



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação de Tecnologias Química e
Biológica

Fernanda Justen

Produção de Ácido Xilônico por *Komagataella phaffii*

Brasília – Distrito Federal

2017

Fernanda Justen

Produção de Ácido Xilônico por *Komagataella phaffii*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologias Química e Biológica.

Orientador: Dr. João Ricardo Moreira de Almeida

Brasília – Distrito Federal

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Fernanda Justen**, matrícula nº **15/0102526**, intitulada “***Produção de Ácido Xilônico por Komagataella phaffii***”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 20 de fevereiro de 2017.

Dr. João Ricardo Moreira de Almeida
Presidente de Banca (EMBRAPA Agroenergia)

Prof^ª. Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes
Membro Titular (IB/UnB)

Dra. Mônica Caremez Triches Damaso
Membro Titular (EMBRAPA Agroenergia)

Prof^ª. Dra. Lunalva Aurélio Pedroso Sallet
Membro Suplente (UNIPLAN)

Em 20 de fevereiro de 2017.

*Dedico esse trabalho à minha mãe Elizete,
ao meu pai Hélio Neri e aos meus irmãos
Bernardo e Humberto.*

Agradecimentos

A Deus e aos seres de luz, pelo dom da vida, por abençoar, iluminar e guiar meus passos nessa jornada.

À minha família, meu pai Hélio Neri e meus irmãos Bernardo e Humberto, que sempre me apoiaram incondicionalmente em todas as minhas decisões. Que foram o meu porto seguro e que sempre me deram forças para não desistir, mesmo nos momentos em que tudo parecia não dar certo. O apoio de vocês foi extremamente importante, sem o apoio de vocês não teria sido possível. Muito obrigada por tudo, por me permitirem voar! Amo vocês!

À minha mãe (in memoriam), que mesmo não estando mais presente neste plano, continua comigo no meu coração, dando o seu apoio para eu seguir em frente e não desistir diante dos obstáculos. Você sempre será o meu exemplo. Sempre te amarei.

À minha segunda família, tio Giovane, tia Lunalva e Léo, vocês foram extremamente importantes na minha jornada. Graças à oportunidade que vocês me deram de vir para Brasília, estou aqui hoje terminando mais uma etapa. Obrigada pelas oportunidades que vocês me proporcionaram e por todo o apoio. Amo vocês!

Ao meu amigo Tácio, que me apoiou nos mais diversos momentos, me acalmou e me incentivou a seguir em frente quando quis desistir; por me aguentar e por me fazer rir quando só queria chorar. Admiro-te muito e sempre faltarão palavras para expressar a minha gratidão. Muito obrigada pela sua paciência e pela sua amizade.

Aos meus colegas de Bancada, Henrique, Nathalia, Talita, Nadine, Romaira, Lunalva, Clara, Jéssica, Flávia, Victor, Carlos E., Bárbara, Débora, Paula P., Catarina, Samara, Carlos O., Ana C., Paula e Samantha, vocês são SEN-SA-CI-O-NAIS. Obrigada por todo apoio, por toda a ajuda, por me incentivarem a seguir em frente e não desistir diante das dificuldades. E claro pelos nossos happy hours. Não terei palavras suficientes para agradecê-los.

À *Flávia Soares*, sem você os resultados de quantificação não teriam sido possíveis. Obrigada por ter desenvolvido o método analítico, por ter mantido a calma mesmo quando eu chegava com 200 amostras. Você foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

A *todos os colegas de trabalho*, da Embrapa Agroenergia, pelas conversas de corredor, pela ajuda e apoio de vocês nas diversas etapas do trabalho desenvolvido. E também pela estrutura oferecida para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos *colegas de mestrado*, por me auxiliarem nas disciplinas e nas dúvidas que aparecerem ao longo do curso.

Aos *membros dos grupos “Bolsista CAPES” e “Pós-Graduação”*, por me fazerem rir com as suas 1001 postagens, por tirarem dúvidas e por me socorrerem com as regras da ABNT.

A *CAPES*, pela bolsa de mestrado, via Edital CAPES/Embrapa, a qual me permitiu continuar em Brasília e terminar a pesquisa. E ao *CNPq* pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa (404854/2013-3).

Ao *meu orientador João*, obrigada pela oportunidade de ter entrado no seu grupo de pesquisa e conhecer as pessoas maravilhosas que fazem parte dele, pela orientação, pela oportunidade de crescer profissionalmente, superando etapas que até eu desconhecia que seria capaz.

“Quando tudo parecer dar errado na sua vida, lembre-se que o avião decola contra o vento, e não a favor dele.”

(Henry Ford).

Resumo

Com a crescente necessidade de se utilizar fontes renováveis em complementação às fontes fósseis, e com o aumento do preço da glicose, o ácido xilônico surge como uma alternativa para substituição do ácido glucônico. O ácido xilônico, o qual pode ser produzido a partir de fontes não alimentares e de baixo custo, possui aplicações, como agente complexante, precursor de compostos como a co-poliâmida, hidrogéis, 1,2,4 – butanotriol e poliésteres. A produção do ácido xilônico em organismos como bactérias e arqueobactérias ocorre no primeiro passo do metabolismo oxidativo da xilose, através da ação da xilose desidrogenase ou da glicose oxidase. O ácido xilônico é produzido naturalmente em bactérias, leveduras e fungos, mas a produção em larga escala não foi desenvolvida, devido a demandas específicas de crescimento, principalmente para bactérias. Visando desenvolver um processo de produção de ácido xilônico, por expressão heteróloga, linhagens de *Komagataella phaffii* capazes de produzir ácido xilônico a partir de xilose foram construídas. Inicialmente, seis possíveis enzimas responsáveis pela conversão de xilose em ácido xilônico foram identificadas em banco de dados e nomeadas como AM, CO, MM, MN, TM e TR. Posteriormente, linhagens recombinantes de *K. phaffii* foram construídas pela expressão constitutiva dos possíveis genes de xilose desidrogenase sob controle do promotor pGAP (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase). As quatro linhagens obtidas foram avaliadas em diferentes condições de fonte de carbono e utilizando os meios de cultura FM22 e YNB. Somente as linhagens AM, CO e MN produziram ácido xilônico nos meios FM22 e YNB. A produção de ácido xilônico foi melhor com a linhagem MN tanto em meio YNB (máximo de 8,60 g/L) quanto em meio FM22 (máximo de 7,60 g/L), ambos contendo xilose e glicerol como fontes de carbono. A adição de glicerol ao meio de cultura favoreceu a produção de ácido xilônico em 5%. No entanto o melhor rendimento na produção de ácido xilônico foi da linhagem MN em meio YNB, utilizando xilose e glicerol como fontes de carbono. Os resultados obtidos demonstraram tanto a capacidade como o potencial de *K. phaffii* para produção de ácido xilônico a partir de xilose. Esta característica ainda não havia sido reportada na literatura, o que demonstra o ineditismo do trabalho desenvolvido.

Palavras-chave: ácido xilônico, *Komagataella phaffii*, xilose, glicerol.

Abstract

With the increasing need to use renewable sources in addition to fossil sources, and with the increase in the price of glucose, xylonic acid appears as an alternative to gluconic acid replacement. The xylonic acid, which can be produced from non-food sources and with low cost, has applications as complexing agent, precursor of compounds such as co-polyamide, hydrogels, 1,2,4-butanetriol and polyesters. The production of xylonic acid in organisms such as bacteria and archaeobacteria occurs in the first step of the oxidative metabolism of xylose through the action of xylose dehydrogenase or glucose oxidase. Xylonic acid is naturally produced in bacteria, yeast and fungi, but large-scale production has not been developed due to specific growth demands, especially for bacteria. Aiming to develop a process of production of xylonic acid, by heterologous expression, lines of *Komagataella phaffii* able to produce xylonic acid from xylose were constructed. Initially, six possible enzymes responsible for the conversion of xylose to xylonic acid were identified in the database and named as AM, CO, MM, MN, TM and TR. Subsequently, recombinant strains of *K. phaffii* were constructed by the constitutive expression of possible xylose dehydrogenase genes under control of the promoter pGAP (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). The four strains obtained were evaluated under different carbon source conditions and using FM22 and YNB culture media. Only the strains AM, CO and MN produced xylonic acid in the FM22 and YNB media. The production of xylonic acid was better with the MN strain in both YNB medium (8.60 g/L maximum) and FM22 medium (maximum 7.60 g/L), both containing xylose and glycerol as carbon sources. The addition of glycerol to the culture medium favored the production of xylonic acid in 5%. However, the best yield in the xylonic acid production was of the MN strain in YNB medium, using xylose and glycerol as carbon sources. The results obtained demonstrated both the ability and potential of *K. phaffii* to produce xylonic acid from xylose. This characteristic had not yet been reported in the literature, which demonstrates that it is an inedited finding.

Key words: xylonic acid, *Komagataella phaffii*, xylose, glycerol.

