açúcar mais predominante na natureza e, é utilizado como fonte de carbono para a síntese de diversos compostos por conversão microbiana, tais como sorbitol, furfural, ácido glucônico, ácido levulínico, xilitol e ácido xilônico (RAMOS et al., 2021; WANG et al., 2016). Entretanto, poucos microrganismos são capazes de metabolizar a xilose de forma eficiente (PARK et al., 2024; VALDEHUESA et al., 2018; WANG et al., 2016).

A degradação de xilose ocorre por três rotas metabólicas principais: a via isomerase (XIP), a via oxidorreductiva (ORP) e a via oxidativa da xilose (XOP), sendo as duas primeiras as mais frequentemente reportadas e a última considerada uma via alternativa. A via isomerase ocorre predominantemente em bactérias, na qual a D-xilose é isomerizada a D-xilulose pela ação da enzima xilose isomerase. Em seguida, a D-xilulose é fosforilada a D-xilulose-5-fosfato pela xiluloquinase, direcionada à via das pentoses fosfato (Figura 3). A via oxidorreductiva, por sua vez, é observada majoritariamente em fungos, na qual a D-xilose é reduzida a xilitol pela ação da D-xilose redutase, geralmente dependente de NADPH. O xilitol é oxidado a D-xilulose pela xilitol desidrogenase, geralmente dependente de NAD^+ e, por fim, a D-xilulose é fosforilada, assim como na via XIP, formando o mesmo composto (D-xilulose-5-fosfato), intermediário da via das pentoses fosfato (Figura 3) (VALDEHUESA et al., 2018).

A via oxidativa da xilose foi descrita em arqueas, em cepas bacterianas e fúngicas. Na XOP, a D-xilose é oxidada a D-xilonolactona, por meio da enzima xilose desidrogenase (XDH), comumente dependente de NAD(P)^+ . Depois, a D-xilonolactona é hidrolisada em D-ácido xilônico, de forma espontânea ou pela enzima xilonolactonase (XLA).

Subsequentemente, o D-ácido xilônico é transformado em ácido 2-ceto-3-deoxi-D-xilônico (KDX) pela ação da xilonato desidratase. Após a formação de KDX, a XOP ramifica-se em duas vias distintas: a via de Weimberg e a via de Dahms. Na via Weimberg, o KDX passa por desidratação, formando semialdeído α -cetogluturato, o qual é posteriormente oxidado a ácido α -cetogluturato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico. Na via Dahms, o KDX é clivado por uma aldolase, originando glicolaldeído e piruvato. Enquanto o piruvato pode ser diretamente assimilado ao ciclo do ácido cítrico, o glicolaldeído é posteriormente convertido em glioxilato e finalmente em malato para o ciclo do ácido cítrico (Figura 3) (KUSCHMIERZ et al., 2022; VALDEHUESA et al., 2018).



Figura 3. Esquema representativo das três rotas metabólicas principais de degradação da xilose: Isomerase, Oxidativa da Xilose e Oxidorredutiva. (Fonte: Adaptado de Valdehuesa et al., 2018).

Nas vias de Weimberg e Dahms em XOP, cada etapa das reações apresenta valores altamente negativos de variação da energia livre de Gibbs, apontando ser reações termodinamicamente favoráveis (VALDEHUESA et al., 2018). Na via de XOP, o ácido xilônico é formado como um intermediário metabólico de interesse industrial (CARNEIRO et al., 2022; RAMOS et al., 2021).

1.3. Ácido xilônico

O ácido xilônico (AX) é um composto orgânico, pertencente à classe dos ácidos carboxílicos, com fórmula química C₅H₁₀O₆. Trata-se de um ácido orgânico fraco, com

constante de dissociação (pK_a) de $3,56 \pm 0,07$, para a primeira desprotonação do grupo carboxílico (HUANG et al., 2017). O valor de pK_a é uma propriedade fundamental, pois dita características como a atividade química, solubilidade em água e propriedades espectroscópicas dos ácidos (CAO et al., 2021). Assim, dependendo do pH do meio, o AX pode existir predominantemente na sua forma protonada (-COOH) ou na forma desprotonada, como ânion carboxilato (-COO⁻), nomeando-se D-xilonato (Figura 4). Em pH menor ao seu pK_a de $3,56 \pm 0,07$, o grupo carboxila permanece protonado, e acima do pK_a , ocorre a ionização.

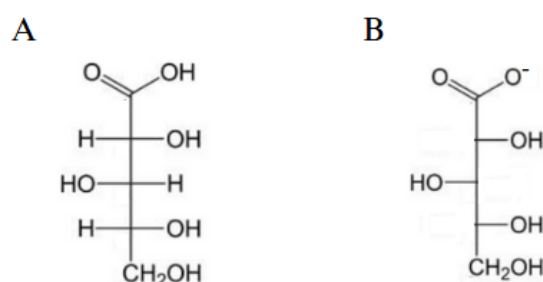


Figura 4. Fórmulas estruturais do AX: forma protonada (A) e desprotonada (B). (Fonte: Adaptado de HUMMEL et al., 2010 e Toivari et al., 2012).

O AX se destaca como composto químico de interesse industrial pelo potencial de aplicações, incluindo produção de copolímeros, desenvolvimento de roupas com propriedades de refrescância e redução de água no concreto (HAN et al., 2024; JIN et al., 2021; TRICHEZ et al., 2022). Além disso, o AX surge como uma alternativa a substituição do ácido glucônico no mercado, devido as suas propriedades físicas semelhantes (TOIVARI et al., 2012; TRICHEZ et al., 2022). A substituição desse ácido pode ser vantajosa, uma vez que o ácido glucônico é produzido a partir de glicose, enquanto o AX é derivado da oxidação da xilose, um açúcar abundante e que não compete com cadeias alimentares (TOIVARI et al., 2012). Dessa forma, o uso de AX pode contribuir para reduzir a dependência da glicose como matéria prima industrial.

A síntese de AX pode ocorrer por via química ou microbiana. Na via química, catalisadores de ouro (Au) ou platina (Pt) são utilizados na eletro oxidação da xilose em meio alcalino. O ouro tem maior atividade catalítica e as reações de formação de AX nele são representadas pela figura 5 (GOVERNO et al., 2004). Entretanto, a síntese de AX por meios químicos é mais poluente e dispendioso. Por isso, o uso de vias biológicas baseadas no desempenho de microrganismos capazes de oxidar xilose em AX representa uma

opção promissora para a redução de custos e priorização de sistemas mais sustentáveis. Devido a isso, microrganismos naturalmente produtores de AX vêm sendo estudados, bem como linhagens geneticamente modificadas têm sido desenvolvidas (TRICHEZ et al., 2022).

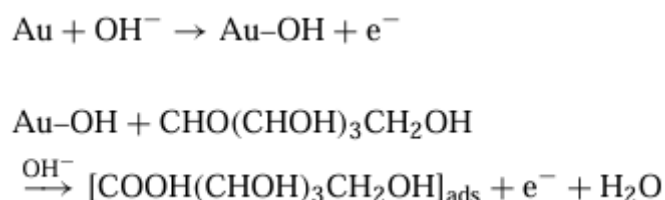


Figura 5. Equações de formação de AX a partir da oxidação da xilose eletro catalisada em eletrodo de ouro em meio alcalino. (Fonte: Governo et al., 2004).

Os microrganismos que produzem AX naturalmente sintetizam o ácido nas etapas iniciais da via oxidativa da xilose. A D-xilose é oxidada em D-xilonolactona pela atuação da enzima XDH, dependente de cofator NAD(P)^+ ou pirroloquinolina quinol (PQQ). Em seguida, D-xilonolactona é hidrolisada em D-ácido xilônico, de maneira espontânea ou enzimática, através da XLA (Figura 6) (TRICHEZ et al., 2022). Dentre esses microrganismos, espécies de arqueas, bactérias e fungos já foram descritas como produtores naturais, incluindo *Haloarcula marismortui*, *Gluconobacter oxydans*, *Pseudomonas fragi*, *Paraburkholderia sacchari*, *Aspergillus niger*, *Caulobacter crescentus* e *Trichoderma reesei* (TRICHEZ et al., 2022).

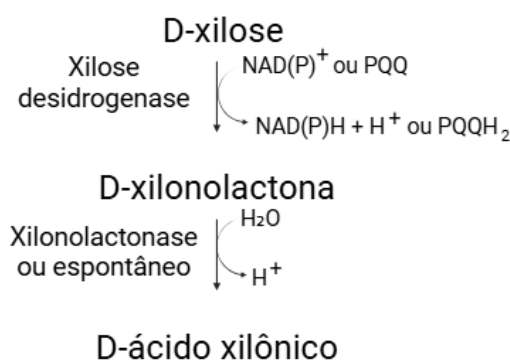


Figura 6. Rota de oxidação da xilose em AX por microrganismos produtores. XDH: xilose desidrogenase e XLA: xilonolactonase. (Fonte: Autor)

Enquanto os gêneros *Acetobacter* e *Pseudomonas* foram os primeiros microrganismos bacterianos relatados como produtores naturais de AX, a bactéria *C. crescentus* foi o primeiro organismo com via oxidativa da xilose bem descrita, a partir da

identificação dos genes e enzimas envolvidos nessa rota. Os genes *xylB* e *xylC* foram identificados como codificadores das enzimas xilose desidrogenase e xilonolactonase, respectivamente. Além disso, ambos estão dispostos no operon *xil*, induzível por xilose. Isso significa que, na presença desse açúcar, a transcrição desses genes é ativada e as enzimas são expressas para a oxidação do substrato. A xilose desidrogenase codificada por *xylB* de *C. crescentus* exibe alta especificidade por xilose, não possuindo atividade sobre hexoses, como a glicose. Essa enzima utiliza o cofator NAD^+ para a conversão da xilose em xilonolactona. Entretanto, xilose desidrogenase provenientes de outros microrganismos podem descrever diferentes preferências por cofatores. A XDH codificada pelo gene *XYDI*, proveniente do fungo *T. reesei*, apresenta preferência pelo cofator NADP^+ (TRICHEZ et al., 2022).

A bactéria *P. sacchari*, produtora natural de AX, atingiu elevado desempenho produtivo quando cultivada sob estratégia de batelada alimentada, por meio da adição de pulsos de xilose (Tabela 2) (BONDAR, FONSECA e CESARIO, 2021). Por sua vez, o fungo *Aspergillus niger* apresentou baixa concentração final de AX, a partir de 45 g/L de xilose, indicando limitada eficiência desse microrganismo para produção de AX (Tabela 2) (TOIVARI et al., 2012; TRICHEZ et al., 2022).

O desenvolvimento de um processo produtivo de AX em escala industrial requer controle do metabolismo celular. O direcionamento do carbono para vias metabólicas concorrentes pode resultar na formação de subprodutos indesejáveis, comprometendo a eficiência do processo. Nesse contexto, a engenharia metabólica possibilita o redirecionamento dos fluxos metabólicos em direção à síntese de AX, contribuindo para a redução da formação de subprodutos e para o aprimoramento do desempenho produtivo (ALMEIDA et al., 2025; HERREIRA et al., 2021). Além disso, estratégias voltadas ao aumento da capacidade de assimilação da xilose são fundamentais para a conversão desse substrato (ALMEIDA et al., 2025). Dessa forma, desafios associados ao controle metabólico e à formação de subprodutos têm motivado o desenvolvimento de linhagens recombinantes capazes de produzir AX a partir da xilose, por meio da inserção de genes e enzimas de produtores naturais em diferentes hospedeiros microbianos.

A *Escherichia coli* foi a primeira bactéria engenheirada para a produção de AX. Inicialmente, o gene *xylB* de *C. crescentus* foi expresso na bactéria. Após isso, observando que o sucesso desse processo de expressão heteróloga está relacionado com a obstrução das outras vias degradativas da xilose, que competem com a via oxidativa, os genes

naturais *xylAB*, *yagE* e *yihG* foram interrompidos (Figura 7). Enquanto o gene *xylAB* é codificador para as enzimas xilose isomerase e xiluloquinase, atuantes na via da xilose isomerase, os genes *yagE* e *yihG* codificam para as enzimas xilonato desidratase e 2-ceto-3-deoxi xilonato desidratase, responsáveis pela desidratação do AX. O silenciamento desses genes levou a produção de AX (Tabela 3) (LIU et al., 2012).

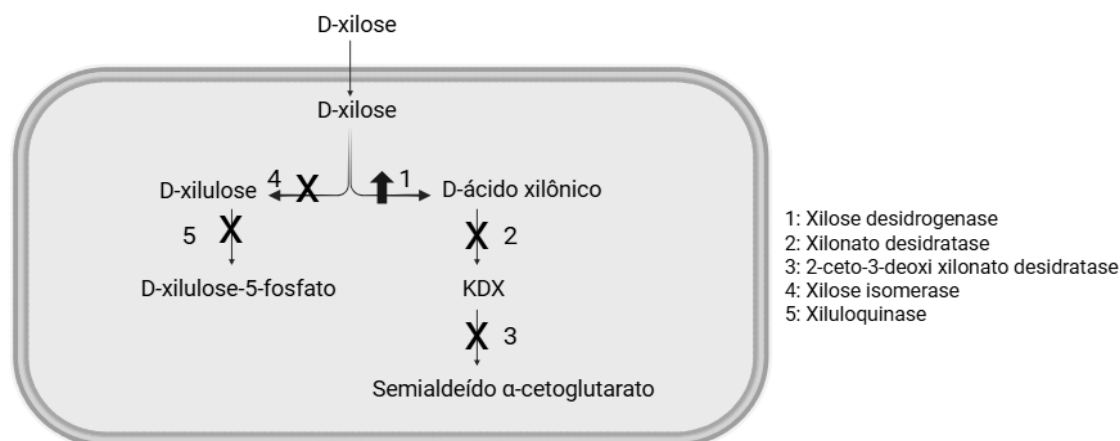


Figura 7. Esquema das reações metabólicas envolvidas no metabolismo da xilose e na produção de AX em *E. coli* geneticamente modificada. Os símbolos X e seta grossa indicam a interrupção e expressão dos genes, respectivamente. (Fonte: Adaptada de Liu et al., 2012)

A *Gluconobacter oxydans* é naturalmente capaz de oxidar xilose em AX, porém a produção desse metabólico foi aprimorada após a combinação de estratégias de engenharia genética e de bioprocessos. A superexpressão do gene *mGDH*, codificador da enzima glicose desidrogenase ligada à membrana, junto à adoção de uma estratégia de batelada alimentada com adição controlada de xilose sólida para manter concentrações do substrato abaixo de 40 g/L e evitar efeitos adversos associados a altas concentrações, permitiu alcançar o maior título de AX reportado até o momento na literatura (Tabela 3) (MAO et al., 2022).

Como a produção bacteriana de AX tende a ser reduzida quando hidrolisado lignocelulósico são utilizados como substrato, devido à presença de compostos inibitórios, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, reconhecida por sua tolerância a esses inibidores, passou a ser explorada como hospedeira para a produção de AX (TOIVARI et al., 2012). Assim, a *S. cerevisiae* foi a primeira levedura modificada com esse objetivo. Os genes *xylB* e *xylC*, provenientes de *C. crescentus*, foram introduzidos, enquanto o gene endógeno *GRE3*, codificador de uma aldolase redutase responsável pela redução indesejada da xilose em xilitol, foi deletado (Tabela 3) (TOIVARI et al., 2012).

Linhas recombinantes de *Pichia kudriavzevii* também foram exploradas para a produção de AX. Nesse caso, a expressão do gene *xylB*, proveniente de *C. crescentus*, permitiu a conversão da xilose quando a levedura foi cultivada em batelada sob pH 5,5, resultando em elevadas concentrações de AX (Tabela 3) (TOIVARI et al., 2013).

Tabela 3. Títulos, rendimentos e produtividades da produção de AX por microrganismos naturais e recombinantes.

Organismo	Modificação genética	Ácido xilônico (g/L)	Rendimento (g _{ax} /g _s)	Produtividade (g/L.h)	Referência
<i>P. sacchari</i>	---	390,00	1,11	6,41	Bondar et al. 2021
<i>A. niger</i>	---	10,00	0,80	0,12	Toivari et al. 2012
<i>P. fragi</i>	---	162,00	1,08	1,40	Buchert e Viikari, 1988a
<i>G. oxydans</i>	<i>mGDH</i>	588,70	1,09	8,66	Mao et al. 2022
<i>Z. mobilis</i>	<i>xylB-BXΔZMO097</i> 6	56,40	1,08	0,99	Herrera et al. 2021
<i>C. glutamicum</i>	<i>xylB</i>	56,32	1,00	0,93	Sundar et al. 2020
<i>C. glycerinogenes</i>	<i>xylB</i>	42,00	0,84	0,72	Qiao et al. 2021
<i>P. kudriavzevii</i>	<i>xylB</i>	171,00	1,00	1,40	Toivari et al. 2013
<i>K. pneumoniae</i>	Δ <i>gad</i>	103,00	1,11	1,30	Wang et al. 2016
<i>K. lactis</i>	<i>XYD1</i>	18,90	0,60	0,15	Nygaard et al. 2011
<i>S. cerevisiae</i>	<i>xylB</i> <i>xylC</i> Δ <i>GRE3</i>	43,00	0,80	0,21	Toivari et al., 2012

<i>K. phaffii</i>	<i>xylB</i>	37,10	0,96	0,41	Ramos et al. 2021
<i>E. coli</i>	<i>xylB</i> , Δ <i>xyLAB</i> , Δ <i>yagE</i> Δ <i>yihG</i>	39,20	0,98	1,09	Liu et al. 2012

1.4. *Komagataella phaffii*

A levedura *Komagataella phaffii* é uma levedura haplóide, aeróbica obrigatória e não patogênica, anteriormente denominada *Pichia pastoris*. Ela é encontrada em exsudatos de árvores e está inserida na ordem *Saccharomycetales*, família *Phaffomycetaceae* e gênero *Komagataella*. O gênero *Komagataella* foi estabelecido pela primeira vez em 1995, a fim de separar a *Pichia pastoris* das outras leveduras metilotróficas. Atualmente, o gênero compreende sete espécies distintas isoladas de árvores da Europa e América do Norte, sendo *K. phaffii* e *K. pastoris* as mais estudadas (HEISTINGER, GASSER e MATTANOVICH, 2020).