Lista de Figuras

Figura 1. Reações da produção de ácido xilônico a partir da xilose, pela via NAD(P) ⁺ ou pela via PQQ – dependente da glicose oxidase ou da xilose desidrogenase (adaptado de NYGÅRD, 2014).....	19
Figura 2: Estratégia utilizada para a produção de ácido xilônico por <i>Komagataella phaffii</i>	41
Figura 3. Análise eletroforética dos produtos de PCR dos genes de XDH.....	44
Figura 4: Análise eletroforética dos perfis de restrição dos genes de XDH no vetor T&A, com as enzimas <i>Eco RI</i> e <i>Xba I</i>	45
Figura 5. Análise eletroforética dos perfis de restrição dos genes de XDH no vetor pGAPZ B, com as enzimas <i>Eco RI</i> e <i>Xba I</i>	46
Figura 6: Produção de ácido xilônico pelas linhagens de <i>Komagataella phaffii</i> XDH-CO3 (A e B) e XDH-CO10 (C e D) em meio FM22 e YNB.....	53
Figura 7: Variação do pH nos meios FM22 (A e C) e YNB (B e D) para as linhagens XDH-CO3 (A e B) e XDH-CO10 (C e D) em <i>Komagataella phaffii</i>	54
Figura 8: Produção de ácido xilônico pelas linhagens de <i>Komagataella phaffii</i> XDH-AM1 (A e B) e XDH-AM10 (C e D) em meio FM22 e YNB.....	55
Figura 9: Variação do pH nos meios FM22 (A e C) e YNB (B e D) para as linhagens XDH-AM1 (A e B) e XDH-AM10 (C e D) em <i>Komagataella phaffii</i>	56
Figura 10: Produção de ácido xilônico pelas linhagens de <i>Komagataella phaffii</i> XDH-MN6 (A e B) e XDH-MN9 (C e D) em meio FM22 e YNB.....	57
Figura 11: Variação do pH nos meios FM22 (A e C) e YNB (B e D) para as linhagens XDH-MN6 (A e B) e XDH-MN9 (C e D) em <i>Komagataella phaffii</i>	58

Lista de Tabelas

Tabela 1. Linhagens mais utilizadas de <i>Komagataella phaffii</i> para engenharia metabólica. Adaptado de Batista, 2012.....	22
Tabela 2. Promotores utilizados e recentemente estabelecidos para a expressão em <i>Komagataella phaffii</i> . Adaptado de AHMAD, et al., 2014.....	24
Tabela 3. Sequência dos genes de xilose desidrogenase escolhidos.....	42
Tabela 4. Oligonucleotídeos desenhados para a amplificação dos genes de xilose desidrogenase e o tamanho esperado para as amplificações.....	43
Tabela 5. Produção de ácido xilônico em meio YNB + xilose 40 g/L.....	49
Tabela 6. Produção de ácido xilônico em meio YNB + xilose 40 g/L + glicerol 2 g/L	50
Tabela 7: Produção de ácido xilônico por linhagens construídas em <i>Komagataella phaffii</i> , no meio FM22 com diferentes fontes de carbono.....	51
Tabela 8: Produção de ácido xilônico por linhagens construídas em <i>Komagataella phaffii</i> , no meio YNB com diferentes fontes de carbono.....	52

Lista de Abreviaturas e Siglas

AOX1	álcool oxidase 1
AOX2	álcool oxidase 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
g	grama
<i>g</i>	força gravitacional
g/L	grama por litro
h	hora
<i>HIS4</i>	Histidina desidrogenase
kb	quilobase
LB	Luria-Bertani
M	molar
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
NAD(P) ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAD(P)H	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
OD ₆₀₀	densidade celular ótica medida a 600 nm
pb	par de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDA	<i>photodiode array</i>
pH	potencial hidrogeniônico
pGAP	gliceraldeído-3-P-desidrogenase
PQQ	pirroloquinolina quinona
p/v	parte por volume
RNAse A	ribonuclease A
rpm	rotações por minuto
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
v	volume
V	volts
v/v	volume por volume

<i>XDH</i>	Xilose desidrogenase
YNB	meio base de nitrogênio de leveduras
α	alfa
β	beta
%	porcentagem
°C	graus Celsius
μg	micrograma
μL	microlitro

Sumário

1.Introdução	16
1.1 Ácidos orgânicos.....	17
1.2 <i>Komagataella phaffii</i>	21
1.2.1 Vetores de expressão em <i>Komagataella phaffii</i>	22
1.2.2 Promotores.....	23
2.Justificativa	26
3. Objetivos	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. Materiais e Métodos	28
4.1 Materiais	28
4.1.1 Microrganismos.....	28
4.1.2 Vetores.....	28
4.1.3 Enzimas de Restrição.....	28
4.1.4 Ligase.....	29
4.1.5 Kits.....	29
4.1.6 Marcador Molecular.....	29
4.1.7 Meios de cultura.....	29
4.1.7.1 Meios para o cultivo de <i>Escherichia coli</i>	29
4.1.7.2 Meios para o cultivo de <i>Komagataella phaffii</i>	31
4.1.8 Soluções e Tampões.....	31
4.1.8.1 Extração de DNA plasmidial (midiprep caseira).....	31
4.1.8.2 Tampões.....	33
4.2 Métodos	33
4.2.1 Escolha das sequências de xilose desidrogenase.....	33
4.2.2 Cultivo de Bactéria <i>Escherichia coli</i>	34
4.2.3 Cultivo de <i>Komagataella phaffii</i>	34
4.2.4 Preparação de células bacterianas eletrocompetentes (Molecular Cloning).....	34
4.2.5 Amplificação das sequências de XDH.....	35
4.2.6 Ligação de fragmentos de DNA.....	35

4.2.7	Transformação bacteriana por eletroporação (Invitrogen).....	35
4.2.8	Preparação de DNA plasmidial (miniprep).....	36
4.2.9	Preparação de DNA plasmidial (midiprep).....	36
4.2.10	Digestão de DNA com enzimas de restrição.....	37
4.2.11	Análise eletroforética de amostras de DNA.....	37
4.2.12	Purificação de fragmentos de DNA.....	37
4.2.13	Precipitação de DNA com acetato de sódio.....	37
4.2.14	Transformação de <i>Komagataella phaffii</i>	37
4.2.15	Seleção de linhagens produtoras de ácido xilônico.....	38
4.2.16	Fermentação em meio mineral YNB.....	38
4.2.17	Fermentação em meio mineral FM22.....	39
4.2.18	Análise da produção de ácido xilônico por UPLC-PDA.....	39
5.	Estratégia	40
6.	Resultados	42
6.1	Escolha dos genes de xilose desidrogenase (XDH)	42
6.2	Amplificação dos genes de XDH.....	42
6.3	Clonagem dos genes de XDH no vetor T&A.....	44
6.4	Clonagem dos cinco genes de XDH no vetor constitutivo pGAPZ B.....	45
6.5	Transformação em <i>Komagataella phaffii</i>	47
6.6	Avaliação da produção de Ácido Xilônico pelas linhagens de <i>Komagataella phaffii</i> transformadas com os genes AM, CO, MM e MN.....	47
6.7	Produção de Ácido Xilônico em Meio Mineral.....	51
7.	Discussão	59
8.	Conclusão	62
9.	Perspectivas	63
10.	Referências Bibliográficas	64
11.	Anexos	69

1. Introdução

Atualmente, o crescimento da crise energética, as pressões ambientais (LI et al., 2015) e o crescimento populacional (GUPTA; VERMA, 2015) impulsionaram o interesse industrial por novas fontes de matéria-prima para complementar o uso de recursos fósseis. Os resíduos agroindustriais, principalmente os materiais lignocelulósicos apresentaram-se como possíveis fontes alternativas para a produção de compostos químicos, materiais e energia (CHANDEL et al., 2012; TOIVARI et al., 2013; LI et al., 2015), dentro do conceito de biorrefinaria. De fato, a utilização da biomassa lignocelulósica tem ganhado destaque nessa área, pois se apresenta como uma solução menos onerosa e com pouca concorrência com as fontes alimentares (ZHOU; XU; YU, 2016).

A biomassa lignocelulósica é formada pelos polímeros de celulose (40% - 50%), hemicelulose (25% - 35%), e pela macromolécula lignina (15% - 20%) (COLABARDINI et al., 2014; JORDAN et al., 2012). A celulose está presente na estrutura básica de todas as plantas e é constituída por homopolímeros de glicose que se ligam através de ligações β -D-glicosídicas (GOMES, 2015). Já a hemicelulose é um heteropolímero de estrutura amorfa, composta por pentoses como: D-xilose, L-ramnose e L-arabinose; hexoses: D-glucose, D-manose, D-galctose, e ácidos: ácido 4-O-metil-D-glucurônico e galacturônico (DRABER, 2013). A lignina é formada por compostos aromáticos, sendo as três subunidades principais, os alcoóis *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, que conferem rigidez e força ao tecido lenhoso (GOMES 2015; BOERJAN et al., 2003).

A composição e concentração dos açúcares variam nas diferentes biomassas, sendo a glicose (hexose) o açúcar mais abundante na natureza. Dentre as pentoses, a xilose é a mais abundante na natureza, chegando a 30% do total de açúcares em alguns resíduos agroindustriais, tais como o bagaço da cana-de-açúcar. (COLABARDINI et al., 2014; MATSUSHIKA et al., 2009).

A biomassa lignocelulósica tem sido testada para a produção de diversos produtos como etanol, xilitol e ácidos orgânicos. Ácidos orgânicos possuem

propriedades ácidas, contêm átomos de carbono e são caracterizados pela presença do grupo funcional (COOH). Também são largamente aplicados a dietas animais, facilitando a digestão de proteínas e diminuindo o pH estomacal. Os ácidos orgânicos derivados de açúcares tem gerado um interesse devido às suas perspectivas de aplicação em plataformas químicas e na produção de precursores, plásticos e copolíamidas (TOIVARI et al., 2012).

Neste trabalho, a levedura *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*) foi escolhida para ser modificada geneticamente para produção de ácido xilônico, pois apresenta tolerância a baixo pH, pode alcançar altas densidades celulares, facilidade de manipulação genética e naturalmente não consegue utilizar a xilose (INAN, 2001). Para tanto, genes de xilose desidrogenase foram identificados e expressos nessa levedura. As linhagens obtidas foram avaliadas quanto à sua capacidade de produção de ácido xilônico nos meios YNB e FM22. Três genes apresentaram atividade em *K. phaffii*. A linhagem MN atingiu a melhor produção de ácido xilônico em ambos os meios. Na literatura, ainda não existem relatos da produção de ácido xilônico por expressão heteróloga em *K. phaffii*, utilizando xilose como fonte de carbono, o que demonstra o ineditismo desse trabalho.

1.1 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são aqueles que contêm átomos de carbono e são os ácidos mais comuns com os quais convivemos. O maior grupo é o dos *ácidos carboxílicos*, que são os ácidos que possuem o grupo funcional carboxila (COOH) (FIORUCCI, et al., 2002). Os ácidos orgânicos possuem amplas e variadas aplicações: produzem acidez que retarda a degradação enzimática, atuam como agente quelante, inibidores de crescimento microbiano e aditivos alimentares. Dentre os ácidos mais conhecidos destacam-se o ácido cítrico (utilizado como acidulante, intensificador de sabor, antioxidante, agente tamponante e estabilizante), ácido acético (produção de vinagre), ácido láctico (síntese de polímeros, acidulante, intermediário na síntese de derivados utilizados pela indústria farmacêutica e alimentícia e polimerização em ácido polilático) e glucônico (amplamente utilizado na indústria de laticínios e fabricação de bebidas, prevenindo a formação de

precipitados, para realçar sabor e complexar traços de metais pesados) (CARVALHO, et al., 2005).

Outro ácido orgânico que tem ganhado destaque é o ácido xilônico proveniente da oxidação da xilose. Segundo o Departamento de Energia dos EUA, o Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL) e o Laboratório Nacional do Noroeste do Pacífico (PNNL), o ácido xilônico é um dos 30 produtos químicos desejáveis de ser produzido a partir de açúcares (TOIVARI et al., 2013; ZHOU et al., 2015). O ácido xilônico pode ser utilizado como agente de complexação ou quelante, na produção de hidrogéis, poliésteres, na produção de poliamidas, de dispersante de cimento, precursor da biosíntese de 1,2,4-butanotriol e de etileno glicol (TOIVARI et al., 2013, 2012; ZAMORA et al., 2000; ZHOU et al., 2015). Também tem sido utilizado na área da agricultura, alimentos e produtos farmacêuticos.

O ácido xilônico pode ser produzido a partir da oxidação microbiana da xilose, processo este reconhecido desde o fim do século XIX, e por métodos enzimáticos, eletroquímico ou por oxidação química (LI et al., 2007). Na reação por conversão microbiana, ocorre a oxidação da xilose em xilonolactona pela ação da enzima xilose desidrogenase (XDH) ou da enzima glicose oxidase. A xilonolactona é hidrolisada através da atuação da lactonase a ácido xilônico (Figura 1).

Nas bactérias *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Gluconobacter* e *Erwinia* a glicose desidrogenase da membrana periplasmática usa a pirroloquinolina quinona (PQQ), grupo prostético formado pela fusão de glutamato e tirosina (POOLE, 1998), para transferir os elétrons do citocromo c na cadeia respiratória, com um correspondente acúmulo de xilonolactona ou ácido xilônico no meio (GALAR; BOIARDI 1995). A xilonolactona acumulada é um produto intermediário da ação das desidrogenases, mas a lactona geralmente abre-se espontaneamente ou com o auxílio de uma lactonase (BUCHERT; VIKARI; 1988).

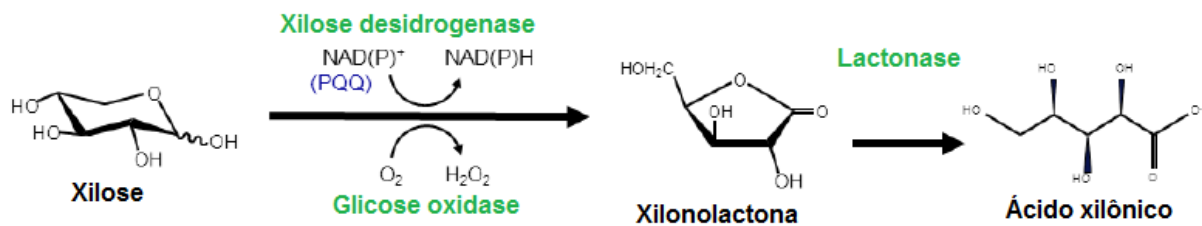


Figura 1. Reações de produção de ácido xilônico a partir da xilose, pela via NAD(P)⁺ ou pela via PQQ – dependente da glicose oxidase ou da xilose desidrogenase (adaptado de NYGÅRD, 2014).

Em *Gluconobacter oxydans* a xilose é oxidada para disponibilizar e formar xilonolactona, pela catálise da xilose desidrogenase (XDH), que está ligada a membrana citoplasmática. Os elétrons armazenados na coenzima (NADH/NAD(P)H) são transferidos para o oxigênio que é o aceptor terminal de elétrons da cadeia de respiração celular. O oxigênio é a força motriz da célula que executa as reações de oxidação, mantendo um processo de bioconversão contínuo para catalisar xilose a ácido xilônico (ZHOU et al., 2015).

G. oxydans apresenta altas taxas de conversão de xilose em ácido xilônico, mas sua produção tem sido limitada pelas exigências nutricionais de meio e baixa produção da biomassa, exigindo o desenvolvimento de um inóculo caro. Desta forma, dificultando a produção de ácido xilônico a partir da utilização de biomassa lignocelulósica (TOIVARI et al., 2012).

Baseado nos microrganismos que produzem naturalmente o ácido xilônico, vários outros têm sido modificados geneticamente para produção do ácido. Para tanto, genes codificantes de XDH de diferentes microrganismos como *Gluconobacter oxydans*, *Caulobacter crescentus*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Enterobacter cloacea* e espécies de *Pseudomonas* foram utilizados.

Inicialmente, foi realizada a engenharia da levedura *S. cerevisiae*, sendo utilizada a sequência da XDH NADP⁺ dependente, de *T. reesei*. A introdução de XDH resultou no aumento do consumo de xilose e reduziu a produção de xilitol, mas a produção de ácido xilônico foi de 1,2 g/L após 53 h de incubação. Os resultados desse trabalho mostraram que é possível a produção de ácido xilônico em leveduras, mas que ainda não é um processo competitivo com a produção por *G.*

oxydans e *P. fragi* (TOIVARI et al., 2010). Em *S. cerevisiae* também foi testado a produção de ácido xilônico utilizando a sequência de xilose desidrogenase originária de *Caulobacter crescentus*, e a co-expressão da xilonalactonase. A produção de ácido xilônico atingiu uma produção de ~0,8 g/L quando os dois genes estavam sendo expressos ao mesmo tempo e no meio contendo glicose e xilose (NYGARD, et al., 2014b).

Posteriormente foi realizada a modificação de *E. coli*, que utilizou a sequência de XDH originária de *C. crescentus*. A produção do ácido xilônico foi de 39 g L⁻¹. Este resultado foi superior quando comparado com a produção em *S. cerevisiae*. Um dos motivos para isso é o sistema de transporte dos microrganismos. *S. cerevisiae* não possui transportador específico para xilose, enquanto que *E. coli* consegue utilizar a xilose como única fonte de carbono (LIU et al., 2012).

Outra modificação genética foi a realizada com *P. kudriavzevii*, na qual foi inserida a sequência de XDH de *C. crescentus*. A produção de ácido xilônico foi de 171 g L⁻¹, com pH 5,5 e de 146 g L⁻¹ com pH 3,0, com rendimentos entre 1,2 – 1,4 g L⁻¹ h⁻¹. Portanto, os resultados obtidos foram superiores do que os alcançados por *G. oxydans*, e com o benefício de produzir eficientemente em baixo pH (TOIVARI et al., 2013).

Apesar de haver linhagens melhoradas geneticamente e com bons resultados para a produção do ácido xilônico, até o presente momento o mesmo não é produzido comercialmente, pois não existe um método estabelecido para tal (LIU et al., 2012). De acordo com Liu et al. (2012), o motivo pelo qual a produção de ácido xilônico não esteja disponível industrialmente é o fato das estirpes bacterianas produzirem também outras enzimas oxidantes. Estas enzimas resultam na conversão de outros componentes presentes nos hidrolisados lignocelulósicos e podendo-se, portanto produzir compostos indesejáveis.

1.2 *Komagataella phaffii*

Komagataella phaffii é classificada taxonomicamente como pertencente ao Reino *Fungi*, Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Ascomycotina*, Classe *Hemoascomycetes*, Ordem *Endomycetales*, Família *Saccharomycetaceae* e Subfamília *Saccharomycetoideae*. Esta levedura anteriormente era classificada como *Pichia pastoris* e foi reclassificada recentemente como pertencente ao gênero *Komagataella* (KURTZMAN, 2009).

É uma levedura metilotrófica, ou seja, capaz de crescer em metanol como única fonte de carbono. Em condições normais é uma levedura homotática e haploide vegetativa, quando ocorre limitação de nitrogênio o comportamento passa a ser diploide (ÇELIK; ÇALIK, 2012; GELLISSEN et al., 2005). A utilização de *K. phaffii* para a produção de ácido xilônico mostra-se interessante por vários fatores, a levedura apresenta alto rendimento e produtividade de proteínas heterólogas; as estirpes de produção são estáveis; crescimento em altas densidades celulares e com baixo pH; rápido crescimento em meios quimicamente definidos; e facilidade de manipulação genética;

Existem diversas linhagens de *K. phaffii* disponíveis (Tabela 1), o que permite uma escolha mais adequada para cada tipo de aplicação. As linhagens GS115 e SMD1168 possuem uma mutação para o gene de histidina desidrogenase (*HIS4*), gerando um fenótipo His⁻, permitindo a seleção de clones em meio sem histidina. Essas linhagens também apresentam a capacidade de utilizar o metanol como fonte de carbono, fenótipo Mut⁺. Este fenótipo cresce em metanol na mesma velocidade da linhagem selvagem, mas existem outros dois fenótipos: Mut⁻ e Mut^S. Mut⁻ não consegue utilizar metanol e Mut^S cresce em metanol mas numa velocidade lenta (SOUSA, 2011). A linhagem SMD1168 também é deficiente para a peptidase A (*pep4*), enzima responsável pela ativação da carboxipeptidase Y e protease B1. A linhagem MC100-3 não possui os genes que codificam para as enzimas álcool oxidase 1 (*AOX1*) e álcool oxidase 2 (*AOX2*), resultando num fenótipo Mut⁻ (DALY; HEARN, 2005). Já a linhagem X-33 é prototrófica e pode utilizar metanol como única fonte de carbono (KURTZMAN, 2009).