A morfologia de *K. phaffii* é caracterizada por colônias esféricas com coloração branca, reprodução de forma assexuada por brotamento multilateral e sem apresentação de hifas verdadeiras ou pseudo-hifas (KURTZMAN, 2005). Além disso, é considerada uma levedura metilotrófica, uma vez que é capaz de metabolizar o metanol como fonte de carbono e energia (HEISTINGER, GASSER e MATTANOVICH, 2020). Utiliza outras fontes de substrato, como glicerol, glicose e etanol, alcançando rápido crescimento e altas densidades celulares em condições aeróbicas. Apesar de mais lenta, também foi relatado o crescimento da *K. phaffii* em xilose. A assimilação dessa pentose pela levedura ocorre a partir da via oxidorrredutiva, na qual a xilose é convertida em D-xilulose-5-fosfato, que entrará na via das pentoses fosfato (HEISTINGER et al., 2022).

K. phaffii é considerada um microrganismo Crabtree negativo (ATA et., 2018). Esse caráter favorece a sua aplicação como plataforma para expressão de proteínas heterólogas, pois evita a produção de etanol em condições aeróbicas, mesmo em altas concentrações de glicose, beneficiando o direcionamento de recursos celulares para a produção de proteínas recombinantes de interesse industrial. Por outro lado, essa característica exige a manutenção do nível de oxigênio dissolvido elevado no cultivo, sobretudo em altas densidades celulares, o que pode ser oneroso para processos

industriais. Ainda assim, essa levedura apresenta outras características que fazem dela uma escolha valiosa para o desenvolvimento de bioprocessos: necessidades nutricionais simples, crescimento celular rápido, construções genéticas estáveis, capacidade de atingir altas densidades celulares, cumprimento de modificações pós-traducionais eucarióticas e crescimento em pH baixo (~ 3.0) (BARONE et al., 2023; CARNEIRO et al., 2022; RAMOS et al., 2021).

Reconhecida como uma “levedura biotecnológica”, a *K. phaffii* tem sido amplamente utilizada para a produção de proteínas recombinantes e para a biossíntese de metabólitos, considerados compostos químicos valiosos, a partir de diversos substratos, incluindo hidrolisados lignocelulósicos (Figura 8) (CARNEIRO et al., 2022). Essa levedura consegue se manter ativa em hidrolisado, uma vez que tolera os compostos inibitórios presentes nesse meio, suportando 6 g/L de ácido acético, característica relevante no contexto de biorrefinarias (PAES et al., 2021).

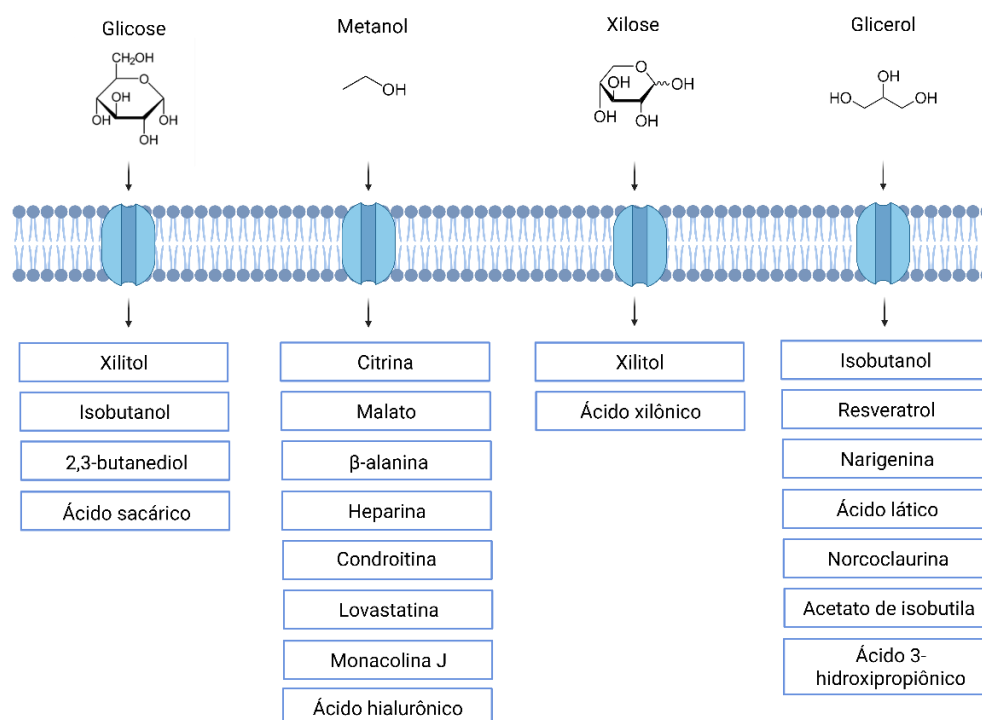


Figura 8. Produtos químicos obtidos por *K. phaffii* a partir de diversos substratos. (Fonte: Adaptado de Carneiro et al., 2022)

Nesse contexto, linhagens recombinantes de *K. phaffii* foram desenvolvidas com o objetivo de converter xilose em AX, uma vez que essa levedura não é naturalmente capaz de produzir esse composto. Para isso, o gene *xylB*, codificador da XDH, foi inserido e expresso em *K. phaffii*. Inicialmente, apenas dois genes codificadores de XDH eram

conhecidos, *xylB* de *C. crescentus* e *XYD1* de *T. reesei*. Posteriormente, análises *in silico* permitiram a identificação de onze novos genes de XDH de origem fúngica e bacteriana, dos quais seis foram expressos em *K. phaffii*.

Entre as linhagens avaliadas, a cepa recombinante *K. phaffii* XDH-HL, contendo o gene *xylB* derivado de *Halomonas lutea*, destacou-se pelo desempenho produtivo, em termo de concentração final de AX e rendimento (RAMOS et al., 2021). Em biorreator, sob condições controladas de pH e oxigênio, essa cepa produziu 37,1 g/L de AX, com rendimento de 0,96 g/g e produtividade volumétrica de 0,41 g/L.h, utilizando meio mineral FM22. A produção de AX também foi avaliada em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Nessa condição, os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer, sem controle de pH e oxigênio, resultando na produção de 11,7 g/L de AX, com rendimento de 0,43 g/g e produtividade volumétrica de 0,16 g/L.h (RAMOS et al., 2021).

Além dessa linhagem, a cepa recombinante *K. phaffii* XDH-AM, contendo o gene *xylB* proveniente de *Azospirillum amazonense*, também foi descrita, apresentando menor consumo de xilose e elevada concentração residual desse açúcar no meio. Considerando esses resultados, as linhagens *K. phaffii* XDH-HL e *K. phaffii* XDH-AM foram selecionadas para o presente estudo, visando avaliar diferenças no metabolismo da xilose e no desempenho na produção de AX.

Esses resultados reforçam o potencial de *K. phaffii* para processos utilizando substratos lignocelulósicos, embora evidenciem a necessidade de ajuste nos parâmetros físico-químicos em meio sintético, da ampliação da produção de AX em hidrolisado em biorreatores de bancada e do estabelecimento de estratégias operacionais, como o cultivo em batelada alimentada, visando maximizar o rendimento e a produtividade do processo.

1.5. Determinação de parâmetros físico-químicos para a produção de AX

Embora a levedura *K. phaffii* seja uma plataforma microbiana promissora para a produção de proteínas recombinantes e substâncias químicas, como o AX, sua aplicação ainda não apresenta o mesmo grau de consolidação observado em microrganismos amplamente utilizados em processos produtivos, como a *E. coli* e *S. cerevisiae* (ORTEGA et al., 2019). Para que a produção de AX ultrapasse o ambiente laboratorial e se torne viável em escala industrial, é fundamental que a modificação genética da levedura esteja acompanhada de estratégias de processo adequadas. Assim, os parâmetros físico-

químicos devem ser ajustados em função das características do AX, da cepa desenvolvida e dos biorreatores empregados, uma vez que o processo ideal se distancia de protocolos convencionais e varia de acordo com o produto-alvo (CARNEIRO et al., 2022).

O domínio sobre o microrganismo empregado, o processo produtivo e seu escalonamento é essencial para aprimorar a produção. Esse conhecimento permite elevar a formação do produto em menor tempo e com menor consumo de recursos, contribuindo para um processo mais eficiente e economicamente viável. Nesse contexto, os parâmetros cinéticos são fundamentais para a avaliação do desempenho de um bioprocessamento (CARNEIRO et al., 2022). A abordagem cinética investiga o comportamento dos principais componentes do processo produtivo – biomassa (X), produto (P) e substrato (S) – por meio da análise da variação de suas concentrações ao longo do tempo de cultivo. Em processos descontínuos, o aumento da concentração celular tende a favorecer a conversão de substrato em produto (SCHMIDELL et al., 2021). Assim, as produtividades específicas de formação de produto e de consumo de substrato consistem em critérios importantes para o delineamento de estratégias que atendam aos objetivos do bioprocessamento (ORTEGA et al., 2019).

A correlação entre a produtividade específica e a velocidade específica de crescimento celular (μ_x) define a “cinética de produção”, a qual permite avaliar a eficiência do processo e comparar diferentes sistemas produtivos, por se basear em parâmetros intensivos e independentes da escala operacional (ORTEGA et al., 2019). Além disso, indicadores como o rendimento de produto em relação ao substrato ($Y_{P/X}$, g de produto / g de substrato), produtividade volumétrica (r_p , em g de produto / L.h), e título final do produto (g de produto / L) são priorizados, concomitantemente à busca por meios de cultivo menos complexos, com vistas à redução de custos e à facilitação das etapas de downstream (PONTE et al., 2018).

O bom desempenho de um processo produtivo está associado à maximização simultânea da produtividade e do rendimento. Nesse cenário, destaca-se também a taxa de crescimento específica máxima (μ_{max}), a qual expressa a capacidade máxima de consumo de substrato pelo microrganismo (CARNEIRO et al., 2022). A determinação desse parâmetro é relevante nas etapas iniciais do processo, por fornecer informações sobre o desempenho fisiológico da cepa na produção do composto de interesse (LOOSER et al., 2015). Quanto mais próximo μ_x estiver de μ_{max} , melhor tende a ser o desempenho produtivo, indicando adequada adaptação do microrganismo ao meio, condição

observada em ambientes com elevada concentração inicial de substrato e ausência de limitações nutricionais (SCHMIDELL et al., 2021; TAYPE, et al., 2020).

Parâmetros físico-químicos exercem influência direta sobre a eficiência do processo produtivo, afetando os critérios cinéticos descritos anteriormente. Dentre eles, destacam-se o pH, a temperatura, a osmolaridade, a composição do meio, o oxigênio dissolvido e o modo de operação (KARBALAEI, REZAEI e FARSIANI, 2020; ORTEGA et al., 2019). Embora sejam conhecidas faixas gerais consideradas favoráveis para *K. phaffii* (28-30 °C, pH 5-6,5; oxigênio dissolvido entre 20-30% de saturação), a definição criteriosa desses parâmetros deve ser ajustada ao produto-alvo e à estratégia de cultivo, visando ao aprimoramento do desempenho, do rendimento, da produtividade e do custo-benefício do processo (CARNEIRO et al., 2022; KARBALAEI, REZAEI e FARSIANI, 2020; LOOSER et al., 2015).

Nesse contexto, o ajuste criterioso dos parâmetros físico-químicos é fundamental para a utilização de hidrolisados lignocelulósicos como substrato, visto que a presença de compostos inibitórios nesses meios comprometem o desempenho produtivo e, conseqüentemente, reduzir a produção de AX (CHANDEL et al., 2018; PAES et al., 2021).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é estabelecer parâmetros físico-químicos adequados para a produção de AX por linhagem recombinante de *K. phaffii* em hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer a concentração inicial de substrato e pH para a produção de AX;
- Estabelecer a concentração inicial de biomassa celular e temperatura para a produção de AX;
- Estabelecer a oxigenação para a produção de AX;
- Avaliar a produção de AX por *K. phaffii* em hidrolisado.

3. Justificativa

Diante da crescente demanda por processos produtivos mais sustentáveis, alinhados aos conceitos de biorrefinarias e economia circular, é fundamental a substituição das fontes não renováveis finitas e danosas, como o petróleo, por fontes renováveis, abundantes e de baixo custo, como a biomassa lignocelulósica. Essa biomassa inclui resíduos e coprodutos agroindustriais, dentre os quais se destacam a palha de trigo, casca de coco, palha de milho, a madeira e o bagaço de cana-de-açúcar, que surgem como alternativas promissoras para a obtenção de bioprodutos e compostos químicos de interesse industrial. Esses materiais, que antes seriam descartados, passam a ser valorizados como matéria-prima, integrando os princípios dos 3R (reduzir, reutilizar e reciclar) e gerando um sistema circular de produção.

A utilização da xilose é interessante nesse contexto, pois esse açúcar é considerado o segundo mais abundante na natureza e está presente na fração hemicelulósica da lignocelulose, sendo ainda subutilizado. Além disso, constitui um substrato de baixo custo para a síntese de compostos químicos de alto valor agregado, com destaque para o AX. Esse composto apresenta grande potencial de aplicação em diversos setores industriais, cuja produção por meio da oxidação microbiana da xilose está alinhada aos princípios da economia sustentável, ao substituir rotas químicas convencionais, mais poluentes e economicamente dispendiosas.

O emprego de linhagens recombinantes de *K. phaffii* na produção do AX a partir da conversão da xilose presente em hidrolisados lignocelulósicos é relevante devido à capacidade dessa levedura de se manter ativa em meios complexos. No entanto, a obtenção de uma linhagem produtora, por si só, não garante o desempenho do processo nesses meios, uma vez que a presença de compostos inibitórios torna o desempenho produtivo dependente das condições de cultivo. O ajuste de parâmetros físico-químicos que influenciam a cinética, o rendimento e a produtividade do processo em meio sintético torna-se fundamental para sua posterior aplicação em hidrolisado, contribuindo para reduzir os efeitos negativos desses compostos e melhorar a produção de AX. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo estabelecer parâmetros físico-químicos adequados para a produção de AX por linhagem recombinante de *K. phaffii* utilizando hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar.

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Linhagem

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens de levedura *K. phaffii* XDH-HL e *K. phaffii* XDH-AM, previamente construídas pelo grupo de pesquisa a partir da inserção dos genes *xylB*, codificadores da enzima xilose desidrogenase (XDH), oriundos de *Halomonas lutea* e *Azospirillum amazonense*, respectivamente.

4.1.2. Meio de cultura

YPD 1x (Yeast Extract – Peptone – Dextrose)

1% (p/v) de Extrato de Levedura

2% (p/v) de Peptona

2% (p/v) de D-glicose

1,5% (p/v) de Ágar Bacteriológico, quando sólido

Suplementado com zeocina para 100 µg/mL

YNB 10x (Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids)

6,7% (p/v) de Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids (YNB)

Meio mineral FM22

2% (p/v) de D-glicose

4% (p/v) de D-xilose

4,29% (p/v) de Fosfato de Potássio (KH₂PO₄)

1,43% (p/v) de Sulfato de Potássio (K₂SO₄)

1,17% (p/v) de Sulfato de Magnésio heptahidratado (MgSO₄ . 7H₂O)

0,5% (p/v) de Sulfato de Amônio (NH₄)₂SO₄

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

4,35 mL/L (v/v) de PTM4

4.1.3. Soluções

PTM4

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

0,7% (p/v) de Cloreto de Zinco (ZnCl_2)

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

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

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

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

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

0,02% (p/v) de Biotina

0,01% (p/v) de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)

0,008% (p/v) de Iodeto de Sódio (NaI)

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

Tampão ftalato de potássio monobásico pH 5.5

5,1% (p/v) de Ftalato de potássio monobásico

1,1% (p/v) de Hidróxido de potássio (KOH)

Completado com água ultrapura para o volume final de 500 mL

pH ajustado para 5,5 com 1 M KOH

Solução Hidróxido de potássio 5M

140,25g de Hidróxido de potássio (KOH)

Completado com água ultrapura para o volume final de 500 mL

Solução Ácido Sulfúrico 5M

135,9 mL de Ácido sulfúrico (H₂SO₄)

Completado com água ultrapura para o volume final de 500 mL

4.2. Métodos

4.2.1. Efeito de parâmetros físico-químicos na produção de AX por *K. phaffii*: ensaio padrão

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes parâmetros físico-químicos sobre a produção de AX, foram conduzidos cinco experimentos independentes, nos quais variou-se: a concentração inicial de xilose (20, 40, 80 e 120 g/L), a concentração inicial de biomassa celular (0,5; 1,5; 3,0; 5,0; 10,0 g/L), a temperatura (26, 28, 30 e 32 °C), a faixa de pH (3,5; 4,5; 5,5 e 6,5) e a pressão parcial de oxigênio (1, 10 e 20%).

As linhagens foram cultivadas em dois pré-inóculos sequenciais, ambos em meio YPD 2x, contendo zeocina (100 µg/mL), a 28 °C, por 24 h. O primeiro pré-inóculo foi realizado em tubos cônicos 10 mL de meio, seguido da transferência para frascos Erlenmeyer de 100 mL, para o segundo pré-inóculo. Posteriormente, as células foram inoculadas no meio de cultivo de acordo com o delineamento de cada ensaio.

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL de meio FM22 suplementado com PTM4, glicose (20 g/L) e xilose (40 g/L), com pH ajustado para 5,5 e tamponado com ftalato de potássio monobásico, exceto nos ensaios destinados à avaliação do pH e da pressão parcial de oxigênio. Os cultivos foram incubados a 28 °C, 200 rpm por 96 h.

Para os ensaios de pH e de pressão parcial de oxigênio, os cultivos foram conduzidos em biorreatores de bancada, utilizando-se um Infors HT de 3,5 L para os experimentos de pH e um Multifors de 1 L para os ensaios de oxigenação.

Amostras foram coletadas diariamente para o monitoramento do crescimento celular, do consumo de açúcares e da produção de metabólitos realizadas por cromatografia líquida. O crescimento celular foi determinado por densidade óptica (OD₆₀₀), utilizando

espectrofotômetro. A biomassa seca foi determinada ao final do cultivo em 96 h, centrifugando 10 mL da cultura a 4000 rpm por 15 min. O pellet obtido foi lavado com 5 mL de água destilada, ressuspendido em 2 mL e transferidos para tubos de vidro previamente pesados. Após a secagem em estufa a 60 °C por 192 h, os tubos foram pesados novamente. A diferença de massa foi utilizada para o cálculo da biomassa seca, a qual foi correlacionada com os valores de OD₆₀₀. Em seguida, as variações metodológicas específicas de cada condição experimental serão descritas.

4.2.1.1. Efeito de parâmetros físico-químicos na produção de AX por *K. phaffii*: concentração inicial de xilose

A fim de estabelecer o efeito da concentração inicial de xilose na produção de AX, os cultivos foram conduzidos conforme o ensaio padrão descrito na Seção 4.2.1, utilizando duas linhagens recombinantes de *K. phaffii*, XDH-HL e XDH-AM. A concentração inicial de xilose foi variada entre 20 e 120 g/L, sendo ambas as linhagens inoculadas para uma OD₆₀₀ inicial de 6.

4.2.1.2. Efeito de parâmetros físico-químicos na produção de AX por *K. phaffii*: pH

Com o intuito de determinar o efeito do pH na produção de AX, os cultivos foram conduzidos conforme o ensaio padrão descrito na Seção 4.2.1, utilizando a linhagem recombinante de *K. phaffii* XDH-HL. A linhagem foi inoculada para uma OD₆₀₀ inicial de 4, em 800 mL de meio FM22. Os valores de pH 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5 foram mantidos constantes pela adição automática de KOH 5 M e H₂SO₄ 5 M. O sistema foi mantido sob agitação de 250 rpm e um fluxo de ar constante de 0,7 L/min.

4.2.1.3. Efeito de parâmetros físico-químicos na produção de AX por *K. phaffii*: temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura na produção de AX, os cultivos foram conduzidos conforme o ensaio padrão descrito na Seção 4.2.1, utilizando a linhagem recombinante de *K. phaffii* XDH-HL. A linhagem foi inoculada para uma OD₆₀₀ inicial de 6. Os frascos foram incubados em shakers, nas temperaturas de 26, 28, 30 e 32 °C.

4.2.1.4. Efeito de parâmetros físico-químicos na produção de AX por *K. phaffii*: concentração inicial de biomassa celular

Para avaliar o efeito da concentração inicial de biomassa celular na produção de AX, os cultivos foram conduzidos conforme o ensaio padrão descrito na Seção 4.2.1, utilizando a linhagem recombinante de *K. phaffii* XDH-HL. A linhagem foi inoculada para concentrações iniciais de biomassa de 0,5; 1,5; 3,0; 5,0; 10,0 g/L.

4.2.1.5. Efeito de parâmetros físico-químicos na produção de AX por *K. phaffii*: pressão parcial de oxigênio

Com o intuito de determinar o efeito da pressão parcial de oxigênio na produção de AX, os cultivos foram conduzidos conforme o ensaio padrão descrito na Seção 4.2.1, utilizando a linhagem recombinante de *K. phaffii* XDH-HL. A linhagem foi inoculada para uma OD₆₀₀ inicial de 10, em 300 mL de meio YPD, a 30 °C. Valores constantes de pO₂ de 1, 10 e 20% foram mantidos por controle de cascata, em função da agitação (200 a 500 rpm) e do fluxo de ar (0 a 2 L/min).

4.2.2. Produção de AX por *K. phaffii* a partir de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar

A linhagem *K. phaffii* XDH-HL foi cultivada em dois pré-inóculos sequenciais, conforme descrito na Seção 4.2.1. Posteriormente, a levedura foi inoculada para uma OD₆₀₀ inicial de 30 em quatro biorreatores de 1 L da Multifors, contendo volume inicial de 300 mL dos meios: YPD (glicose 20 g/L) suplementado com xilose (40 g/L) em dois vasos, e YPD (glicose 20 g/L) suplementado com hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar (30%), nos outros dois. Os parâmetros físico-químicos (xilose 40 g/L, glicose 20 g/L, biomassa celular 5 g/L, pO₂ 10%, pH 5,5 e 30 °C) selecionados nas etapas anteriores foram aplicados, com o objetivo de mitigar os efeitos tóxicos do hidrolisado, melhorando rendimento e produtividade do processo.

Após 24 h, com o consumo total da glicose, foi iniciada uma alimentação, em que quatro vasos foram alimentados com 600 mL de hidrolisado (100%). A alimentação durou 24 h, finalizado após 48 h do início do experimento, com fluxo de 25 mL/h. O pH 5,5 foi mantido constante pela adição automática de KOH 5 M. O pO₂ foi mantido a 10%, por

controle de cascata, em função da agitação (200 a 800 rpm) e do fluxo de ar (0,5 a 1 L/min). O cultivo continuou por mais 72 h, contabilizando 120 h de experimento, após a finalização da alimentação. Amostras foram coletadas diariamente para quantificação dos metabólitos por cromatografia líquida.

O hidrolisado 100% apresentava concentrações iniciais de glicose (6,90 g/L), xilose (66 g/L), ácido acético (12,34 g/L), glicerol (0,40 g/L), etanol (0,27 g/L), furfural (1,18 g/L) e hidroximetilfurfural - HMF (0,41 g/L). O hidrolisado foi obtido por explosão a vapor, seguida de hidrólise ácida da fração rica de hemicelulose, visando à quebra dos oligossacarídeos (MORAIS JUNIOR et al., 2018).

4.2.3. Quantificação de metabólitos por cromatografia líquida

As quantificações de AX, xilose e glicose foram feitas por cromatografia líquida empregando-se um Ultra-high Performance Liquid Chromatography (UHPLC) (Waters, AcQuity UPLC H-Class PDA), equipado com uma coluna ACQUITY Premier BEH Amide (1,7 μ m, 2,1 mm X 150 mm) a 50 °C. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 0,3 mL/min, com eluição gradiente de fase A 70% (CH₃CH 80% + CH₃COONH₄ 10 mM + NH₄ OH 0,2%) e fase B 30% (CH₃CH 40% + CH₃COONH₄ 10 mM + NH₄ OH 0,2%), no tempo de corrida de 11 minutos. O volume de injeção foi de 0,5 μ L. O detector usado na quantificação foi o Espalhamento de Luz Evaporativo (ELS), de modo que foi configurado com gain a 200, a pressão do gás a 35 psi, Drift tube a 40 °C e o modo do nebulizador como cooling.

Outros compostos, incluindo xilitol, ácido acético, furfural, etanol e HMF, também foram quantificados por cromatografia líquida, porém utilizando um High-performance Liquid chromatography (HPLC) (Waters, AcQuity UPLC H-Class RID), com a coluna Aminex HPX-87H a 45 °C. O detector aplicado foi o Índice de Refração (RID) e o Detector de Arranjo de Fotodiodos (PDA). A fase móvel era composta por ácido sulfúrico 5mM, com taxa de fluxo de 0,6 mL/min. O volume de injeção das amostras foi de 10 μ L e tempo de corrida de 60 minutos. Os tempos de retenção dos metabólitos analisados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Coluna e detector utilizados e tempos de retenção dos metabólitos quantificados.

Composto	Coluna empregada	Detector	Tempo de retenção aproximado (min)
Xilose	BEH Amide	ELSD	2.1
Glicose	BEH Amide	ELSD	3.0
Ácido xilônico	BEH Amide	ELSD	3.4
Glicerol	HPX 87H	RID	13.9
Ácido acético	HPX 87H	RID	15.1
Xilitol	HPX 87H	RID	17.7
Etanol	HPX 87H	RID	20.5
HMF	HPX 87H	PDA	34.5
Furfural	HPX 87H	PDA	51.4

4.2.4. Determinação dos parâmetros cinéticos em processos produtivos

Os parâmetros cinéticos foram determinados ao longo do tempo para os diferentes parâmetros físico-químicos avaliados, com o objetivo de identificar as condições mais favoráveis à produção de AX. Os cálculos correspondentes a cada parâmetro são apresentados a seguir e foram fundamentados nas metodologias descritas na literatura (ASLAN et al., 2024; DETCHOMPHOO et al., 2025; SCHMIDELL et al., 2021; SCHULER E KARGI, 2002).

Rendimento produto sob substrato

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S - S_0}$$

$Y_{P/S}$ = Rendimento de produto em função de substrato consumido (g/g)

P = Concentração de produto (g/L)

P_0 = Concentração de produto no tempo zero (g/L)

S = Concentração de substrato (g/L)

S_0 = Concentração de substrato no tempo zero (g/L)

Produtividade volumétrica

$$r_p = \frac{P}{t}$$

r_p = Produtividade volumétrica do produto (g/L.h)

P = Concentração de produto (g/L)

t = Tempo (h)

Produtividade específica

$$q_p = \frac{P}{t} \cdot \frac{1}{X}$$

q_p = Produtividade específica do produto (g/g.h)

P = Concentração de produto (g/L)

X = Concentração de biomassa celular (g/L)

t = Tempo (h)

Taxa de consumo de substrato

$$q_s = \frac{S}{t}$$

q_s = Taxa de consumo de xilose (g/L.h)

S = Concentração de xilose consumida (g/L)

t = Tempo (h)

Taxa específica de crescimento celular

$$\ln(X) = \mu t + \ln(X_0)$$

μ = Taxa específica de crescimento celular (h^{-1})

X = Concentração de biomassa celular (g/L)

X_0 = Concentração de biomassa celular no tempo zero (g/L)

t = Tempo (h)

5. Resultados e Discussões

5.1. Efeito da concentração inicial de xilose na produção de AX

Para avaliar o efeito da concentração inicial de xilose na produção de AX pelas linhagens *K. phaffii* XDH-AM e *K. phaffii* XDH-HL, os cultivos foram realizados em meio mineral FM22, suplementado com 20, 40, 80 e 120 g/L de xilose. Como a glicose é o principal substrato para crescimento celular, sua concentração inicial foi mantida constante em todos os ensaios. Nas primeiras 24 h de cultivo, ambas as linhagens apresentaram maiores concentrações de biomassa celular nos meios contendo menores concentrações de xilose (20 e 40 g/L). Entretanto, a partir de 48 h, o crescimento das linhagens atinge valores similares em todas as condições avaliadas (Figuras 9, 10, 11 e 12).

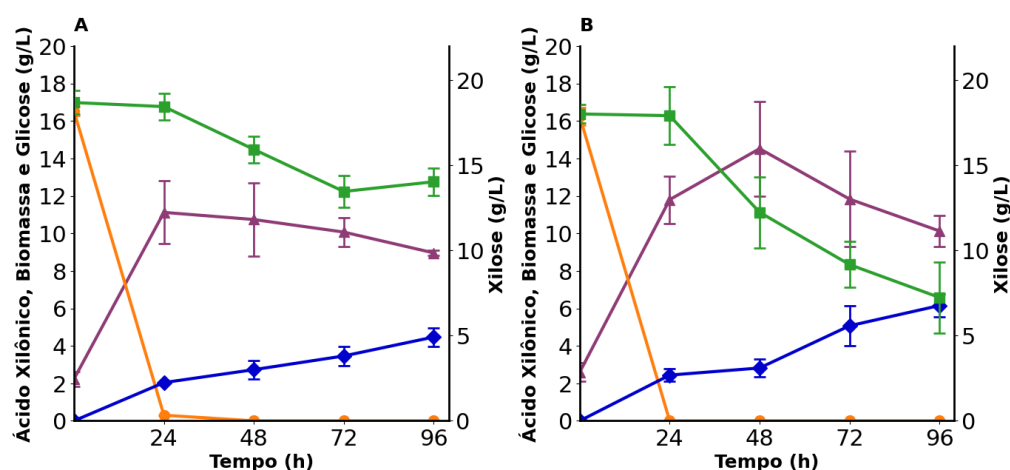


Figura 9. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos das linhagens *K. phaffii* XDH-HL e XDH-AM em 20 g/L de xilose. Perfis cinéticos de consumo de glicose (alaranjado) e xilose (verde), e

produção de biomassa celular (roxo) e AX (azul), da linhagem XDH-HL (A) e XDH-AM (B) no meio mineral FM22 contendo glicose 20 g/L e xilose 20 g/L.

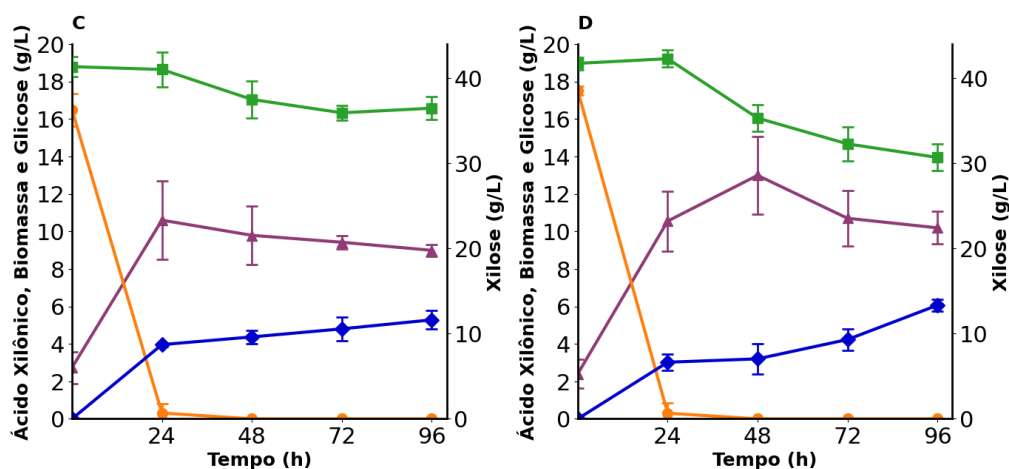


Figura 10. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos das linhagens *K. phaffii* XDH-HL e XDH-AM em 40 g/L de xilose. Perfis cinéticos de consumo de glicose (alaranjado) e xilose (verde), e produção de biomassa celular (roxo) e AX (azul), da linhagem XDH-HL (C) e XDH-AM (D) no meio mineral FM22 contendo glicose 20 g/L e xilose 40 g/L.

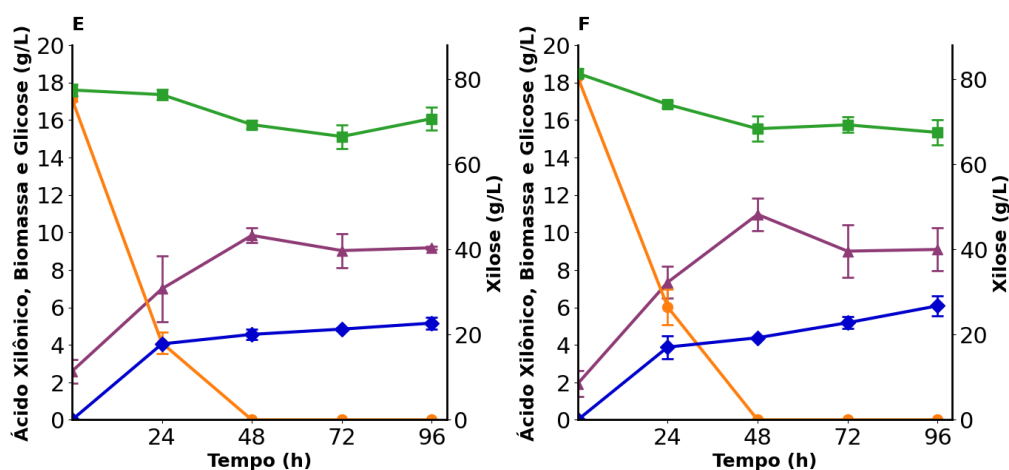


Figura 11. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos das linhagens *K. phaffii* XDH-HL e XDH-AM em 80 g/L de xilose. Perfis cinéticos de consumo de glicose (alaranjado) e xilose (verde), e produção de biomassa celular (roxo) e AX (azul), da linhagem XDH-HL (E) e XDH-AM (F) no meio mineral FM22 contendo glicose 20 g/L e xilose 80 g/L.