Tabela 1. Linhagens mais utilizadas de *Komagataella phaffii* para engenharia metabólica. Adaptado de Batista, 2012.

Linhagem	Genótipo	Fenótipo
GS115	<i>his4</i>	Mut ⁺ , His ⁻
MC100-3	<i>arg4 his4 aox1::ARG4</i>	Mut ⁻ , His ⁻
SMD1168	<i>aox2::his4</i> <i>His4, pep4</i> <i>arg4 his4</i>	Mut ⁺ , His ⁻ , pep4 ⁻
X-33	Prototrófica	Prototrófica

Apesar de estarem disponíveis várias linhagens de *K. phaffii* no mercado nenhuma delas consegue utilizar a xilose como única fonte de carbono para suas atividades metabólicas (INAN 2001). Necessitando que sejam desenvolvidas linhagens capazes de utilizar a xilose e que consigam ser agregadas a cadeias produtivas agroindustriais.

1.2.1 Vetores de expressão de *Komagataella phaffii*

Os vetores de expressão para *K. phaffii* são geralmente plasmídeos integrativos que contém: 1) Sequências regulatórias (promotores), induzíveis ou constitutivos, que são reconhecidas pela célula hospedeira; 2) Marca de seleção auxotrófica (ex: *HIS4*, *MET2*, *ADE1*, *URA3*, *URA5*) ou dominante; 3) Sítios múltiplos de restrição para clonagem; 4) Elementos genéticos para manipulação e propagação em *E. coli*; 5) Sequências terminadoras de transcrição de levedura; (AHMAD, et al., 2014; NETO, 2012).

Alguns vetores também podem conter: sinal de secreção, que é uma sequência que codifica um peptídeo sinalizador que direciona a exportação das proteínas para o meio extracelular (por exemplo: os sinais de secreção fosfatase ácida (*PHO1*) e o fator alfa (α -MF)); sequências *tag* (His6 ou myc), favorecem a purificação e a identificação da proteína heteróloga; e sequência 5" e 3" do gene *AOX1*, orientam a integração do plasmídeo para este *locus* (Invitrogen EUA, manual *Pichia expression kit*; BETANCUR, 2014; LI et al., 2007).

Até o presente momento poucos plasmídeos foram desenvolvidos para *K. phaffii*, sendo a maioria destes pela empresa Invitrogen (EUA). Os vetores desenvolvidos inicialmente para transformação em *Komagataella* foram desenvolvidos baseados no promotor forte do gene *AOX1* (álcool oxidase 1), que é induzido por metanol. Um dos vetores mais utilizados é o pPIC9, que apresenta o gene *HIS4*, utilizado como marca de seleção de transformantes. Este vetor também apresenta o gene de resistência a ampicilina e o promotor induzível P_{AOX1} . Outro vetor induzível é o pPICZ α (da série pPICZ) que possui elementos que facilitam a expressão como: sequência do promotor *AOX1*, induzível por metanol; sequência com múltiplos sítios de clonagem; sinal de secreção do fator α ; marca de resistência a zeocina (*Sh ble*); região terminadora da transcrição do gene *AOX1*; e peptídeo C-terminal que contém epitopo do anticorpo anti-*myc* e uma cauda His_{6x} (BATISTA, 2012).

Além desses promotores induzíveis, outros plasmídeos com promotores constitutivos se tornaram disponíveis. Dentro destes alguns vetores possuem o promotor *GAP* que direciona a expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Este vetor foi criado para substituir o promotor *AOX1*, que é induzido por metanol.

1.2.2 Promotores

Os promotores empregados nos vetores de *K. phaffii* podem ser induzíveis ou constitutivos (Tabela 2). Apesar da grande disponibilidade de promotores, os promotores induzíveis são mais utilizados (LI et al., 2007), e são baseados no promotor do gene *AOX1*. A regulação do P_{AOX1} é realizada pela presença de metanol e pela ausência de outra fonte de carbono como a glicose, glicerol ou etanol. A transcrição de sua proteína é regulada pelo mecanismo de repressão/desrepressão (LI et al., 2007). A transcrição da proteína é fortemente reprimida na presença de glicose, e em menor grau, glicerol ou etanol. E na ausência de fontes de carbono ocorre uma desrepressão da transcrição. Na presença de metanol ocorre uma forte indução da transcrição (BATISTA, 2012).

Os promotores constitutivos representam uma alternativa para o promotor P_{AOX1} , pois não utilizam metanol para a sua expressão, diminuindo a toxicidade. Dentre estes promotores constitutivos destacam-se P_{GAP} (gliceraldeído 3-fosfato

desidrogenase), P_{PGK1} (3-fosfoglicerato quinase) e P_{TEF1} (fator 1- α de alongação da tradução) (WATERHAM et al. 1997; ALMEIDA, 2005, BATISTA, 2012). Estes promotores apresentam a vantagem de não necessitar de metanol para a indução e de não necessitar da troca de fonte de carbono, barateando os custos e tornando o processo menos trabalhoso (BETANCUR, 2014; BATISTA, 2012; CEREGHINO & CREGG, 2000). O promotor P_{GAP} é ativo na presença de glicose ou glicerol. Segundo estudos realizados por Almeida *et al* (2005) o promotor P_{PGK1} proporcionou elevada expressão quando utilizado para dirigir a expressão da α -amilase de *Bacillus subtilis* em glicose, glicerol e metanol.

Além desses, vários outros promotores têm sido descobertos e avaliados na produção de proteínas heterólogas em *K. phaffii*. As principais características desses são resumidas na Tabela 2.

Tabela 2. Promotores utilizados e recentemente estabelecidos para a expressão em *Pichia pastoris*. Adaptado de AHMAD, et al., 2014.

Promotor induzível	Gene correspondente	Regulação	Referência
AOX1	Álcool oxidase	Indução por metanol	TSCHOPP et al., 1987
DAS	Dihidroxiacetona sintase	Indução por metanol	Ellis et al. 1985; Tschopp et al. 1987
FLD1	Formaldeído desidrogenase 1	Indução por metanol ou metalamina	Shen et al. 1998
ICL1	Isocitrato liase	Reprimido por glicose, induzido na ausência de glicose, pela adição de etanol	Menendez et al. 2003
PHO89	Na+/ fosfato simportes putativo	Indução após inanação do fosfato	Ahn et al. 2009
THI11	Gene da biossíntese de tiamina	Reprimido por tiamina	Stadlmayr et al. 2010
ADH1	Álcool	Reprimido por glicose e	Cregg and Tolstorukov

	desidrogenase	metanol, indução por glicerol e etanol	2012
ENO1	Enolase	Reprimido por glicose, metanol e etanol, induzido por glicerol	Cregg and Tolstorukov 2012
GUT1	Glicerol kinase	Reprimido por metanol, induzido por glicose, glicerol e etanol.	Cregg and Tolstorukov 2012
Promotor constitutivo	Gene correspondente	Regulação	Referência
GAP	Gliceraldeído-3-P desidrogenase	Expressão constitutiva por glicose, em menor grau com glicerol e metanol	Waterham et al. 1997
TEF1	Fator 1 de alongamento da tradução	Expressão constitutiva por glicerol e glicose	Ahn et al. 2007
PGK1	3-fosfatoglicerato kinase	Expressão constitutiva por glicose e em menor grau por glicerol e metanol	de Almeida et al. 2005
GCW14	Potencial glicosil fosfadil inositol (GPI) – proteína de ancoração	Expressão constitutiva por glicerol, glicose e metanol	Liang et al. 2013b
G1	Transportador de glicose de alta afinidade	Reprimido por glicerol, induzido após a limitação por glicose	Prielhofer et al. 2013
G6	Aldeído desidrogenase putativo	Reprimido por glicerol, induzido após a limitação por glicose	Prielhofer et al. 2013

2. Justificativa

Atualmente, devido às várias mudanças, em âmbito mundial, nos cenários econômico, político e populacional, houve um aumento do interesse industrial por novas fontes de matérias-primas para complementar o uso de recursos fósseis. Os materiais lignocelulósicos apresentam-se como uma das possíveis fontes alternativas.

A biomassa lignocelulósica tem sido testada para a produção de diversos produtos de valor agregado como xilitol e ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos derivados de açúcares têm gerado interesse devido às suas perspectivas de aplicação industrial. Os açúcares utilizados para a produção destes ácidos são extraídos da biomassa lignocelulósica, a qual é composta além das hexoses, pelas pentoses xilose e arabinose. A utilização da xilose no processo de fermentação é uma das dificuldades enfrentadas para que o mesmo seja implantado em nível industrial, pois é utilizada ineficientemente pelos microrganismos e seu processo de fermentação em leveduras continua sendo menos eficiente do que o da glicose.

Alguns microrganismos conseguem fermentar a xilose naturalmente, tais como *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, e outros estão sendo modificados como *Saccharomyces cerevisiae*, *K. lactis* e *Escherichia coli*.

Neste trabalho, a levedura *Komagataella phaffii* foi escolhida para ser modificada para produção de ácido xilônico. Esta escolha baseou-se nas características diferenciadas que esta levedura possui, tais como: tolerância a baixo pH, altas densidades celulares, facilidade de manipulação genética e naturalmente não consegue utilizar a xilose. Para tanto, genes de xilose desidrogenase foram identificados, clonados e as linhagens obtidas foram selecionadas e avaliadas quanto a sua capacidade de produção de ácido xilônico. Até o momento, não foi encontrado na literatura trabalhos nos quais, *Komagataella phaffii* é capaz de utilizar a xilose e produzir ácido xilônico.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Produzir ácido xilônico em *Komagataella phaffii*.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar e clonar os genes de xilose desidrogenase no vetor T&A e posteriormente no vetor constitutivo pGAPZ B;
- b) Expressar em *Komagataella phaffii* os genes de xilose desidrogenase.
- c) Avaliar a produção de ácido xilônico pelas linhagens construídas e o efeito do mesmo sobre o pH.
- d) Avaliar o efeito de diferentes meios de cultura na produção de ácido xilônico por *Komagataella phaffii*.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Microrganismos

- ***Escherichia coli* linhagem XL10-Gold® (Stratagene)**

Tet^rΔ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r].