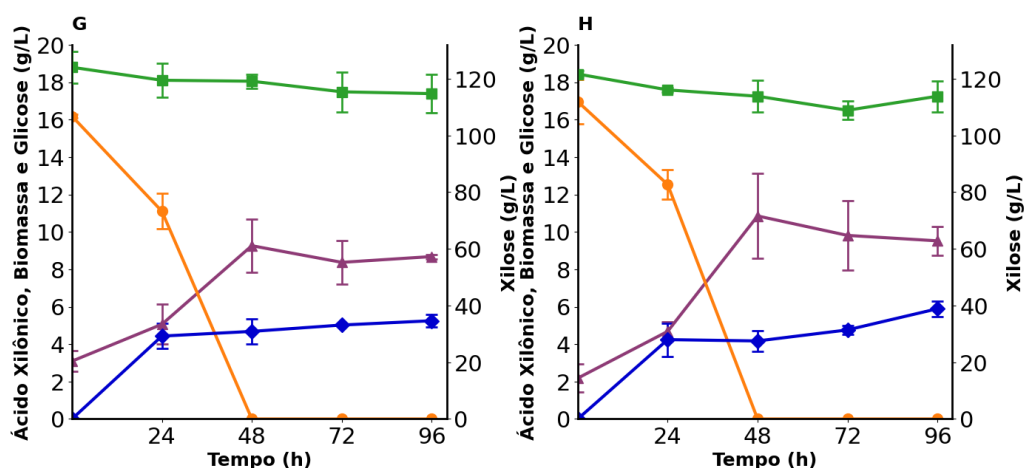


Figura 12. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos das linhagens *K. phaffii* XDH-HL e XDH-AM em 120 g/L de xilose. Perfis cinéticos de consumo de glicose (alaranjado) e xilose (verde), e produção de biomassa celular (roxo) e AX (azul), da linhagem XDH-HL (G) e XDH-AM (H) no meio mineral FM22 contendo glicose 20 g/L e xilose 120 g/L.

Nas primeiras 24 h de cultivo, o crescimento celular esteve predominantemente associado ao consumo da glicose, enquanto a xilose permaneceu praticamente inalterada nesse período (Figura 9, 10, 11 e 12). Em função da mesma concentração inicial de glicose em todos os ensaios, a similaridade observada nas concentrações finais de biomassa pode ser atribuída à limitação desse substrato. Nos meios contendo 20 e 40 g/L de xilose, a glicose foi completamente consumida em 24 h (Figura 9 e 10), ao passo que, nas concentrações de 80 e 120 g/L, seu consumo ocorreu de forma mais lenta, prolongando a fase de crescimento e retardando a entrada na fase estacionária (Figura 11 e 12).

Após 96 h de cultivo, observou-se aumento no consumo de xilose com o aumento da concentração inicial do substrato. Em 120 g/L, as taxas de consumo foram 1,4 e 1,6 vezes superiores às observadas em 20 g/L para as linhagens XDH-HL e XDH-AM, respectivamente (Tabela 5). Entretanto, as concentrações finais de AX permaneceram semelhantes entre as quatro condições avaliadas (Tabela 5), resultando na redução do rendimento de conversão da xilose em AX com o aumento da concentração inicial do substrato (Tabela 5).

Em 40 g/L de xilose inicial, a linhagem XDH-HL atingiu rendimento de 1,08 g/g, próximo ao máximo teórico de 1,11 g AX/g xilose (RAMOS et al., 2021), enquanto a linhagem XDH-AM exibiu rendimento de 0,55 g/g na mesma condição. Em todas as

concentrações avaliadas, a linhagem XDH-AM apresentou taxas de consumo de xilose superiores às da XDH-HL, contudo, a XDH-HL demonstrou maior conversão do substrato consumido em AX, evidenciando maior eficiência metabólica (Tabela 5).

Tabela 5. Consumo de xilose e desempenho do cultivo de *K. phaffii* XDH-HL e *K. phaffii* XDH-AM no meio mineral FM22, suplementado com xilose 20, 40 80 e 120 g/L após 96 h.

Condição avaliada	Linhagem de <i>K. phaffii</i>	Xilose inicial (g/L)	Xilose consumida (g/L)	q_s (g/L.h)	Ácido xilônico (g/L)	$Y_{AX/X}$ (g/g)
20 g/L	XDH-HL	18,93 ± 0,7	4,91 ± 0,61	0,05 ± 0,01	4,47 ± 0,49	0,91 ± 0,08
	XDH-AM	18,01 ± 0,54	10,77 ± 1,22	0,11 ± 0,01	6,15 ± 0,62	0,57 ± 0,04
40 g/L	XDH-HL	41,34 ± 1,16	4,88 ± 0,40	0,05 ± 0,00	5,28 ± 0,49	1,08 ± 0,01
	XDH-AM	41,72 ± 0,73	11,04 ± 0,15	0,11 ± 0,00	6,06 ± 0,30	0,55 ± 0,03
80 g/L	XDH-HL	77,43 ± 1,43	6,73 ± 2,19	0,07 ± 0,02	5,16 ± 0,32	0,82 ± 0,24
	XDH-AM	81,34 ± 1,15	13,87 ± 1,51	0,14 ± 0,02	6,08 ± 0,52	0,44 ± 0,07
120 g/L	XDH-HL	124,05 ± 5,67	6,87 ± 1,02	0,07 ± 0,01	5,25 ± 0,33	0,78 ± 0,14
	XDH-AM	121,68 ± 1,25	17,60 ± 5,41	0,18 ± 0,06	5,89 ± 0,41	0,29 ± 0,11

Esses resultados indicam que concentrações iniciais mais elevadas de xilose não resultam em aumento proporcional da formação de AX, sugerindo o desvio do substrato para a formação de outros compostos, como o xilitol. Em cepas selvagens de *K. phaffii* X-33, a assimilação de xilose ocorre pela via oxidorrredutiva, na qual a xilose é convertida em xilitol e posteriormente em D-xilulose-5-fosfato, intermediário da via das pentoses fosfato (HEISTINGER et al., 2022). Dessa forma, em altas concentrações iniciais de xilose (80 e 120 g/L), parte do substrato pode ser direcionado para essa rota, reduzindo o rendimento de AX.

Além disso, o consumo de xilose ocorreu após a metabolização da glicose por ambas as linhagens nas quatro condições avaliadas. Esse comportamento está relacionado à repressão catabólica de carbono (RCC), que favorece o consumo prioritário de glicose em detrimento da xilose (JAGTAP e RAO, 2018; WANG et al., 2022). Em menores

concentrações iniciais de xilose (20 e 40 g/L), a glicose foi consumida nas primeiras 24 h de cultivo. Por outro lado, em concentrações mais elevadas (80 e 120 g/L), esse consumo foi mais lento e não ocorreu nas primeiras 24 h. Em *K. phaffii*, o sistema de transporte de açúcares ainda não é completamente elucidado. Estudos relatam a presença de transportadores de glicose com alta afinidade (VILLEGAS et al., 2023), enquanto transportadores específicos para xilose ainda não foram caracterizados. De modo geral, em leveduras, os açúcares são internalizados por transportadores de hexoses, que apresentam maior afinidade por glicose do que por xilose. Como consequência, ocorre competição entre esses açúcares pelo sistema de transporte, resultando no consumo preferencial de glicose (QIAO et al., 2021).

De modo geral, a linhagem XDH-HL apresentou maior eficiência de conversão da xilose em AX, enquanto a linhagem XDH-AM destacou-se pelo maior consumo do substrato. Considerando que o rendimento é um parâmetro-chave para a eficiência do processo (PONTE et al., 2018), a linhagem *K. phaffii* XDH-HL foi selecionada para as etapas subsequentes, bem como a concentração de 40 g/L de xilose, por apresentar elevada eficiência de conversão e potencial redução de custos operacionais.

5.2. Efeito do pH na produção de AX

A fim de avaliar o efeito do pH na produção de AX por *K. phaffii* XDH-HL, a linhagem foi cultivada em meio mineral FM22, contendo glicose 20 g/L e xilose 40 g/L. O pH da cultura foi mantido constante a 3,5, 4,5, 5,5 e 6,5 por adição de KOH 5 M e H₂SO₄ 5 M. O perfil de crescimento celular foi semelhante entre os pH de 3,5, 4,5 e 5,5. Embora, o pH 6,5 apresente valores médios aparentemente superiores, os elevados desvios padrões, como observado em 72 h ($16,10 \pm 7,99$ g/L), impedem a confirmação dessa tendência (Figura 13).

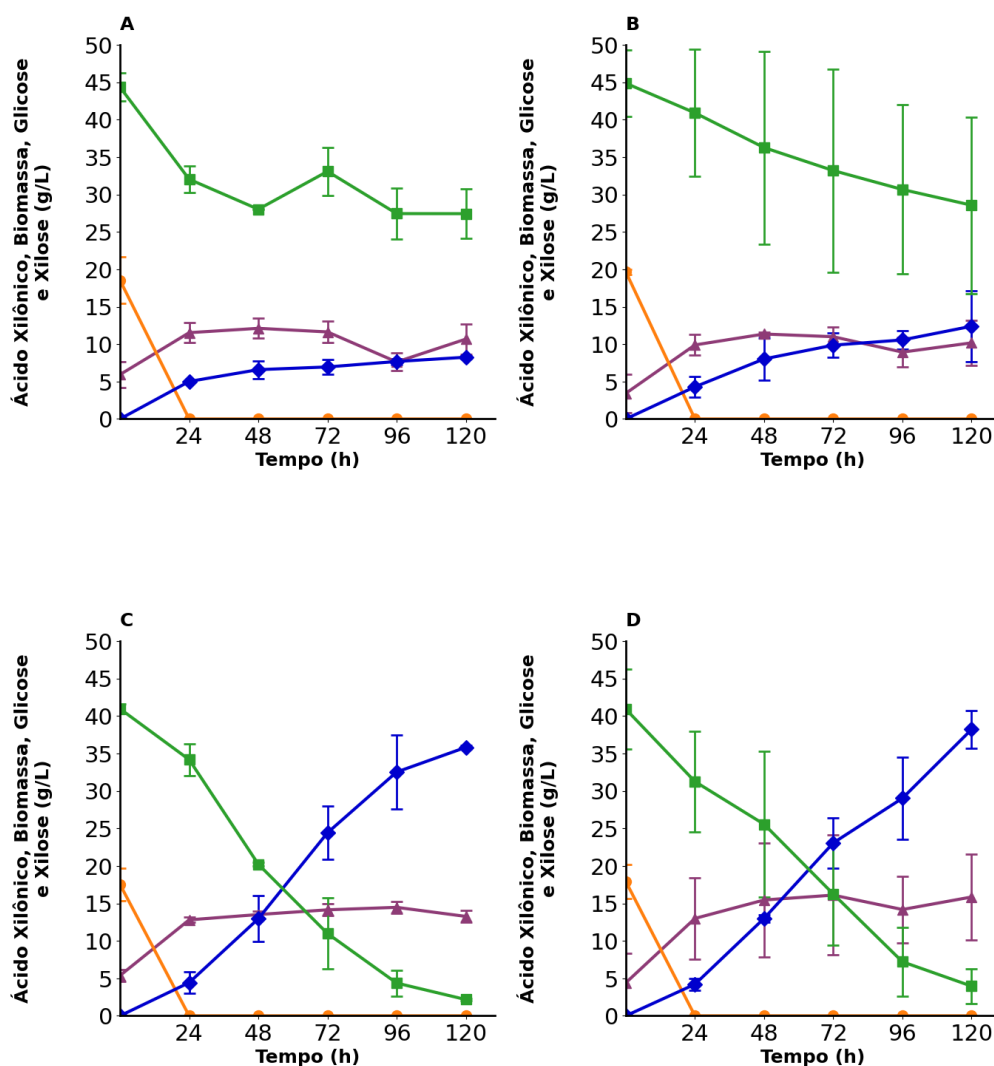


Figura 13. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem *K. phaffii* XDH-HL em diferentes pH. Perfis cinéticos de consumo de glicose (alaranjado) e xilose (verde), e produção de biomassa celular (roxo) e AX (azul), da linhagem XDH-HL no meio mineral FM22 com glicose 20 g/L e xilose 40 g/L, sob pH 3,5 (A), 4,5 (B), 5,5 (C) e 6,5 (D).

K. phaffii destaca-se por sua capacidade de crescimento em ampla faixa de pH (3-7) (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). O crescimento observado em pH 3,5, semelhante ao de 4,5 e 5,5, confirma sua elevada tolerância a ambientes ácidos (Figura 13). Entretanto, o intervalo usualmente empregado em cultivos é entre 5,0 e 6,5, sendo a escolha do pH dependente da proteína recombinante ou metabólito de interesse (CARNEIRO et al., 2022).

O consumo de xilose foi fortemente influenciado pelo pH do meio. A taxa de consumo de xilose pela levedura foi 2,6 vezes maior em pH 5,5 do que em pH 3,5 (Tabela 6). Como

consequência, a produção de AX também foi negativamente afetada em pH mais ácido. Em pH 5,5, os valores de concentração final de AX, produtividade volumétrica e rendimento foram, respectivamente, 4,3, 4,7 e 1,5 vezes superiores aos obtidos em pH 3,5 (Tabela 6).

Tabela 6. Consumo de xilose e parâmetros de desempenho do cultivo de *K. phaffii* XDH-HL sob diferentes pH após 120 h.

Condição avaliada	Xilose Inicial (g/L)	Xilose consumida (g/L)	Ácido xilônico (g/L)	r_p (g/L.h)	q_s (g/L.h)	$Y_{AX/X}$ (g/g)
pH 3,5	44,34 ± 1,87	16,91 ± 1,47	8,25 ± 0,21	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,59 ± 0,03
pH 4,5	44,86 ± 4,40	16,30 ± 7,39	12,39 ± 4,76	0,10 ± 0,04	0,14 ± 0,06	0,77 ± 0,06
pH 5,5	40,95 ± 0,66	38,78 ± 0,84	35,81 ± 0,25	0,28 ± 0,04	0,32 ± 0,01	0,92 ± 0,03
pH 6,5	40,91 ± 5,33	36,95 ± 3,04	38,20 ± 2,49	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,03	1,02 ± 0,03

A redução no consumo de xilose e produção de AX em pH mais baixos pode ser atribuída ao aumento da demanda energética para manutenção da homeostase intracelular. Em condições ácidas, o gradiente de prótons entre o meio e o citosol é intensificado, exigindo maior gasto energético para a regulação do pH citoplasmático (TOIVARI et al., 2012; TRICHEZ et al., 2022). O AX é um ácido fraco, com pKa de 3,56 para a primeira desprotonação (HUANG et al., 2017). Em pH inferior a esse valor, o AX encontra-se predominantemente na forma não dissociada, favorecendo sua difusão pela membrana plasmática e promovendo acidificação intracelular após dissociação no citosol, o que compromete o metabolismo celular (GUO e OLSSON, 2016).

Os pH 5,5 e 6,5 resultaram em produções semelhantes de AX, não sendo observado ganho adicional de desempenho produtivo em pH 6,5. Considerando que cultivos em pH mais elevado requerem maior consumo de base para manutenção do pH ao longo do processo, a elevação para 6,5 implica aumento de custo operacional. Dessa forma, o pH 5,5 representa a condição mais adequada, conciliando desempenho produtivo e viabilidade econômica, sendo selecionado para as etapas subsequentes.

5.3. Efeito da temperatura na produção de AX

No intuito de avaliar a influência da temperatura na produção de AX pela linhagem *K. phaffii* XDH-HL, a levedura foi cultivada em meio mineral FM22, contendo glicose 20 g/L e xilose 40 g/L, sob temperaturas de 26, 28, 30 e 32 °C. Nas primeiras 72 h de cultivo, o crescimento celular foi maior a 26 °C e 28 °C, em comparação a 30 °C e 32 °C. Ao final de 96 h, entretanto, as concentrações de biomassa se aproximaram entre todas as condições avaliadas (Figura 14).

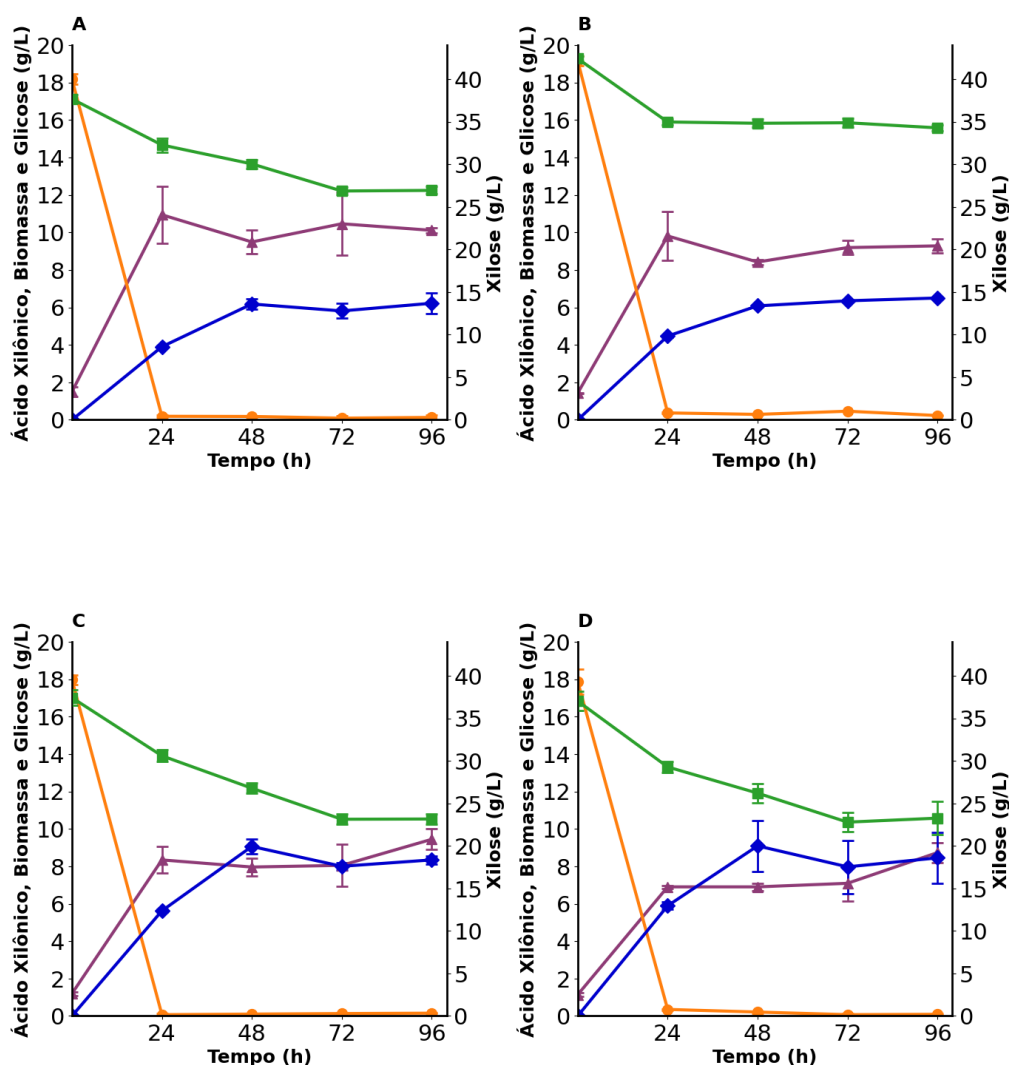


Figura 14. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem *K. phaffii* XDH-HL em diferentes temperaturas. Perfis cinéticos de consumo de glicose (alaranjado) e xilose (verde), e produção de biomassa celular (roxo) e AX (azul), da linhagem XDH-HL no meio mineral FM22 com glicose 20 g/L e xilose 40 g/L, sob 26 °C (A), 28 °C (B), 30 °C (C) e 32 °C (D).

Por outro lado, o consumo de xilose e síntese de AX foram favorecidas em temperaturas mais elevadas. Os valores de taxa de consumo de xilose e concentração final de AX em 30 °C foram 1,7 e 1,3 vezes superiores aos obtidos a 28 °C, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7. Consumo de xilose e parâmetros de desempenho do cultivo de *K. phaffii* XDH-HL sob diferentes temperaturas de cultivo após 96 h.

Condição Avaliada	Xilose inicial (g/L)	Xilose consumida (g/L)	Ácido xilônico (g/L)	Q _s (g/L.h)
26 °C	37,66 ± 0,50	10,73 ± 0,88	6,22 ± 0,57	0,10 ± 0,01
28 °C	42,39 ± 0,32	8,31 ± 0,33	6,50 ± 0,02	0,09 ± 0,00
30 °C	37,42 ± 0,90	14,26 ± 0,79	8,34 ± 0,22	0,15 ± 0,01
32 °C	37,02 ± 1,13	15,33 ± 2,01	8,45 ± 1,35	0,14 ± 0,03

A temperatura é um fator crítico no ajuste de processos produtivos, uma vez que influencia tanto no crescimento quanto a produção de metabólitos (KARBALAEI, REZAEI e FARSIANI, 2020). Para *K. phaffii*, a faixa ideal situa-se entre 28 e 30 °C, enquanto valores acima de 32 °C podem comprometer a expressão de proteínas e causar morte celular (KARBALAEI, REZAEI e FARSIANI, 2020; TAYPE et al., 2020). Nesse contexto, a menor biomassa observada a 32 °C pode estar associada à exposição da levedura a condições térmicas que ultrapassa a faixa térmica ideal. Resultados semelhantes foram descritos na literatura (SEVERINSEN et al., 2024). O maior crescimento celular de *K. phaffii* recombinante a 28 °C foi observado, enquanto maiores produções de ácido itacônico ocorreram a 30 e 32 °C, indicando que temperaturas elevadas favorecem a biossíntese de ácidos orgânicos (SEVERINSEN et al., 2024).

Com base nesses resultados, verificou-se que a produção de AX e a taxa de consumo de xilose foram favorecidas em 30 e 32 °C, enquanto maiores concentrações de biomassa foram observadas em 26 e 28 °C. Considerando que o crescimento celular em *K. phaffii*

é majoritariamente sustentado pelo consumo de glicose, e que a produção de AX está associada à oxidação da xilose, a temperatura de 30 °C foi selecionada para a continuidade dos experimentos, por proporcionar maior consumo de xilose e produção de AX, mantendo crescimento celular adequado.

5.4. Efeito da concentração inicial de biomassa celular na produção de AX

O efeito da concentração inicial de biomassa celular na produção de AX pela linhagem *K. phaffii* XDH-HL foi avaliado por meio da inoculação da levedura em concentrações iniciais de 0,5, 1,5, 3,0, 5,0 e 10,0 g/L, em meio mineral FM22 suplementada com glicose 20 g/L e xilose 40 g/L.

Em todas as condições avaliadas, o crescimento celular ocorreu predominantemente nas primeiras 24 h de cultivo, período correspondente à fase exponencial, durante o qual houve rápido consumo da glicose disponível no meio (Figura 15 e 16) (AN et al., 2022; LV et al., 2017). Após esse período, observou-se estabilização da biomassa, indicando a entrada na fase estacionária em decorrência da limitação nutricional causada pelo esgotamento desse substrato (AN et al., 2022; RAAD et al., 2021). A exceção foi o cultivo iniciado com 0,5 g/L, no qual a presença de glicose residual prolongou o crescimento até 72 h, retardando o consumo de xilose e, conseqüentemente, a produção de AX (Figura 15). Em contraste, o cultivo iniciado com 5,0 g/L apresentou conversão mais rápida da xilose em AX, mantendo valores superiores ao longo de todo o processo (Figura 16).

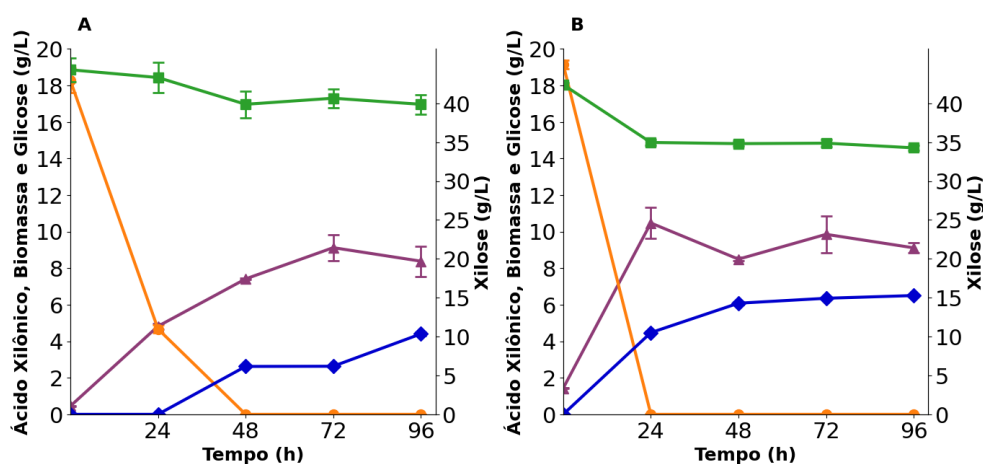


Figura 15. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem *K. phaffii* XDH-HL inoculada em concentrações iniciais de 0,5 e 1,5 g/L. Perfis cinéticos de consumo de glicose (alaranjado)

e xilose (verde), e produção de biomassa celular (roxo) e AX (azul), da linhagem XDH-HL no meio mineral FM22 com glicose 20 g/L e xilose 40 g/L, inoculada em 0,5 (A), 1,5 g/L (B).

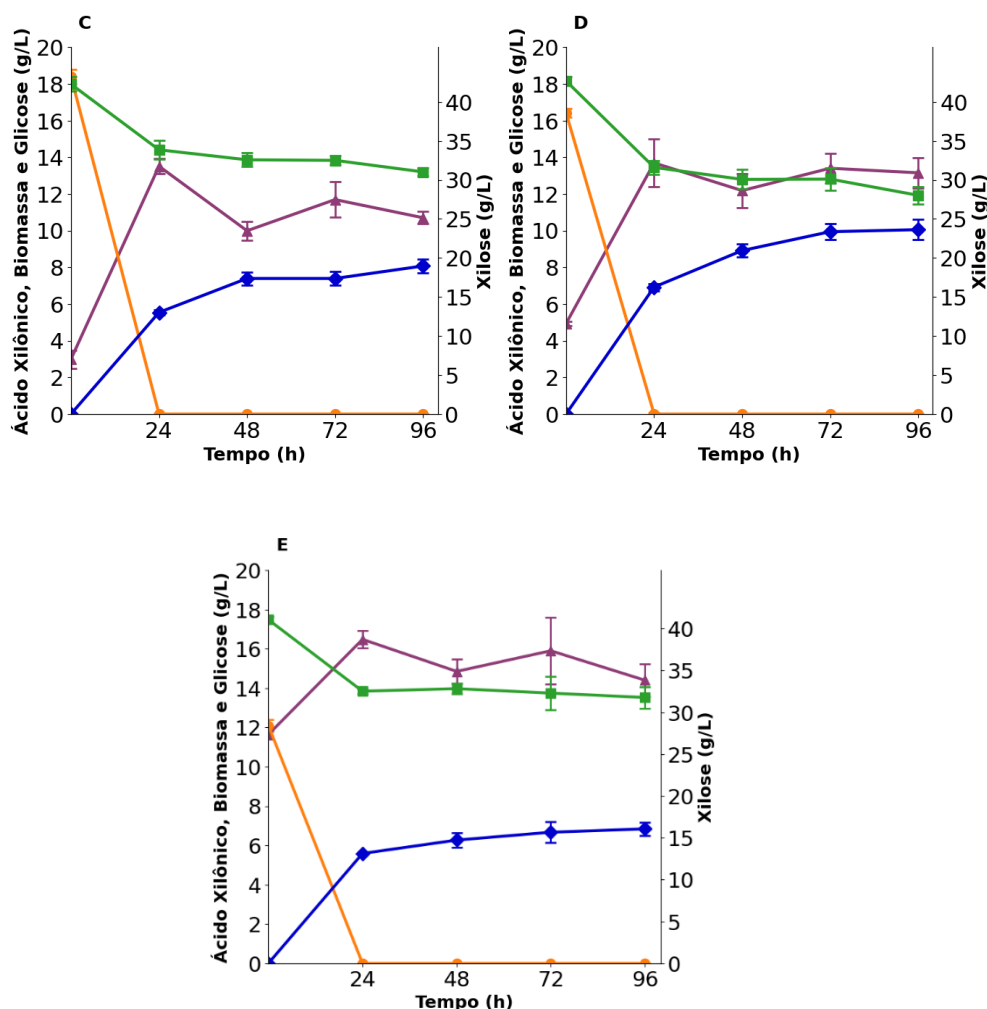


Figura 16. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem *K. phaffii* XDH-HL inoculada em concentrações iniciais de 3,0, 5,0 e 10,0 g/L. Perfis cinéticos de consumo de glicose (alaranjado) e xilose (verde), e produção de biomassa celular (roxo) e AX (azul), da linhagem XDH-HL no meio mineral FM22 com glicose 20 g/L e xilose 40 g/L, inoculada em 3,0 (C), 5,0 (D), 10,0 g/L (E).

Em 96 h de cultivo, a condição iniciada com 5,0 g/L apresentou taxa de consumo de xilose e concentração final de AX 3,4 e 2,3 vezes superiores, respectivamente, às observadas no cultivo iniciado com 0,5 g/L (Tabela 8). Por outro lado, o aumento para 10,0 g/L resultou em redução de 1,4 e 1,5 vezes nas taxas de consumo de xilose e concentração final de AX, respectivamente, em comparação à condição de 5,0 g/L (Tabela 8). Esse comportamento é refletido nos valores de produtividade volumétricas, sendo a condição de 5,0 g/L que apresentou melhor desempenho dentre as concentrações avaliadas (Tabela 8).

Tabela 8. Consumo de xilose e parâmetros de desempenho do cultivo de *K. phaffii* XDH-HL sob diferentes concentrações iniciais de biomassa celular após 96 h.

Condição Avaliada	Xilose inicial (g/L)	Xilose consumida (g/L)	Ácido xilônico (g/L)	r_p (g/L.h)	q_s (g/L.h)	Biomassa celular (g/L)
0,5 g/L	44,11 ± 1,54	4,25 ± 0,40	4,40 ± 0,11	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	8,38 ± 0,83
1,5 g/L	42,39 ± 0,32	8,31 ± 0,32	6,50 ± 0,02	0,07 ± 0,00	0,10 ± 0,01	9,11 ± 0,29
3,0 g/L	42,26 ± 0,92	11,23 ± 0,58	8,07 ± 0,37	0,08 ± 0,00	0,14 ± 0,01	10,70 ± 0,33
5,0 g/L	42,67 ± 0,53	14,65 ± 0,82	10,05 ± 0,37	0,10 ± 0,01	0,17 ± 0,02	13,15 ± 0,84
10,0 g/L	41,08 ± 0,32	9,30 ± 0,98	6,84 ± 0,34	0,07 ± 0,00	0,12 ± 0,03	14,40 ± 0,83

O incremento da concentração inicial de biomassa de 0,5 para 5,0 g/L resultou em melhor desempenho produtivo, provavelmente devido ao maior número de células metabolicamente ativas, até o limiar em que transferência de oxigênio passa a se tornar limitante (10,0 g/L). Em cultivos com alta concentração celular, o aumento da demanda por oxigênio dissolvido pode levar à limitação de sua transferência para o meio líquido, influenciando negativamente o desempenho metabólico da levedura (BRABANDER et al., 2023; TAYPE et al., 2020).

A transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida é um fator crítico em cultivos de *K. phaffii*, uma vez que se trata de uma levedura aeróbica, cujo metabolismo e desempenho produtivo dependem da disponibilidade desse elemento (CARNEIRO et al., 2022; CREGG, CEREGHINO e HIGGINS, 2000; SCHMIDELL, 2021). Assim, concentrações celulares elevadas podem comprometer o fornecimento adequado de oxigênio, limitando a atividade metabólica e, conseqüentemente, a produção de metabólitos de interesse. Apesar dessas limitações, estudos indicam que o aumento da concentração inicial de biomassa pode elevar a produtividade volumétrica em processos produtivos, como observado neste estudo até a concentração de 5,0 g/L (GUO e OLSSON, 2016; WEI et al., 2009).

Assim, o cultivo iniciado com concentração de biomassa celular de 5,0 g/L apresentou o melhor desempenho, aliando maior produção de AX, maior eficiência de consumo de xilose e produtividade volumétrica. Esses resultados, em conjunto com dados da literatura, sustentam a escolha dessa condição como a mais adequada para o estabelecimento do processo produtivo de AX pela *K. phaffii* recombinante, sendo selecionada para as etapas subsequentes.

5.5. Efeito da pressão parcial de oxigênio na produção de AX

Para avaliar a influência da oxigenação na produção de AX, *K. phaffii* XDH-HL foi cultivada em meio YPD (glicose 20 g/L), suplementado com xilose 40 g/L, sob pressões parciais de oxigênio (pO_2) de 1, 10 e 20%. Os cultivos conduzidos sob maiores níveis de oxigenação (10 e 20%) apresentaram maior formação de biomassa celular ao longo do tempo (Figura 17), consequentemente resultando em maiores taxas específicas de crescimento celular, enquanto a limitação de oxigênio (1%) levou a um crescimento reduzido (Figura 17).