É uma linhagem ultracompetente utilizada para a transformação de moléculas de DNA grande e com alta eficiência.

- ***Komagataella phaffii* linhagem X-33 (Invitrogen®)**

Genótipo do tipo prototrófica, utilizada para selecionar vetores resistentes à zeocina.

4.1.2 Vetores

- **T&A cloning RBC (Real-biotech)**

Vetor utilizado para a clonagem de produtos de PCR os quais utilizam TaqDNA Polimerase capaz de adicionar a terminação A ao final da sequência. Também permite a seleção de clones por coloração azul/branco e resistentes à ampicilina.

- **pGAPZ B (Invitrogen®)**

Vetor constitutivo de expressão de proteínas recombinantes em *Komagataella phaffii*, possui o tamanho de 2.9 kb (Anexo 1).

4.1.3 Enzimas de Restrição

As enzimas de restrição *Avr* II, *Bsp* HI, *Eco* RI (Fast Digest) e *Xba* I (Fast Digest) foram fornecidas pela Thermo Scientific e utilizadas conforme sugestões do fabricante.

4.1.4 Ligase

T4 DNA Ligase (Invitrogen®) – utilizada conforme o fabricante.

4.1.5 Kits

- **PCR clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel)** – utilizado para purificar bandas de gel.
- **PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification COMBO kit (Invitrogen)** – utilizado para purificação de produtos de PCR.
- **GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific)** – utilizado para purificação de pequenas quantidades de amostras.
- **QIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kit (Quiagen®)** – utilizado para purificação de grandes quantidades de amostras plasmidiais.

4.1.6 Marcador Molecular

GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) – (Anexo 2)

4.1.7 Meios de cultura

Os meios de cultura e soluções foram preparados com água destilada e esterilizados em autoclave por 20 min à 120°C.

4.1.7.1 Meios para o cultivo de *Escherichia coli*

- Meio LB (Luria-Bertani)

Peptona	10 g/L
NaCl	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L

O pH foi ajustado para 7,0.

- Meio LB Low Salt

Triptona	10 g/L
----------	--------

NaCl	5 g/L
Extrato de levedura	5 g/L

O pH foi ajustado para 7,5.

- Meio LB Low Salt ágar

Triptona	10 g/L
NaCl	5 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Ágar	15 g/L

O pH foi ajustado para 7,5.

- Meio SOB

Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	0,5 g/L
KCl (250 mM)	10 mL
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

O pH do meio foi ajustado para 7,0 antes de ser esterilizado. Foram feitas as soluções de MgCl₂ e MgSO₄ na concentração de 100 mM e filtradas. Após o meio ser esterilizado, as soluções foram adicionadas para uma concentração final de 10 mM.

- Meio SOC

Meio SOB	100 mL
Glicose	20 mL

A solução de glicose foi preparada na concentração de 1 M e filtrada. Após o meio ser esterilizado a solução foi adicionada para uma concentração final de 20 mM.

- GYT

Glicerol (P.A – Dinâmica)	10 % (v)v
---------------------------	-----------

Extrato de levedura	0,125 % (w/v)
Triptona	0,25 % (w/v)

Esterilizar o meio utilizando um filtro 0,22 μm e armazenar em alíquotas de 2,5 mL, a 4°C.

4.1.7.2 Meios e soluções para o cultivo de *Komagataella phaffii*

- Meio YPD

Peptona	20 g/L
Glicose	20 g/L
Extrato de levedura	10 g/L

- Meio YPD ágar

Peptona	.20 g/L
Glicose	.20 g/L
Extrato de levedura	.. 10 g/L
Ágar	15 g/L

- Meio YPDS ágar

Peptona	20 g/L
Glicose	20 g/L
Extrato de levedura	10 g/L
Sorbitol	1 M
Ágar	15 g/L

- YNB 10X

YNB (sem aminoácido e sulfato de amônio)	17 g/L
Sulfato de amônio	50 g/L

- Meio FM22 adaptado

KH_2PO_4	42,9 g/L
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	5,0 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0 g/L
K_2SO_4	14,3 g/L

MgSO ₄ .7H ₂ O	11,7 g/L
Biotina	0,02 % (p/v)

Após o meio ser esterilizado o pH foi ajustado para 5,0. As soluções de fonte de carbono (glicerol ou xilose) foram adicionadas após a autoclavagem de acordo com a concentração necessária. Glicerol (P.A – Dinâmica) foi preparado na concentração de 800 g/L e a xilose (P.A – Sigma) 200 g/L.

4.1.8 Soluções e Tampões

4.1.8.1 Extração de DNA plasmidial (midiprep caseira)

- **Solução 1***

Glicose	50 mM
Tris HCl (pH 8,0)	25 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM
H ₂ O	Até completar o volume

* Armazenar a solução a 4°C após ser esterilizada.

- **Solução 2***

NaOH	0,2 M
SDS	1 %

*Preparar na hora

- **Solução 3***

Acetato de potássio	5 M
Ácido acético glacial	10 %
H ₂ O	Até completar o volume

* Armazenar a solução a 4°C após ser esterilizada..

- **Acetato de Potássio 5 M**

Acetato de potássio	490,75 g/L
---------------------	------------

- **TE**

Tris HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM
H ₂ O	Até completar o volume

- **STE**

NaCl	0,1 M
Tris HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM
H ₂ O	Até completar o volume

4.1.8.2 Tampões

- **Tampão KH₂PO₄ para fase móvel de UPLC-PDA**

KH ₂ PO ₄	1,36 g
H ₂ O	Completar o volume para 1000 mL

Pesar diretamente num balão volumétrico de 1000 mL 1,36 g de KH₂PO₄, completar o volume para 1000 mL e diluir. Ajustar o pH para 2,0 utilizando ácido fosfórico 85%.

- **Tampão SB**

Ácido bórico	51 g
Hidróxido de sódio	8 g
H ₂ O	Completar o volume para 1000 mL

4.2 Métodos

4.2.1 Escolha das sequências de xilose desidrogenase

A escolha das sequências possivelmente codificadoras de xilose desidrogenase foi baseada numa busca realizada no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Nessa busca utilizaram-se sequências cuja expressão já é conhecida e que conseguem converter xilose a ácido xilônico. Para fungos utilizou-se a sequência de *Trichoderma reesei* e para bactérias de *Caulobacter*

crescentus. Baseado nas árvores filogenéticas geradas com essas sequências bases escolheu-se sequências que possuíam uma identidade proteica entre 40 e 70%, que ainda não tinham sido descritas na literatura como produtoras de ácido xilônico.

4.2.2 Cultivo de Bactéria *Escherichia coli*.

As bactérias foram cultivadas em frascos erlenmeyer, contendo meio LB e ampicilina, a 37°C e 180 rpm, por 16 h de incubação.

4.2.3 Cultivo de *Komagataella phaffii*

Leveduras foram cultivadas em frascos erlenmeyer aletados, contendo meio YPD e zeocina, a 28°C e 200 rpm, por 16 h de incubação.

4.2.4 Preparação de células bacterianas eletrocompetentes (Molecular Cloning)

Células de *E.coli* XL10-Gold foram espalhadas em uma placa com meio LB, a partir de um estoque armazenado no ultrafreezer, a -80°C, e incubadas a 37°C por 16 h. Uma colônia isolada foi inoculada em um frasco erlenmeyer de 100 mL, contendo 10 mL de meio LB, posteriormente incubada a 37°C, sob uma agitação de 180 rpm, durante a noite. Cinco mililitros do pré-inóculo foram inoculados em 200 mL de meio LB, em um frasco erlenmeyer de 1 L e incubado a 37°C, sob uma agitação de 180 rpm até atingir uma densidade ótica lida a 600 nm ($O.D_{600nm}$) de 0,4. Ao atingir a $O.D_{600nm}$ a cultura foi resfriada por 15 min no gelo e posteriormente as células foram centrifugadas a 1000 x *g* por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 200 mL de H₂O milli-Q gelada. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições e ressuscitadas em 200 mL de glicerol 10 % gelado. Posteriormente, as células foram centrifugadas nas mesmas condições e ressuscitadas em 10 mL de glicerol 10 % gelado. Novamente as células foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores e ressuscitadas em 1 mL de GYT. Finalmente, foram preparadas alíquotas de 80 µL em tubos de 0,2 mL, com uma concentração de ~2 x 10 cells/mL e armazenadas em ultrafreezer, a -80°C.

4.2.5 Amplificação das sequências de XDH

As reações de PCR foram constituídas de: 1X de tampão de reação; 0,2 mM de cada dNTP; 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 μM de *primer forward* e *reverse*; 10 ng de DNA template e 1 unidade da Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). As condições de reação foram: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos (desnaturação inicial); 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação) seguido de 30 segundos a 52°C ou 55°C (anelamento) e seguido de 1 minuto a 72°C (extensão); 1 ciclo de 72°C por 10 minutos (extensão final). Para os genes CO, MM, MN e TM a temperatura de anelamento utilizada foi de 52°C e para os genes AM e TR foi de 55°C.

4.2.6 Ligação de fragmentos de DNA

Os sistemas de ligação foram feitos em um volume total de 20 μL e com uma razão entre vetor e inserto de 1:3 e 1:5. Para a ligação dos produtos de PCR dos genes de XDH com o vetor T&A foi utilizado o kit da RBC Cloning Systems – T&A Clonning kit (Real-biotech) e os sistemas foram incubados de acordo com a indicação do fabricante.

A ligação dos fragmentos de XDH ao vetor pGAPZ B foi realizada utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante e incubada a 22°C por 40 minutos.