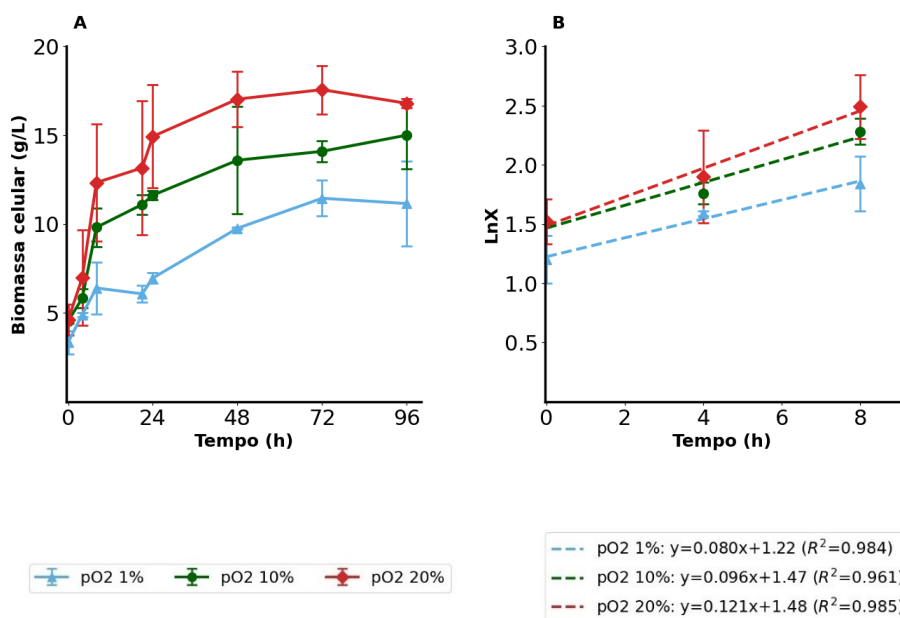


Figura 17. Perfil de crescimento celular e taxas específicas de crescimento da linhagem *K. phaffii* XDH-HL sob diferentes pO_2 . Perfis cinéticos de crescimento celular (A) e taxas específicas (B) da linhagem XDH-HL no meio YPD (glicose 20 g/L), suplementado com xilose (40 g/L), sob pO_2 1% (azul claro), 10% (verde escuro) e 20% (vermelho). As taxas específicas de crescimento celular são os coeficientes angulares das regressões lineares, durante a fase exponencial (0 – 8 h).

Em relação ao consumo e à produção de metabólitos, a configuração em cascata nos valores máximos de agitação e aeração promoveram elevada entrada de ar nos vasos, resultando em arraste do meio de cultivo ao longo do experimento, e conseqüentemente, na concentração aparente de seus componentes. Para determinar as concentrações reais, os valores obtidos por cromatografia líquida foram corrigidos considerando o efeito do arraste. A linha tracejada representa os valores medidos experimentalmente, enquanto a linha contínua corresponde aos valores corrigidos (Figura 18). Dessa forma, os perfis cinéticos de consumos e produções foram determinados a partir das concentrações corrigidas dos metabólitos (Figura 19).

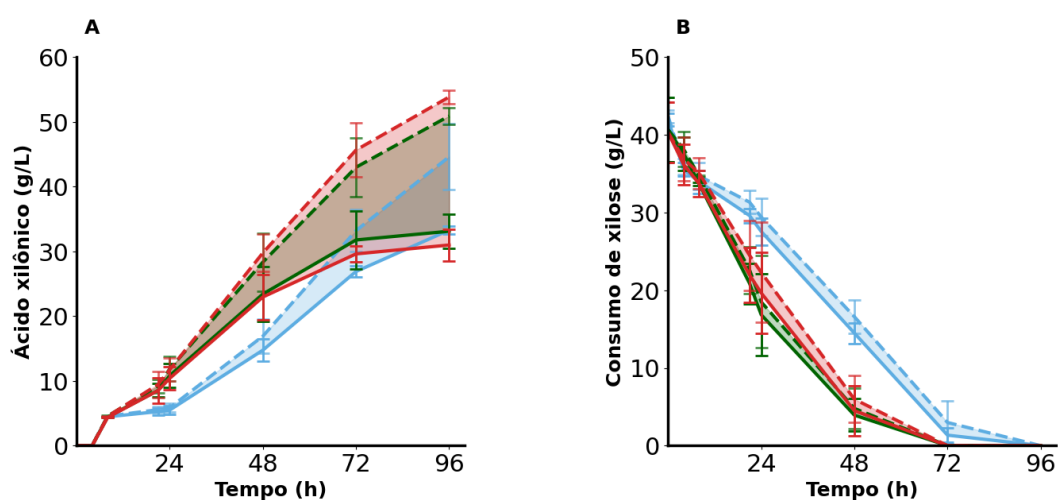


Figura 18. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem *K. phaffii* XDH-HL a partir de dados medidos experimentalmente e corrigidos considerando a evaporação. Perfis cinéticos de consumo de xilose e produção de AX, da linhagem XDH-HL no meio YPD (glicose 20 g/L), suplementado com xilose 40 g/L, sob pO₂ 1% (azul claro), 10% (verde escuro), 20% (vermelho). Linhas tracejadas indicam valores experimentais e linhas contínuas valores corrigidos pelo efeito do arraste.

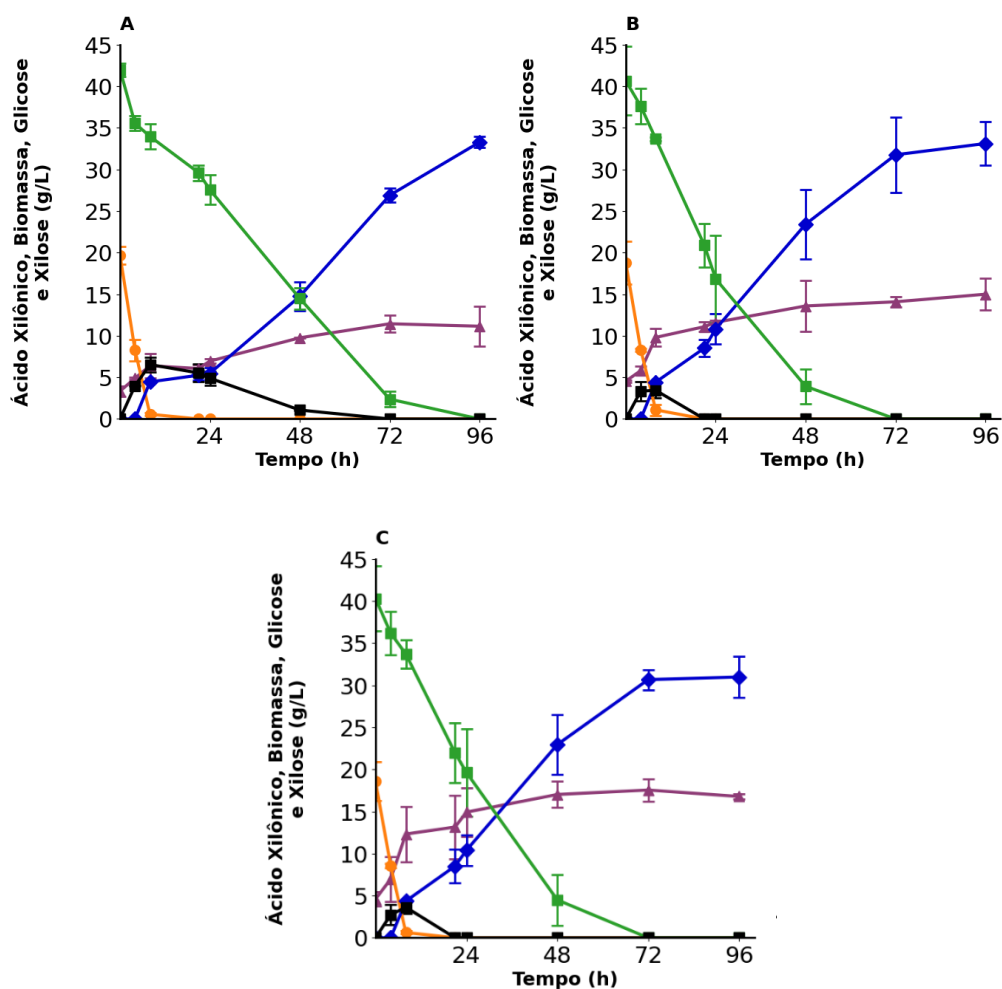


Figura 19. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem *K. phaffii* XDH-HL sob diferentes pO_2 . Perfis cinéticos de consumo de glicose (alaranjado) e xilose (verde), e produção de biomassa celular (roxo), AX (azul) e etanol (preto), da linhagem XDH-HL no meio YPD (glicose 20 g/L), suplementado com xilose 40 g/L, sob pO_2 1% (A), 10% (B), 20% (C).

A produção de AX teve início após o consumo completo da glicose, ocorrido nas primeiras 8 h de cultivo. Ao final de 96 h, o AX atingiu concentrações semelhantes entre as três condições avaliadas (Figura 19), enquanto a xilose foi totalmente consumida em todos os ensaios (Figura 19). Em contrapartida, sob maiores níveis de oxigenação (10 e 20%), o consumo de xilose ocorreu de forma mais rápida, levando a maiores taxas de consumo e produtividades volumétricas em 48 h de cultivo (Tabela 9).

Tabela 9. Consumo de xilose e parâmetros de desempenho do cultivo de *K. phaffii* XDH-HL sob diferentes níveis de oxigenação após 48 h.

Condição Avaliada	Xilose inicial (g/L)	Xilose consumida (g/L)	Ácido xilônico (g/L)	r_p (g/L.h)	q_s (g/L.h)	$Y_{AX/X}$ (g/g)
1%	42,00 ± 0,81	27,93 ± 0,26	14,75 ± 1,70	0,31 ± 0,04	0,58 ± 0,01	0,53 ± 0,07
10%	40,67 ± 4,12	36,74 ± 1,01	23,42 ± 4,19	0,49 ± 0,09	0,77 ± 0,04	0,64 ± 0,15
20%	40,32 ± 3,88	35,81 ± 0,43	22,96 ± 3,52	0,48 ± 0,28	0,75 ± 0,02	0,64 ± 0,11

A redução do crescimento celular sob condições de baixa oxigenação já foi descrita para *K. phaffii* (BAUMANN et al., 2010; KOSTOPOULOU et al., 2025). A limitação de oxigênio impacta o metabolismo central da levedura, reduzindo a capacidade respiratória de geração de ATP e promovendo a transição do metabolismo respiratório para um metabolismo fermentativo (BAUMANN et al., 2010).

Uma das consequências dessa adaptação metabólica é a formação de subprodutos fermentativos (GAMISANS et al., 2020; GASSET et al., 2022). Nesse contexto, observou-se maior formação de etanol na condição de pO_2 de 1% em comparação às demais condições avaliadas (Figura 19). Nessa condição, o etanol permaneceu detectável até 48 h de cultivo, possivelmente devido ao arraste promovido pelo controle em cascata, associado ao fluxo de ar utilizado para manter o pO_2 constante (STARINSKAYA et al., 2021; TSACHAKI et al., 2008).

Em contraste, sob maiores níveis de oxigenação (10 e 20%), o etanol foi detectado apenas nas primeiras horas de cultivo. Nesse período, a elevada taxa respiratória da levedura na presença de glicose dificultou a manutenção do pO_2 constante, resultando temporariamente em condições limitantes de oxigênio e favorecendo a formação de etanol. Após o consumo da glicose, o etanol deixou de ser observado, em decorrência da estabilização do controle em cascata e do arraste pelo fluxo de ar (STARINSKAYA et al., 2021; TSACHAKI et al., 2008).

O consumo de xilose mais rápido em elevada oxigenação (10 e 20%), e consequentemente, maiores taxas de consumo e produtividades volumétricas em 48 h de

cultivo, é explicado pela característica da *K. phaffii* em ser uma levedura aeróbica obrigatória. Ela depende de oxigênio para sobrevivência e crescimento. O oxigênio funciona como aceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, liberando energia para as células e regenerando os cofatores, como o NAD^+ , essencial para a oxidação da xilose em AX (SCHMIDELL, 2021; VALDEHUESA et al., 2018). Portanto, a oxigenação do meio, assim como a transferência e dissolução deste elemento, da fase gasosa para a fase líquida, é fundamental para o bom desempenho do processo (CARNEIRO et al., 2022; SCHMIDELL, 2021).

A elevação do pO_2 influenciou diretamente o desempenho produtivo de AX. Aos 48 h de cultivo, a condição de pO_2 apresentou os melhores resultados, com maiores valores de concentração de AX, produtividade volumétrica, taxa de consumo de xilose e rendimento quando comparada à baixa oxigenação (1%). O aumento do pO_2 para 20% não resultou em ganhos adicionais em relação a 10%, além de tornar o processo operacional mais complexo, em função do maior arraste do meio. Dessa forma, o pO_2 de 10% representa a condição mais adequada para a produção de AX pela *K. phaffii* recombinante, sendo escolhida para a etapa seguinte.

O desempenho produtivo da linhagem *K. phaffii* XDH-HL, em cultivo em batelada por até 24 h, em meio sintético, foi comparado aos experimentos anteriores conduzidos neste estudo, no mesmo período. Essa comparação teve como objetivo evidenciar os avanços obtidos após a aplicação conjunta dos parâmetros físico-químicos selecionados. A aplicação simultânea desses parâmetros ocorreu na fase inicial de batelada (0 – 24 h) do cultivo em batelada alimentada, cujo experimento é descrito no próximo tópico (Tabela 10).

Tabela 10. Desempenho produtivo da linhagem *K. phaffii* XDH-HL em cultivo em batelada em meio sintético sob aplicação dos parâmetros físico-químicos selecionados após 24 h.

Condição	Ácido xilônico (g/L)	r_p (g/L.h)	q_p (g/g.h)	$Y_{AX/X}$ (g/g)
40 g/L	$3,96 \pm 0,06$	$0,17 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,00$	$0,83 \pm 0,02$
pH 5,5	$4,06 \pm 1,19$	$0,17 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,30$
5 g/L	$6,92 \pm 0,20$	$0,29 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,00$	$0,62 \pm 0,01$

30 °C	5,62 ± 0,09	0,23 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,83 ± 0,06
pO ₂ 10%	10,82 ± 0,09	0,45 ± 0,08	0,04 ± 0,01	0,45 ± 0,06
Aplicação simultânea dos parâmetros	20,12 ± 0,17	0,84 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,61 ± 0,01

A aplicação simultânea dos parâmetros físico-químicos estabelecidos resultou em diminuição do rendimento e aumento da concentração de AX, da produtividade volumétrica e da produtividade específica do processo (Tabela 10). A concentração de AX foi 1,9 vezes superior à obtida no experimento de avaliação da oxigenação, enquanto as produtividades volumétrica e específica foram 1,9 e 2,0 vezes maiores, respectivamente. Com base nesses resultados, a estratégia de cultivo foi posteriormente avaliada em batelada alimentada, visando à aplicação do processo em hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar.

5.6. Produção de AX por *K. phaffii* a partir de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar

Para a avaliação do desempenho de *K. phaffii* XDH-HL em hidrolisado, a levedura foi cultivada em meio YPD (glicose 20 g/L) suplementado com xilose 40 g/L ou hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar (30% v/v), sob os parâmetros físico-químicos previamente selecionados. Embora a biomassa celular inicial planejada tenha sido de 5 g/L, os cultivos foram inoculados com 7,5 g/L (Figura 20).

Durante a fase de batelada (0 - 24 h), o crescimento celular foi menor no meio contendo hidrolisado que em meio sintético (Figura 20). Na fase de alimentação (24 – 48 h), observou-se redução da concentração de biomassa em ambos os cultivos, devido ao efeito de diluição decorrente do aumento do volume do meio durante essa etapa. Após o término da alimentação (48 h), com a estabilização do volume do cultivo, observou-se aumento na concentração de biomassa, indicando que, durante a fase de alimentação, o crescimento celular ocorreu a uma taxa inferior à taxa de diluição imposta pela estratégia de cultivo (Figura 20).

Em relação à produção de AX, observou-se maior acúmulo do produto quando a levedura foi cultivada em meio sintético. A redução da concentração de AX após o início da alimentação (24 h) está associada ao efeito de diluição decorrente do aumento do volume do meio durante essa etapa. A concentração de AX diminuiu de 20,1 para 13,4 g/L no meio sintético e de 6,3 para 4,9 g/L no meio contendo hidrolisado ao final da alimentação (Figura 20). Esses valores refletem o fator de diluição volumétrica de três vezes, resultante do aumento do volume do cultivo de 300 mL para 900 mL durante a alimentação, indicando que a produção de AX nessa fase foi praticamente nula, especialmente no cultivo contendo hidrolisado (Figura 20).

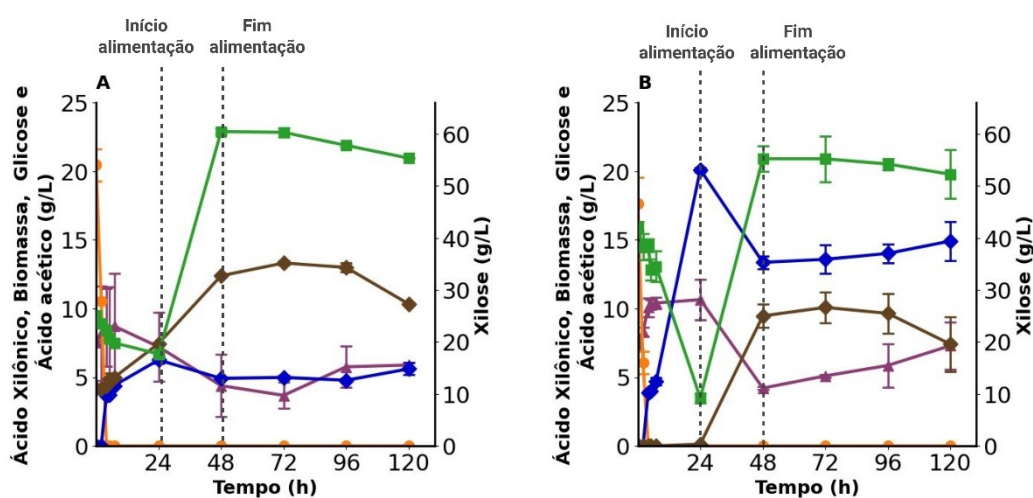


Figura 20. Perfil de consumo de substratos e formação de produtos da linhagem *K. phaffii* XDH-HL em meio sintético e hidrolisado. Perfis cinéticos de consumo de glicose (alaranjado) e xilose (verde), produção de biomassa celular (roxo) e AX (azul), e concentração de ácido acético (marrom) da linhagem XDH-HL em meio contendo hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar 30% v/v (A) e em meio sintético (B).

O consumo total de xilose e os rendimentos do processo foram determinados a partir de balanço de massa, considerando as quantidades totais de substrato consumido ao longo do cultivo. A produção de AX apresentou rendimento mais elevado e próximo do máximo teórico quando conduzida em meio contendo hidrolisado (Tabela 11). Por outro lado, a maior concentração final de AX e produtividade volumétrica foram observados em meio sintético (Tabela 11).

Tabela 11. Balanço de substratos e parâmetros de desempenho do cultivo de *K. phaffii* XDH-HL em batelada alimentada, em meio sintético e meio contendo hidrolisado, após 120 h.

Condição	Glicose total adicionada (g)	Xilose total adicionada (g)	Xilose consumida (g)	Ácido xilônico (g/L)	r_p (g/L.h)	$Y_{AX/X}$ (g/g)
YP contendo hidrolisado	6,14 ± 0,36	49,27 ± 0,98	4,17 ± 0,57	5,56 ± 0,35	0,05 ± 0,00	1,02 ± 0,05
YP meio sintético	5,29 ± 0,57	53,86 ± 0,35	14,13 ± 3,97	14,92 ± 1,43	0,12 ± 0,01	0,76 ± 0,16

Os valores de produtividade e concentração final de AX em meio sintético foram 2,4 e 2,7 vezes superiores em relação aos obtidos em meio contendo hidrolisado, respectivamente. Isso porque meios sintéticos definem o potencial máximo da levedura em condições ótimas, ou seja, fora de condições inibitórias (HUANG et al., 2019; SMITH, RENSBURG e GORGENS, 2014). O hidrolisado lignocelulósico contém compostos inibidores que afetam o crescimento celular e desempenho produtivo (CANO et al., 2020; GUO et al., 2022; HUANG et al., 2021). Conseqüentemente, altas produtividades observadas em meios sintéticos são impactadas quando ocorre transferência para esses substratos (CANO et al., 2020; GUO et al., 2022).

A presença de xilose residual ao final do cultivo da *K. phaffii* XDH-HL em meio contendo hidrolisado a 30% já foi reportado em estudo publicado na literatura. A metabolização incompleta da xilose tem sido associada à presença de compostos inibitórios, especialmente o ácido acético, cuja concentração de 4,14 ± 0,02 g/L apresentou potencial para reduzir o consumo de açúcar (ALMEIDA et al., 2025). Além disso, os valores de produtividade volumétrica e concentração final de AX obtidos neste estudo foram inferiores aos previamente relatados para cultivos em hidrolisado a 30%, a partir da mesma linhagem, nos quais foram observados valores de 0,10 g/L.h e 8,80 g/L, respectivamente. Em contrapartida, o rendimento obtido neste trabalho (1,02 g/g) foi superior ao valor anteriormente reportado (0,84 g/g), indicando maior eficiência de conversão da xilose em produto (ALMEIDA et al., 2025).

A fase de batelada (0 – 24 h) apresentou maior eficiência na conversão de xilose em AX em comparação à fase de batelada alimentada. Durante a alimentação, a taxa de entrada de substrato excedeu a capacidade metabólica da levedura para consumo e

oxidação da xilose, resultando em produção praticamente nula do produto. Esse comportamento é consistente com o descrito na literatura para processos em batelada alimentada, nos quais a alimentação superior à capacidade metabólica compromete a eficiência do processo (HUNG et al., 2023; JOHNSON et al., 2013; STEIMANN et al., 2024). Esse efeito foi intensificado pela entrada progressiva de compostos inibitórios do hidrolisado, limitando ainda mais a atividade metabólica da linhagem. Assim, a estratégia de batelada alimentada adotada (alimentação de 600 mL em 24 h a fluxo constante de 25 mL/h), mostrou-se inadequada para maximizar a produção do ácido nesse sistema, especialmente quando hidrolisados lignocelulósicos são utilizados como substrato.

Para superar esses desafios, estratégias de desenvolvimento de bioprocessos podem ser exploradas em estudos futuros. A construção de modelos cinéticos e de fluxo metabólico permitem descrever o comportamento de um processo produtivo, estabelecer relações entre crescimento celular, consumo de substrato e formação do produto, bem como identificar possíveis gargalos metabólicos (HEINONEN et al., 2019; XIA et al., 2015). A partir do estabelecimento desses modelos, estratégias de alimentação podem ser implementadas em processos de batelada alimentada (HILLER et al., 2025; PARADA, PETTERSEN e BAR, 2019), de modo que a taxa de alimentação não exceda a capacidade de consumo de xilose pela levedura, contribuindo para a redução da xilose residual no meio e para a menor exposição celular a compostos tóxicos presentes no hidrolisado.

Portanto, os parâmetros físico-químicos previamente estabelecidos em meio sintético foram aplicados ao cultivo em hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar como substrato para a produção de AX pela linhagem *K. phaffii* XDH-HL. Nessas condições, o processo apresentou rendimento superior ao valor reportado na literatura. Esse resultado indica que, embora o processo produtivo em hidrolisado ainda apresente limitações quanto à produtividade volumétrica e ao acúmulo do produto, há potencial para aprimoramento do desempenho, visando à consolidação de uma rota sustentável para a produção de AX por linhagens recombinantes.

6. Conclusão

Em conclusão, este trabalho estabeleceu os parâmetros físico-químicos que favorecem a produção de AX por linhagens recombinantes de *K. phaffii*, sendo eles: concentração inicial de xilose de 40 g/L, pH 5,5, temperatura de 30 °C, concentração inicial de biomassa celular de 5 g/L e pO₂ de 10%. A aplicação simultânea dessas condições resultou em aumento da concentração de AX, da produtividade volumétrica e da produtividade específica.

Além disso, a produção de AX a partir de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar foi avaliada em cultivo em batelada alimentada, utilizando as condições previamente estabelecidas em meio sintético. Embora os valores de produtividade volumétrica e concentração final de AX tenham sido inferiores aos relatados na literatura, o rendimento obtido foi superior e próximo ao máximo teórico, indicando elevada eficiência na conversão do substrato em produto.

Dessa forma, os resultados demonstram que a definição criteriosa dos parâmetros físico-químicos representa um passo importante para a aplicação do processo em hidrolisados lignocelulósicos. Apesar das limitações ainda observadas, relacionadas à produtividade e ao acúmulo do produto, o estudo evidencia o potencial de aprimoramento do processo por meio de estratégias de desenvolvimento de bioprocessos, contribuindo para o avanço de rotas sustentáveis para a produção de ácido xilônico por linhagens recombinantes.

7. Referências bibliográficas

ALMEIDA, João Ricardo Moreira et al. *Komagataella phaffii* recombinante produtora de ácido xilônico e método para a produção de ácido xilônico a partir de xilose. IBR Patent INPI - BR102018001359

ALMEIDA, Isabela Castro et al. Xylonic Acid Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using an Engineered *Komagataella phaffii* Strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 197, p. 7389-7408, 2025. DOI: 10.1007/s12010-025-05398-8

AN, Yejin et al. Comparative analysis of yeast cell viability at exponential and stationary growth phases. **Analytical science e technology**, v. 35, p. 181-188, 2022. DOI: 10.5806/AST.2022.35.4.181

ASHOKKUMAR, Veeramuthu et al. Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts - A critical review. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126195, 2022. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126195

ASLAN, Christian et al. Novel Study of Reaction Kinetics and Mass Transfer in Bioreactor Modelling: Prediction of Bioethanol Fermentation Performance by *Saccharomyces cerevisiae* on Continuous Fixed Bed Biofilm Plug Flow Reactor. **Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis**, v. 19, p. 668-691, 2024. DOI: 10.9767/bcrec.20230

ATA, Özge et al. A single Gal4-like transcription factor activates the Crabtree effect in *Komagataella phaffii*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4911, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-07430-4

BACHOSZ, Karolina et al. Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration. **Bioorganic Chemistry**, v. 93, p. 102747, 2019. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.01.043

BANU, J. Rejesh et al. Lignocellulosic biomass based biorefinery: A successful platform towards circular bioeconomy. **Fuel**, v. 302, p. 121086, 2021. DOI: 10.1016/j.fuel.2021.121086

BARONE, Giovanni Davide et al. Industrial Production of Proteins with *Pichia pastoris*— *Komagataella phaffii*. **Biomolecules**, v. 13, n. 3, p. 441, 2023. DOI: 10.3390/biom13030441

BAUMANN, Kristin et al. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. **MC Systems Biology**, v. 4, p.141, 2010. DOI: 10.1186/1752-0509-4-141

BISSON, Linda F; FAN, Qingwen; WALKER, Gordon A. Sugar and Glycerol Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 892, p. 125-168, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-25304-6_6

BONDAR, Maryna; FONSECA, Manuela; CESARIO, Teresa. Xylonic acid production from xylose by *Paraburkholderia sacchari*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 170, p. 107982, 2021. DOI: 10.1016/j.bej.2021.107982

BRABANDER, Pieter De et al. Challenges and progress towards industrial recombinant protein production in yeasts: A review. **Biotechnology Advances**, v. 64, p. 108121, 2023. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2023.108121

BUCHERT, Johanna et al. Comparison of *Pseudomonas fragi* and *Gluconobacter oxydans* for production of xylonic acid from hemicellulose hydrolyzates. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 367-372, 1988. DOI: 10.1007/BF00268197

CANO, Aaliyah et al. Characterization of pectinase-producing *Saccharomyces cerevisiae* UCDFST 09-448 and its effects on cull peach fermentations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, p. 51, 2024. DOI: 10.1093/jimb/kuae037

CANO, Enrique-Cubas. et al. Assessment of different *Bacillus coagulans* strains for L-lactic acid production from defined media and gardening hydrolysates: Effect of lignocellulosic inhibitors. **Journal of Biotechnology**, v. 323, p. 9-16, 2020. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.07.017

CAO, Rou et al. Comparison of various organic acids for xylo-oligosaccharide productions in terms of pKa values and combined severity. **Biotechnology for biofuels**, v. 14, n. 1, p. 69. DOI: 10.1186/s13068-021-01919-9

CARNEIRO, Clara Vida Galvão Corrêa et al. Advances in *Komagataella phaffii* Engineering for the Production of Renewable Chemicals and Proteins. **Fermentation**, v. 8, p. 575, 2022. DOI: 10.3390/fermentation8110575

CARNEIRO, Clara Vida G. C. et al. Engineering *Komagataella phaffii* for ethylene glycol production from xylose. **AMB Express**, v. 14, p. 131, 2024. DOI: 10.1186/s13568-024-01795-0

CHANDEL, Anuj Kumar et al. The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. **Bioresource Technology**, v. 264, p. 370-381, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.06.004

CHENG, Cheng et al. Association of improved oxidative stress tolerance and alleviation of glucose repression with superior xylose-utilization capability by a natural isolate of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p. 28, 2018. DOI: 10.1186/s13068-018-1018-y

CREGG, James M.; CEREGHINO, Joan Lin; SHI, Jianying; HIGGINS, David R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Molecular biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23-52. DOI: 10.1385/MB:16:1:23

DAS, Duttatreya. Towards net-zero petrochemicals: Assessment of technology options and policy for decarbonizing steam cracking in India. **Energy and Climate Change**, v. 6, p.100220, 2025. DOI: 10.1016/j.egycc.2025.100220

DETCOMPHO, Kanjana et al. Mathematical Modeling of Citric Acid Production and Microbial Growth Kinetics Using *Aspergillus niger* in Batch Fermentation. **E3S Web of Conferences**, v. 679, p. 01026, 2025. DOI: 10.1051/e3sconf/202567901026

DEV, Chandra; JILANI, Syed; YAZDANI, Shams. Adaptation on xylose improves glucose– xylose co-utilization and ethanol production in a carbon catabolite repression (CCR) compromised ethanologenic strain. **Microbial Cell Factories**, v. 21, p. 154, 2022. DOI: 10.1186/s12934-022-01879-1

DONG, Cancan. et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for high-efficiency production of branched-chain amino acids -enriched single-cell protein. **Bioresource Technology**, v. 444, p. 133988, 2026. DOI: 10.1016/j.biortech.2026.133988

EISSAZADEH, Samira et al. Production of recombinant human epidermal growth factor in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Industrial Microbiology**, v. 48, p. 286-293, 2017. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.017

FERREIRA, Isabela S.; ALARCÓN, Miguel A.D.; Roberto, Ines C. Efficient 2G Ethanol Production via Optimized Dilute Acid Pretreatment, High-Solids Enzymatic Hydrolysis, and High Temperature Fermentation. **ACS Mega**, v. 11, p. 3518-3528, 2026. DOI: 10.1021/acsomega.5c11192

GALBE, Mats; WALLBERG, Ola. Pretreatment for biorefineries: a review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, p. 294, 2019. DOI: 10.1186/s13068-019-1634-1

GAMISANS, Marius et al. Redox Engineering by Ectopic Overexpression of NADH Kinase in Recombinant *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*): Impact on Cell Physiology and Recombinant Production of Secreted Proteins. **Applied and Environmental**, v. 86, p. e02038-19, 2020. DOI: 10.1128/AEM.02038-19

GASSET, Arnau et al. Innovative Bioprocess Strategies Combining Physiological Control and Strain Engineering of *Pichia pastoris* to Improve Recombinant Protein Production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022. DOI:10.3389/fbioe.2022.818434

GUO, Hongliang et al. Enzymes and enzymatic mechanisms in enzymatic degradation of lignocellulosic biomass: A mini-review. **Bioresource Technology**, v. 367, p. 128252, 2023. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.128252

GUO, Hongliang et al. Inhibitor formation and detoxification during lignocellulose biorefinery: A review. **Bioresource Technology**, v. 361, p. 127666, 2022. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127666

GUO, Zhong-peng; OLSSON, Lisbeth. Physiological responses to acid stress by *Saccharomyces cerevisiae* when applying high initial cell density. **FEMS yeast research**, v. 16, n. 7, p. fow072, 2016. DOI: 10.1093/femsyr/fow072

HAHN-HAGERDAL, Barbel et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937-953, 2007. DOI: 10.1007/s00253-006-0827-2

HAN, Jian. et al. A novel bio-based water reducer for concrete application: Facile process and techno-economic analysis of xylonate bioproduction from lignocellulosic residues. *Journal of Cleaner Production*, v. 460, p. 142623, 2024. DOI: 10.1016/j.jclepro.2024.142623

HEINONEN, Markus et al. Bayesian metabolic flux analysis reveals intracellular flux couplings. **Bioinformatics**, 10.1093/bioinformatics/btz315 v. 35, p. 548-557, 2019. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz315

HEISTINGER, Lina et al. Genotypic and phenotypic diversity among *Komagataella* species reveals a hidden pathway for xylose utilization. **Microbial cell factories**, v. 21, n. 1, p. 70, 2022. DOI: 10.1186/s12934-022-01796-3

HEISTINGER, Lina; GASSER, Brigitte; MATTANOVICH, Diethard. Microbe Profile: *Komagataella phaffii*: A methanol devouring biotech yeast formerly known as *Pichia pastoris*. **Microbiology**, v. 166, n. 7, p. 614-616, 2020. DOI: 10.1099/mic.0.000958

HERRERA, Christiane Ribeiro Janner et al. Engineering *Zymomonas mobilis* for the Production of Xylonic Acid from Sugarcane Bagasse Hydrolysate. **Microorganisms**, v. 9, p. 1372, 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9071372

HILLER, Eric et al. Model-based process design for surfactin production with *Bacillus subtilis*. **AMB Express**, v. 15, p. 179, 2025. DOI: 10.1186/s13568-025-01978-3

HOLMES, William J et al. Developing a scalable model of recombination protein yield from *Pichia pastoris*: the influence of culture conditions, biomass and induction regime. **Microbial Cell Factories**, v.8, p. 35, 2009. DOI: 10.1186/1475-2859-8-35

HUANG, Jiamin et al. Fed-Batch Strategy Achieves the Production of High Concentration Fermentable Sugar Solution and Cellulosic Ethanol from Pretreated Corn Stover and Corn Cob. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, p. 12306, 2024. DOI: 10.3390/ijms252212306

HUANG, Kaixuan et al. A Precise Method for Processing Data to Determine the Dissociation Constants of Polyhydroxy Carboxylic Acids via Potentiometric Titration. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 183, n. 4, p. 1426-1438, 2017. DOI: 10.1007/s12010-017-2509-1

HUANG, Shiyong et al. A Review of the Recent Developments in the Bioproduction of Polylactic Acid and Its Precursors Optically Pure Lactic Acids. **Molecules**, v. 26, p. 6446, 2021. DOI: 10.3390/molecules26216446

HUANG, Shuangcheng et al. Enhanced ethanol production from industrial lignocellulose hydrolysates by a hydrolysate-cofermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain.

Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 42, p. 883-896, 2019. DOI: 10.1007/s00449-019-02090-0

HUNG, Yueh et al. Adapted feeding strategies in fed-batch fermentation improve sugar delivery and ethanol productivity. **Bioengineered**, v. 14, p. 2250950, 2023. DOI: 10.1080/21655979.2023.2250950

HUMMEL, Michael et al. Acidity and Lactonization of Xylonic Acid: A Nuclear Magnetic Resonance Study. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 29, n. 8-9, p. 416-428, 2010. DOI: 10.1080/07328303.2011.567424

JAGTAP, Sujit Sadashiv; RAO, Christopher V. Microbial conversion of xylose into useful bioproducts. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, p. 9015-9036, 2018. DOI: 10.1007/s00253-018-9294-9

JAYAKUMAR, Mani et al. Bioethanol production from agricultural residues as lignocellulosic biomass feedstock's waste valorization approach: A comprehensive review. **Science of the Total Environment**, v. 879, p. 163158, 2023. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.163158

JI, Hao et al. Sequential Production of D-xylonate and Ethanol from Non-Detoxified Corn cob at Low-pH by *Pichia kudriavzevii* via a Two-Stage Fermentation Strategy. **Journal of Fungi**, v. 7, p. 1038, 2021. DOI: 10.3390/jof/121038

JIANG, Meng et al. Tracing fossil-based plastics, chemicals and fertilizers production in China. **Nature communications**, v. 15, p. 3854, 2024. DOI: 10.1038/s41467-024 47930-0

JIN, Dongnv et al. Development of the synthesis and applications of xylonic acid: A mini-review. **Fuel**, v. 314, p. 122773, 2021. DOI: 10.1016/j.fuel.2021.122773

JOHNSSON, Ola et al. Feed Rate Control in Fed-Batch Fermentations Based on Frequency Content Analysis. **AIChE**, v. 29, p. 3, 2013. DOI: 10.1002/btpr.1727

KARAOGLAN, Mert et al. Identification of major ADH genes in ethanol metabolism of *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 37, p. 227-236, 2020. DOI: 10.1002/yea.3443

KARBALAEI, Mohsen; REZAEI, Seyed A; FARSIANI, Hadi. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 9, p 5867-5881. DOI: 10.1002/jcp.29583

KARHUMAA, Kaisa et al. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial cell factories**, v. 6, n. 5, p. 5, 2007. DOI: 10.1186/1475-2859-6-5

KEMITA, Leriane R.; SILVA, Leticia F.L.; PRATTO, Bruna. Optimizing dilute acid pretreatment for enhanced recovery and co-fermentation of hexose and pentose sugars for ethanol and butanol production. **Fuel**, v. 372, p. 132187, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2024.132187>

KIM, Jiwon; HWANG, Sungmin; LEE, Sun-Mi. Metabolic engineering for the utilization of carbohydrate portions of lignocellulosic biomass. **Metabolic Engineering**, v. 71, p. 2-12, 2022. DOI: 10.1016/j.ymben.2021.10.002

KIM, Saet et al. Alleviation of catabolite repression in *Kluyveromyces marxianus*: the thermotolerant SBK1 mutant simultaneously coferments glucose and xylose. **Biotechnology for Biofuels**, p. 12-90, 2019. DOI: 10.1186/s13068-019-1431-x

KOSTOPOULOU, Aliko et al. Impact of Oxygen Availability on the Organelle-Specific Redox Potentials and Stress in Recombinant Protein Producing *Komagataella phaffii*. **Microbial Biotechnology**, v. 18, p. e70106, 2025. DOI: 10.1111/1751-7915.70106

KURTZMAN, Cletus P. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 973-976, 2005. DOI: 10.1099/ijs.0.63491-0

KUSCHMIERZ, Laura et al. Workflows for optimization of enzyme cascades and whole cell catalysis based on enzyme kinetic characterization and pathway modelling. **Current opinion in Biotechnology**, v. 74, p. 55-60, 2022. DOI: 10.1016/j.copbio.2021.10.020

LIU, Huaiwei et al. High yield production of d-xylonic acid from d-xylose using engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 244-248, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.08.065

LOOSER, V. et al. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1177-1193, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.05.008

LU, Haiyan; ZHAO, Guoqing; LIU, Shaofeng. Integrating circular economy and Industry 4.0 for sustainable supply chain management: a dynamic capability view. **Production Planning & Control**, v. 35, n. 2, p. 170-186, 2022. DOI: 10.1080/09537287.2022.2063198

LV, Xuepeng et al. Short communication: Nutrient consumption patterns of *Lactobacillus acidophilus* KLDS 1.0738 in controlled pH batch fermentations. **Journal of dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5188-5194, 2017. DOI: 10.3168/jds.2017-12607

MACAULEY-PATRICK, Sue et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249-270, 2005. DOI: 10.1002/yea.1208

MANKAR, Akshay R. Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. **Bioresource Technology**, v. 334, p. 125235, 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125235

MAO, Xinlei. Overexpression of mGDH in *Gluconobacter oxydans* to improve d-xylonic acid production from corn stover hydrolysate. **Microbial Cell Factories**, p. 21-35, 2022. DOI: 10.1186/s12934-022-01763-y

MIKULSKI, Dawid.; KLOSOWSKI, Grzegorz. High-pressure microwave-assisted pretreatment of softwood, hardwood and non-wood biomass using different solvents in the production of cellulosic ethanol. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v.16, p.19, 2023. DOI: 10.1186/s13068-023-02272-9

MORAIS JUNIOR, Wilson et al. Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *Candida tropicalis* JA2 strain. **Yeast**, v, 5, p. 349-361, 2018. DOI: 10.1002/yea.3394

MORTLOCK, Robert P. The Development of Catabolic Pathways for the Uncommon Aldopentoses. **Microorganisms as Model Systems for Studying Evolution**, p. 109-134, 1984. DOI: 10.1007/978-1-4684-4844-3_4

MUJTABA, Muhammad et al. Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. **Journal of Cleaner Production**, v. 402, p. 136815, 2023. DOI: 10.1016/j.jclepro.2023.136815

NYGARD, Yvonne et al. Bioconversion of D-xylose to D-xylonate with *Kluyveromyces lactis*. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 383-391, 2011. DOI: 10.1016/j.ymben.2011.04.001

OPEC. **OPEC Monthly Oil Market Report**. [S. l.: s. n.], 2025.

ORTEGA, Xavier García et al. Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol-free GAP promoter. Where do we stand? **New BIOTECHNOLOGY**, v. 53, p. 24-34, 2019. DOI: 10.1016/j.nbt.2019.06.002

ORTEGA, Xavier G.; VALERO, Franco.; SEGUI, Jose L.M. Physiological state as transferable operating criterion to improve recombinant protein production in *Pichia Pastoris* through oxygen limitation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, p. 10, 2017. DOI: 10.1002/jctb.5272

PAES, Barbara G et al. Physiological characterization and transcriptome analysis of *Pichia pastoris* reveals its response to lignocellulose-derived inhibitors. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 2. DOI: 10.1186/s13568-020-01170-9

PARADA, Pedro A. L.; PETTERSEN, Even.; BAR, Fernando. P.G.N. The development of a fed batch *Corynebacterium glutamicum* fermentation model. **IFAC PapersOnLine**, v. 52, p. 231-237, 2019. DOI: 10.1016/J.IFACOL.2019.12.263

PARK, Jongbeom et al. Metabolic Engineering of *Komagataella phaffii* for Xylose Utilization from Cellulosic Biomass. **Molecules**, v. 29, n. 23, p. 5695, 2024. DOI: 10.3390/molecules29235695

PONTE, Xavier et al. Towards optimal substrate feeding for heterologous protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella* spp) fed-batch process under PAOX1 control: a modeling aided approach. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, p. 3208-3218, 2018. DOI: 10.1002/jctb.5677

PORNINTA, Kritsadaporn et al. Pretreatment and enzymatic hydrolysis optimization of lignocellulosic biomass for ethanol, xylitol, and phenylacetylcarbinol co-production using *Candida magnoliae*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2024. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1332185

QIAO, Yanming et al. Transporter engineering promotes the co-utilization of glucose and xylose by *Candida glycerinogenes* for d-xylonate production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 175, p. 108150, 2021. DOI: 10.1016/j.bej.2021.108150

QURESHI, Nasib et al. Can Xylose Be Fermented to Biofuel Butanol in Continuous Long-Term Reactors: If Not, What Options Are There? **Energies**, v. 16, p. 4945, 2023. DOI: 10.3390/en16134945

RAAD, Nicole et al. Transcriptome-Wide Analysis of Stationary Phase Small ncRNAs in *E. coli*. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 4, p. 1703. DOI: 10.3390/IJMS22041703

RAMOS, Talita GS et al. Xylonic acid production by recombinant *Komagataella phaffii* strains engineered with newly identified xylose dehydrogenases. **Bioresource Technology Reports**, v. 16, p. 100825, 2021. DOI: 10.1016/j.biteb.2021.100825

RAO, Jun et al. Hemicellulose: Structure, chemical modification, and application. **Progress in Polymer Science**, v. 140, p. 101675, 2023. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2023.101675

RAPOSO, Rodrigo S et al. A *Burkholderia sacchari* cell factory: production of poly-3-hydroxybutyrate, xylitol and xylonic acid from xylose-rich sugar mixtures. **New Biotechnology**, v. 34, p. 12-22, 2017. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.10.001

REBNEGGER, Corinna et al. Knock-out of the major regulator Flo8 in *Komagataella phaffii* results in unique host strain performance for methanol-free recombinant protein production. **New Biotechnology**, v. 84, p. 105-114, 2024. DOI: 10.1016/j.nbt.2024.10.001

RIAZ, Sana et al. Recent developments and emerging methodologies in the pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Sustainable Chemistry for the Environment**, v. 11, p. 100285, 2025. DOI: 10.1016/j.scenv.2025.100285

ROBAK, Katarzyna et al. Effect of dilute acid pretreatment on the saccharification and fermentation of rye straw. **Applied cellular physiology and metabolic engineering**, v. 35, p. 2789, 2019. DOI: Biotechnology Progress. 2019. DOI: 10.1002/btpr.2789

SANTOS, Beatriz et al. Biomass Sorghum: Effect of Acid, Basic and Alkaline Peroxide Pretreatments on the Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Production. **Engineering**,

Technology and Techniques, v. 64, p. e21200117, 2021. DOI: 10.1590/1678-4324-2021200117

SCHMIDEDER, Andreas et al. High-cell-density cultivation and recombinant protein production with *Komagataella pastoris* in stirred-tank bioreactors from milliliter to cubic meter scale. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 177-184, 2016. DOI: 10.1016/j.procbio.2015.11.024

SCHMIDELL, 2021. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2021.

SCHULER, Michael L.; KARGI, Fikret. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

SEVERINSEN, Manja Mølgaard et al. Efficient production of itaconic acid from the single-carbon substrate methanol with engineered *Komagataella phaffii*. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 17, n. 1, p. 98, 2024. DOI: 10.1186/s13068-024-02541-1

SINGLETON, Chloe et al. A design of experiments approach for the rapid formulation of a chemically defined medium for metabolic profiling of industrially important microbes. **PLoS One**, v. 14, p.6, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0218208

SMITH, Justin; RENSBURG, Eugene Van; GORGENS, Johann F. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. **BMC Biotechnology**, v.14, p. 41, 2014. DOI: 10.1186/1472-6750-14-41

SONG, Guojie et al. Dual assistance of surfactants in glycerol organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 395, p. 130358, 2024. DOI: 10.1016/j.biortech.2024.130358

STARINSKAYA, E.M et al. Evaporation of water/ethanol droplets in an air flow: Experimental study and modelling. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 177, p. 121502, 2021. DOI: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2021.121502

STEIMANN, Thomas et al. Avoiding overflow metabolite formation in *Komagataella phaffii* fermentations to enhance recombinant protein production. **Journal of Biological Engineering**, v. 18, p. 54, 2024. DOI: 10.1186/s13036-024-00453-0

SUNDAR, M. S. Lekshmi et al. Heterologous expression of genes for bioconversion of xylose to xylonic acid in *Corynebacterium glutamicum* and optimization of the bioprocess. **AMB Express**, p. 10, p. 83, 2020. DOI: 10.1186/s13568-020-01003-9

SUN, Lijing. et al. Metabolic and tolerance engineering of *Komagataella phaffii* for 2-phenylethanol production through genome-wide scanning. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 17, p. 107, 2024. DOI: 10.1186/s13068-024-02536-y

TAYPE, Miguel Angel Nieto et al. Continuous Cultivation as a Tool Toward the Rational Bioprocess Development With *Pichia pastoris* Cell Factory. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 632, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00632

TAYPE, Miguel Angel Nieto et al. Rationale-based selection of optimal operating strategies and gene dosage impact on recombinant protein production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). **Microbial biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 315-327, 2020. DOI: 10.1111/1751-7915.13498

TOIVARI, Mervi et al. Low pH D-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**, n. 133, p. 555-562, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.157

TOIVARI, Mervi et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of D-xylose to D-xylonate. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 4, p. 427-436, 2012. DOI: 10.1016/j.ymben.2012.03.002

TOIVARI, Mervi et al. Microbial D-xylonate production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, p. 1-8, 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-4288-5

TOIVARI, Mervi et al. *Saccharomyces cerevisiae* engineered to produce D-xylonate. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 751-760, 2010. DOI: 10.1007/s00253-010-2787-9

TRICHEZ, Débora et al. Recent progress in the microbial production of xylonic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 127, 2022. DOI: 10.1007/s11274-022-03313-5

TSACHAKI, Maroussa et al. Effect of Ethanol, Temperature, and Gas Flow Rate on Volatile Release from Aqueous Solutions under Dynamic Headspace Dilution Conditions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, p. 5308-5315, 2008. DOI: 10.1021/jf800225y

VALDEHUESA, Kris Niño G et al. Everyone loves na underdog: metabolic engineering of the xylose oxidative pathway in recombinant microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 7703-7716, 2018. DOI: 10.1007/s00253-018-9186-z

VILLEGAS, Mirelle Flores et al. Systematic sequence engineering enhances the induction strength of the glucose-regulated GHT1 promoter of *Komagataella phaffii*. **Synthetic Biology and Bioengineering**, v. 51, p. 11358-11374, 2023. DOI: 10.1093/nar/gkad752

WANG, Chenhong et al. Production of xylonic acid by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 23, p. 10055-10063, 2016. DOI: 10.1007/s00253-016-7825-9

WANG, Xiaolu et al. Metabolic engineering of *Komagataella phaffii* for synergetic utilization of glucose and glycerol. **Yeast**, v. 39, p. 412-421, 2022. DOI: 10.1002/yea.3793

WEI, F. et al. Engineering low pH-tolerant *Komagataella phaffii* for industrial-ready itaconic acid production via methanol biorefinery. **BioRxiv**, 2025. Preprint. DOI: 10.1101/2025.01.29.634982

WEI, Guodong et al. High cell density fermentation of *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 for glycolic acid production. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 1029-34. DOI: 10.1007/s10295-009-0584-1

YAMAKAWA, Celina et al. Advances and opportunities in biomass conversion technologies and biorefineries for the development of a bio-based economy. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 54-60, 2018. DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.09.007

YANG, Shihui et al. Insights into acetate toxicity in *Zymomonas mobilis* 8b using different substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 140, 2014. DOI: 10.1186/s13068-014-0140-8

YUSUF, Abdulfatah Abdu; INAMBAO, Freddie L. Bioethanol Production Techniques From Lignocellulosic Biomass As Alternative Fuel: A Review. **International Journal of Mechanical Engineering and Technology**, v. 10, p. 34-71, 2019. DOI: 10.34218/IJARET.10.3.2019.026

ZHANG, Guiying; BLOCK, David E. Using Highly Efficient Nonlinear Experimental Design Methods for Optimization of *Lactococcus lactis* Fermentation in Chemically Defined Media. **AIChE**, v. 25, p. 6, 2009. DOI: 10.1002/btpr.277

ZHOU, Hualan et al. Efficient expression of heterologous protein by engineered *Komagataella phaffii* by harnessing a bioelectrical CO₂ reduction system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 191, p. 108762, 2023. DOI: 10.1016/j.bej.2022.108762

ZHOU, Xin et al. Electrodialytic bioproduction of xylonic acid in a bioreactor of supplied oxygen intensification by using immobilized whole-cell *Gluconobacter oxydans* as biocatalyst. **Bioresource Technology**, v. 282, p. 378-383, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.042