4.2.7 Transformação bacteriana por eletroporação (Invitrogen)

Para realizar a transformação foi utilizada uma alíquota (80 μL) de células eletrocompetentes armazenadas à -80°C, para cada sistema de ligação. As cubetas de eletroporação (0,1 cm de gap) devidamente identificadas foram incubadas no gelo. As células foram descongeladas no gelo e foi adicionado 10 μL do sistema de ligação. Em seguida as células foram transferidas para uma cubeta e submetidas a choque elétrico com uma voltagem de 1800 V, capacitância 25 μF e resistência de 200 Ω. Foi adicionado 1 mL de meio LB ao sistema e incubado a 37°C por 1 h. As células foram plaqueadas em meio LB ágar contendo o antibiótico adequado (ampicilina 100 μg/mL ou zeocina 25 μg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por

16 h. Quando foi utilizado o antibiótico zeocina o meio utilizado foi o LB Low Salt. E quando se utilizou o vetor T&A foi adicionado ao meio X-gal e IPTG.

4.2.8 Preparação de DNA plasmidial (miniprep)

Para a obtenção dos plasmídeos em pequena quantidade utilizou-se o kit da Thermo Scientifics (GeneJET Plasmid Miniprep Kit) e seguiu-se as orientações do fabricante.

4.2.9 Preparação de DNA plasmidial (midiprep)

As células foram cultivadas em 100 mL de meio LB com o antibiótico adequado. Uma colônia transformante foi inoculada e incubada a 37°C por 16 horas. A cultura foi centrifugada a 3000 x *g* por 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 100 mL de solução STE gelada. As células foram novamente centrifugadas a 3000 x *g* por 15 min a temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspendido em 5 mL de solução I, no vórtex. Adicionou-se 5 mL da solução II e incubou-se por 10 min no gelo, misturando lentamente por inversão. Adicionou-se 7,5 mL de solução III e incubou-se por 20 min no gelo. O tubo foi homogeneizado invertendo o tubo com cuidado. As células foram coletadas a 10000 x *g* por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições. Novamente transferiu-se o sobrenadante para outro tubo e adicionou-se 0,6 v de isopropanol. Incubou-se por 10 min à temperatura ambiente. As células foram centrifugadas a 12000 x *g* por 20 min à temperatura ambiente. Lavou-se o *pellet* com etanol 70% e secou-o a temperatura ambiente. O *pellet* seco foi ressuspenso em até 500 µL de H₂O ou TE. Adicionou-se RNase na concentração final de 2 µg/mL e incubou-se à 37°C por 20 min. Purificar o plasmídeo em coluna e armazena-lo à -20°C até o uso.

Para a obtenção dos plasmídeos em grande quantidade para a transformação em *Pichia pastoris* utilizou-se o kit da Quiagen (QIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kit).

4.2.10 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões foram realizadas seguindo as instruções dos fabricantes de cada enzima. A quantidade de enzima era ajustada ao volume de DNA a ser digerido.

4.2.11 Análise eletroforética de amostras de DNA

As amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose. Os géis eram preparados na concentração de 0,8% de agarose, em tampão SB 1X e com brometo de etídeo na concentração de 0,5 µg/mL. Após serem aplicadas, as amostras foram submetidas a uma corrente elétrica e visualizadas através da exposição do gel à luz ultravioleta.

4.2.12 Purificação de fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA retirados do gel foram purificados com o kit PCR clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel) seguindo as orientações do mesmo.

Já os produtos de PCR foram purificados com o kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification COMBO kit (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante.

4.2.13 Precipitação de DNA com acetato de sódio

Para retirar os sais da digestão o DNA foi precipitado adicionando 2,5 volumes de etanol 100% gelado e acetato de sódio para uma concentração final de 0,3 M, e incubado por 16 h à -20°C. A suspensão foi centrifugada por 30 min a 15000 x *g*. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 70%, centrifugando por 30 min a 15000 x *g*. Ressuspender o *pellet* em 10 µL de H₂O milli-Q e armazenar a -20°C até o uso.

4.2.14 Transformação de *Komagataella phaffii*

A levedura foi transformada segundo o protocolo descrito no EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen, EUA). Em resumo, uma colônia de *Komagataella phaffii* foi inoculada em 5 mL de YPD, incubada a 30°C por 16 h e sob agitação de

200 rpm. Foi inoculado o volume do pré-inóculo necessário para atingir uma OD_{600} de 1,3, nas mesmas condições. A cultura foi coletada e centrifugada a $1500 \times g$ por 5 min à 4°C . O pellet foi ressuspensionado em 200 mL de água milli-Q gelada. As células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições e o *pellet* foi ressuspensionado em 100 mL de água milli-Q gelada. Novamente as células foram centrifugadas e posteriormente ressuspensionadas em 20 mL de sorbitol 1 M. A seguir as células foram centrifugadas e ressuspensionadas em 1 mL de sorbitol 1 M. 80 μL de células foram separados e adicionados 5 – 10 μg de DNA linearizado, transferidos para uma cubeta de eletroporação e incubadas por 5 min no gelo. As células foram eletroporadas nas seguintes condições: 1500 V, 400 Ω , e 25 μF , imediatamente foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M e transferidas para um tubo de 15 mL. Incubou-se por 2 h a 30°C . Plaqueou-se em meio YPD e com antibiótico específico e incubou-se de 2-3 dias à 30°C .

4.2.15 Seleção de linhagens produtoras de ácido xilônico

Foram inoculadas 10 colônias de cada gene de XDH e uma colônia da linhagem X-33 de *K. phaffii*, para controle negativo. Cada colônia foi inoculada em um poço da placa deep well, de 2 mL, contendo meio YNB 2X, glicerol 40 g/L e zeocina. Incubou-se por 16 h, a 28°C e com uma agitação de 150 rpm. Posteriormente, as células foram coletadas centrifugando a placa por 15 minutos a 1500 rpm. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet, sendo a metade superior da placa ressuspensionada em meio YNB 1X + xilose 40 g/L + glicerol 2g/L + zeocina. E a metade inferior, ressuspensionada em meio YNB 1X + xilose 40 g/L + zeocina. Incubar por 96 h a 28°C e com uma agitação de 150 rpm. Coletou-se uma alíquota a cada 24 h para posterior análise por UPLC-PDA.

4.2.16 Fermentação em meio mineral YNB

Uma colônia de levedura foi pré-inoculada em 5 mL de meio contendo YNB 2X + glicerol 40 g/L com o antibiótico adequado e incubou-se a 200 rpm, 28°C e por 16 h. Posteriormente, essa cultura foi inoculada em 150 mL de meio YNB 1X + glicerol 40 g/L com antibiótico adequado e incubou-se com uma agitação de 200 rpm, a 30°C por 48 h. As células foram coletadas com centrifugação de 1500 rpm

por 15 min. O pellet foi lavado com água destilada esterilizada e posteriormente centrifugado nas mesmas condições. O *pellet* foi ressuspendido em 10 mL de água destilada e medido a $O.D_{600}$ para iniciar o experimento com uma densidade celular de 10. Os inóculos foram realizados em meio contendo YNB e diferentes fontes de carbono (40 g/L de xilose ou 40 g/L de xilose + 2 g/L de glicerol), biotina e zeocina 100 µg/mL. Incubou-se por 100 h, a 28°C, com uma agitação de 200 rpm e coletou-se 3 pontos diários para serem posteriormente analisados por UPLC-PDA e aferido o pH.

4.2.17 Fermentação em meio mineral FM22

Fermentação realizada nas mesmas condições da fermentação com o meio contendo YNB (item 4.2.15). O meio contendo YNB foi substituído pelo meio FM22.

4.2.18 Análise de ácido xilônico por UPLC-PDA

As amostras de ácido xilônico foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (UPLC – do inglês high performance liquid chromatography) (Waters, modelo UPLC Acquity PDA), o qual utilizou o detector fotodiodo de varredura (PDA, do inglês photodiode array). As condições de análise das amostras foram: coluna HSS T3 (1,8 µm; 2,1 x 150 mm); fase móvel, solvente A (Tampão KH_2PO_4 , 0,01 M, pH 2,0), solvente B (MeOH); fluxo 0,3 mL/min; volume da injeção 1 µL; temperatura da coluna 30°C e temperatura ambiente para as amostras.

5. Estratégia

A estratégia utilizada nesse projeto está resumida esquematicamente na Figura 2. Para esse trabalho foi proposto a construção de linhagens de *Komagataella phaffii* capazes de produzir ácido xilônico a partir de xilose.

Inicialmente as sequências de *XDH* foram selecionadas e enviadas para serem sintetizadas. As sequências vieram da empresa de síntese sem o STOP códon e para solucionar esse problema foi realizado PCR (reação em cadeia da polimerase). Para o PCR utilizou-se oligonucleotídeos específicos para cada sequência e que introduziram os sítios de restrição para *Eco RI* e *Xba I*. Posteriormente, as sequências foram clonadas no vetor T&A. Após a confirmação da clonagem, as bandas referentes aos fragmentos esperados foram subclonados no vetor pGAPZ B, que previamente tinha sido digerido com as enzimas de restrição *Eco RI* e *Xba I*.

As colônias transformantes resultantes para os genes AM, CO, MM e MN foram purificadas, linearizadas com as enzimas *Avr II* e *Bsp HI* e transformadas em *Komagataella phaffii*. A fim de testar os transformantes para a produção de ácido xilônico realizou-se um screening em meio contendo YNB suplementado com fontes de carbono, e o sobrenadante foi avaliado por UPLC-PDA. As linhagens AM, CO e MN apresentaram um resultado positivo e foram testadas em frascos erlenmeyer com meio mínimo YNB e FM22, no qual também apresentaram a produção de ácido xilônico.

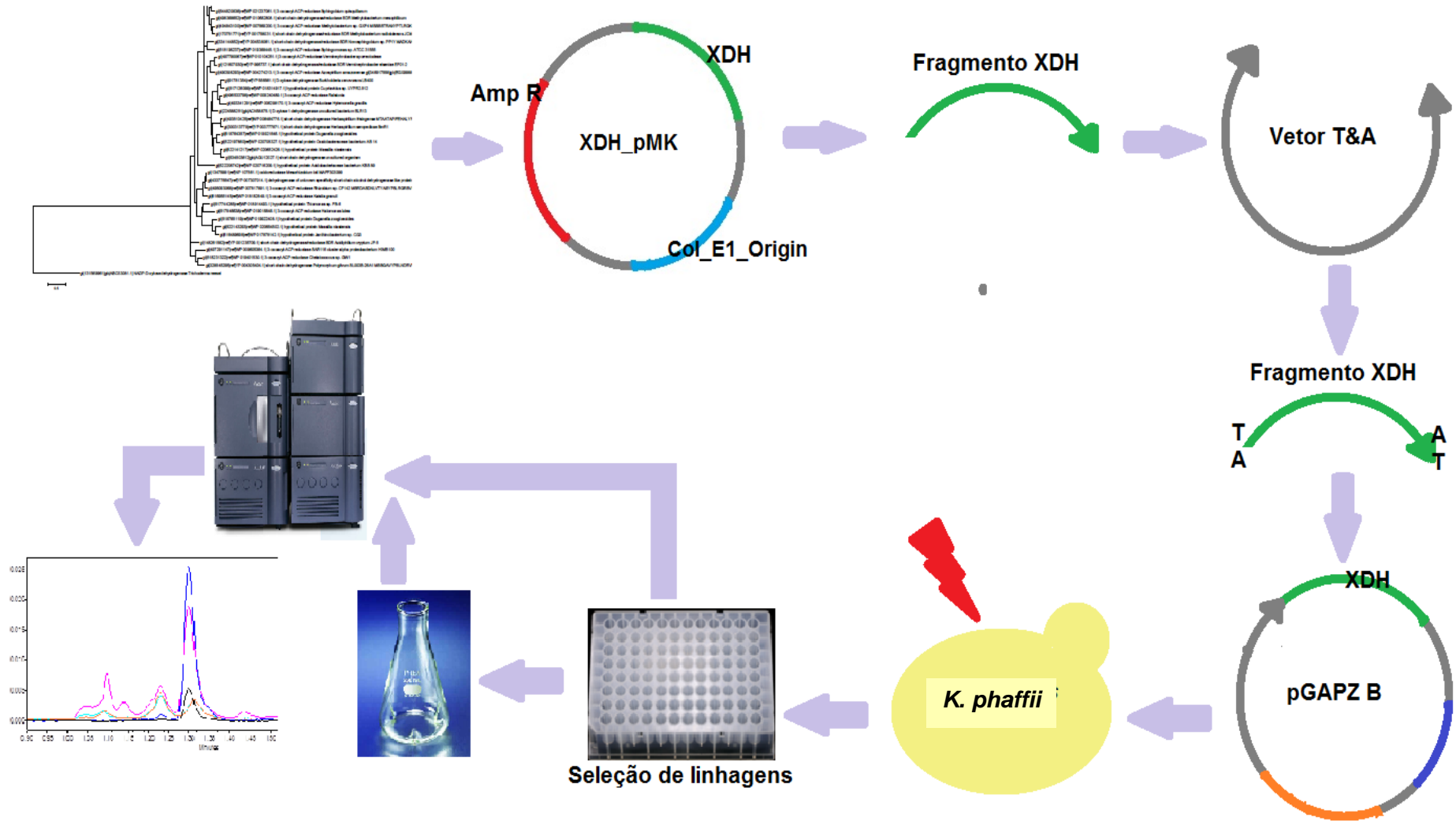


Figura 2: Estratégia utilizada para a produção de ácido xilônico por *Komagataella phaffii*.

6. Resultados

6.1 Escolha dos genes de xilose desidrogenase (XDH)

A escolha da sequência dos possíveis genes codificadores de xilose desidrogenase utilizados nesse trabalho estão listados na Tabela 3. Dos microrganismos escolhidos três são de origem fúngica (*Colletotrichum orbiculare*, *Togninia mínima* e *Trichoderma reesei*) e três de origem bacteriana. (*Azospirillum amazonense*, *Methylobacterium mesophilicum* e *Massilia niastensis*)

Após a escolha das sequências as mesmas foram renomeadas e enviadas para serem sintetizadas(Tabela 3).

Tabela 3. Sequência dos genes de xilose desidrogenase selecionados.

Microrganismo	Abreviatura	Tamanho da proteína (N. de aa)	Identidade proteica
<i>Azospirillum amazonense</i> Y2	XDH-AM	265	50%
<i>Colletotrichum orbiculare</i> MAFF 240422	XDH-CO	393	65%
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	XDH-MM	258	42%
<i>Massilia niastensis</i>	XDH-MN	267	50%
<i>Togninia minima</i> UCRPA7	XDH-TM	391	68%
<i>Trichoderma reesei</i>	XDH-TR	391	-

6.2 Amplificação dos genes de XDH

Com base na sequência dos genes de xilose desidrogenase escolhidos para este trabalho (XDH-AM, XDH-CO, XDH-MM, XDH-MN, XDH-TM e XDH-TR), oligonucleotídeos foram desenhados para a amplificação dos mesmos (Tabela 4). Os genes foram amplificados por PCR para clonagem no vetor T&A, pois os genes vieram da empresa sem o STOP códon. Como mostrado na Figura 3, as

amplificações dos produtos de PCR estavam de acordo com o tamanho esperado para todos os seis genes. O gene MN com tamanho de 825 pb, AM com 819 pb, TR e TM com 1197 pb, MM com 798 pb e CO com 1203 pb.

Tabela 4. Oligonucleotídeos desenhados para a amplificação dos genes de xilose desidrogenase e o tamanho esperado para as amplificações.

Primer	Sequência (5' - - - 3')	Tamanho esperado
XDH-AM-F	CAGAATTCGGATCCATGGGTAAGCCA	
XDH-AM-R	ATTCTAGAGTCGACTTATCTCCAACCAGC	819 pb
XDH-CO-F	CCAGAATTCGGATCCATGGCTCCAC	
XDH-CO-R	ATTCTAGAGTCGACTTAAGCGTTACCCAAG	1203 pb
XDH-MM-F	CAGAATTCGGATCCATGACTTCCACTC	
XDH-MM-R	ATTCTAGAGTCGACTTATCTCCAACCAGCG	798 pb
XDH-MN-F	CAGAATTCGGATCCATGTCCGACACTTC	
XDH-MN-R	ATTCTAGAGTCGACTTAAGCACCATAACCAAC	825 pb
XDH-TM-F	CCAGAATTCGGATCCATGGCTCCATAC	
XDH-TM-R	ATTCTAGAGTCGACTTACTTTCTACCAGTG	1197 pb
XDH-TR-F	CAGAATTCGGATCCATGGCTTCTGGTAAC	
XDH-TR-R	AATTCTAGAGTCGACTTACTGGTTACCAGTG	1197 pb

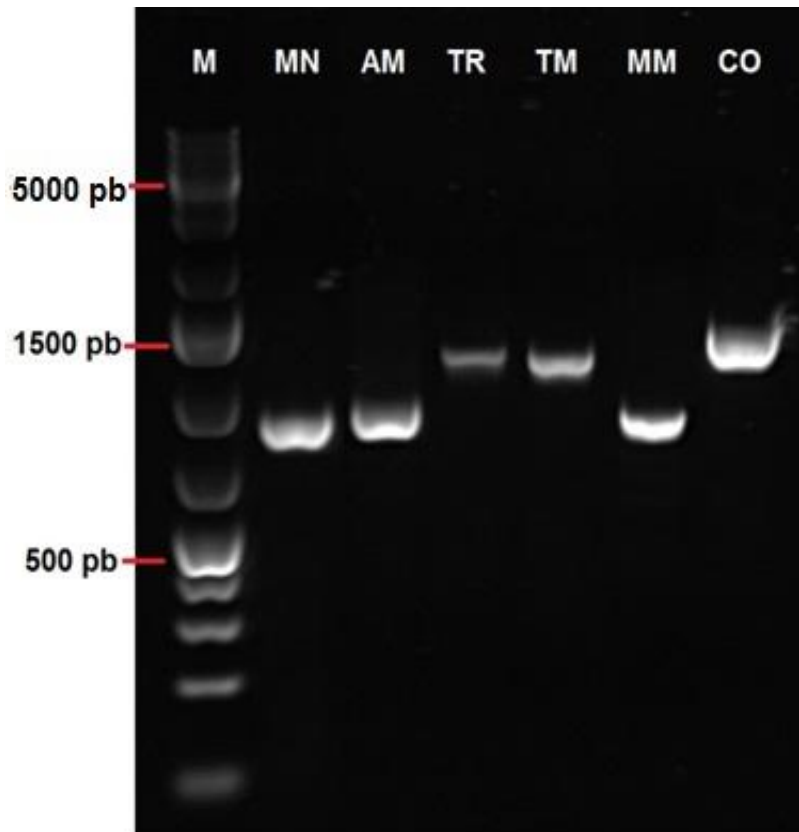


Figura 3. Análise eletroforética dos produtos de PCR dos genes de XDH. Eletroforese em gel 0,8% de agarose, corado com brometo de etídeo. M: marcador 1 kb Plus DNA Ladder, MN (XDH-MN, 825 pb), AM (XDH-AM, 819 pb), TR (XDH-TR, 1197 pb), TM (XDH-TM, 1197 pb), MM (XDH-MM, 798 pb) e CO (XDH-CO, 1203 pb).

6.3 Clonagem dos genes de *XDH* no vetor T&A

Os seis genes de XDH amplificados anteriormente por PCR foram purificados com o kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification COMBO kit (Invitrogen) e posteriormente ligados ao vetor T&A cloning RBC (Real-biotech). O sistema de ligação foi usado para transformar *E. coli* XL10-Gold por eletroporação. Colônias transformantes para os sistemas AM, CO, MM, MN e TM foram selecionadas para a extração de DNA plasmidial (miniprep – kit descrito no item 4.1.5 dos materiais e métodos). Para o sistema TR não foram obtidos transformantes, portanto não foi utilizada nas próximas etapas deste trabalho.

Os plasmídeos resultantes foram nomeados como XDH-AM+T&A, XDH-CO+T&A, XDH-MM+T&A, XDH-MN+T&A e XDH-TM+T&A e foram digeridos com as enzimas de restrição *Eco RI* e *Xba I* para a confirmação da inserção. Essas enzimas

possuem sítio de restrição no vetor T&A (Anexo 3) e nos genes inseridos, devendo liberar um fragmento de ~2.8 kb, referente ao plasmídeo e outro do tamanho do gene de interesse (Figura 4). Os cinco genes digeridos apresentaram colônias positivas. As bandas referentes a cada gene foram purificadas ao final.

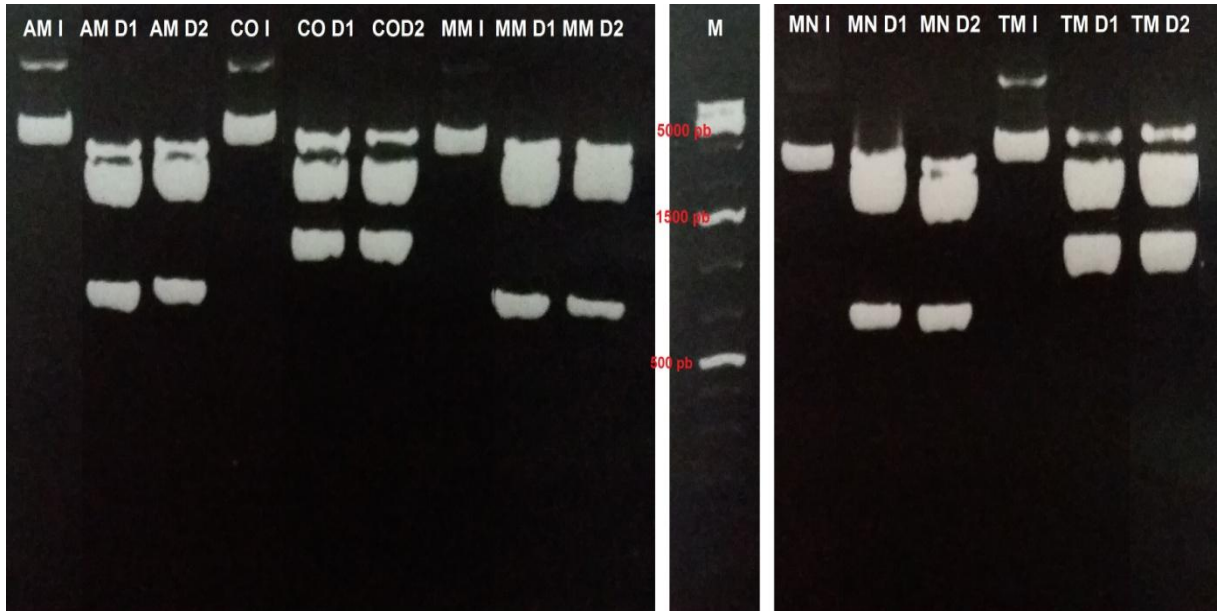


Figura 4: Análise eletroforética dos perfis de restrição dos genes de *XDH* no vetor T&A, com as enzimas *Eco RI* e *Xba I*. Eletroforese em gel 0,8% de agarose, corado com brometo de etídeo. Genes AM, CO, MM, MN e TM, I = intacto, D = digerido, 1, e 2 número das colônias selecionadas. M: marcador 1 kb Plus DNA Ladder.

6.4 Clonagem dos cinco genes de *XDH* no vetor constitutivo pGAPZ B

Para clonagem no vetor de expressão pGAP, tanto os genes de interesse (AM, CO, MM, MN e TM) como o vetor pGAPZ B foram digeridos com as enzimas *Eco RI* e *Xba I*, separados por eletroforese e os fragmentos retirados do gel e purificados para posterior ligação. Após a transformação dois clones de cada gene foram selecionados, purificados e digeridos com as enzimas *Eco RI* e *Xba I*, essa digestão foi realizada para verificar se havia ocorrido a inserção dos genes no vetor pGAPZ B (Figura 5). A clonagem foi correta para os cinco genes de *XDH* testados, mas para alguns genes a ligação necessitou ser repetida. Na Figura 5-A, apenas o gene CO apresentou colônia positiva e os genes AM e TM necessitaram ser repetidos. Na Figura 5-B, o gene MM apresentou o tamanho esperado e o sistema AM não apresentou recombinantes. Já na Figura 5-C foi o gene TM que apresentou

colônia positiva. Na Figura 5-D tanto o gene AM como o gene MN apresentaram colônias positivas. As colônias positivas referentes a cada gene foram purificadas com o kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) para futura linearização.

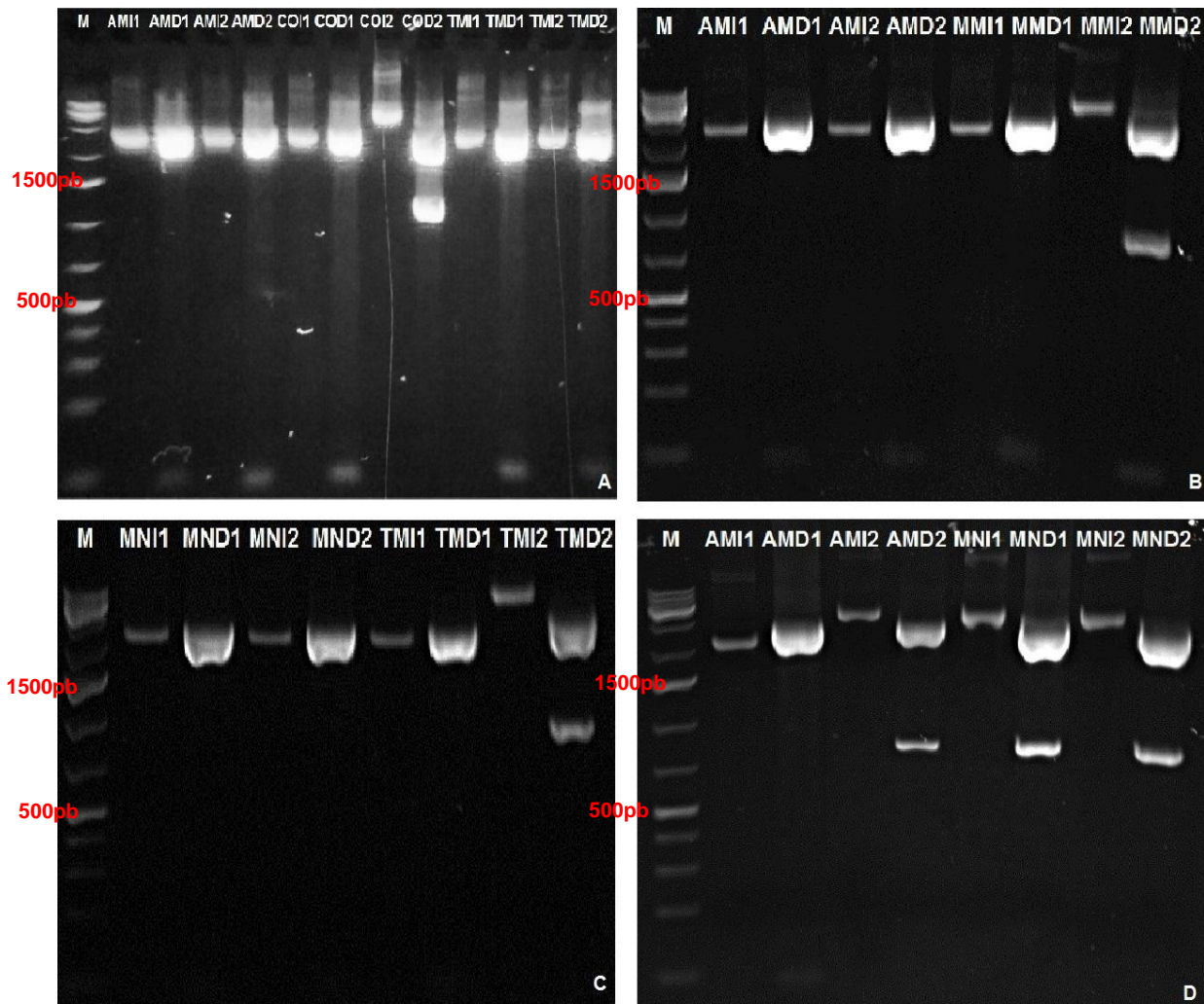


Figura 5. Análise eletroforética dos perfis de restrição dos genes de *XDH* no vetor pGAPZ B, com as enzimas *Eco RI* e *Xba I*. Eletroforese em gel 0,8% de agarose, corado com brometo de etídeo. **A)** M: marcador 1 kb Plus DNA Ladder, genes AM, CO e TM, I = intacto, D = digerido, 1, e 2 número das colônias selecionadas. **B)** M: marcador 1 kb Plus DNA Ladder, genes AM e MM, I = intacto, D = digerido, 1, e 2 número das colônias selecionadas. **C)** M: marcador 1 kb Plus DNA Ladder, genes MN e TM, I = intacto, D = digerido, 1, e 2 número das colônias selecionadas. **D)** M: marcador 1 kb Plus DNA Ladder, genes AM e MN, I = intacto, D = digerido, 1, e 2 número das colônias selecionadas

6.5 Transformação em *Komagataella phaffii*

Após a confirmação da inserção dos cinco genes (renomeados AM+pGAPZB, CO+pGAPZB, MM+pGAPZB, MN+pGAPZB e TM+pGAPZB) de *XDH* no vetor pGAPZ B, as colônias foram crescidas em maior volume e os plasmídeos extraídos e purificados com o kit de purificação plasmidial QIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kit (Quiagen®).

Posteriormente, os plasmídeos foram digeridos. AM+pGAPZB e CO+pGAPZB foram linearizados com a enzima *Avr II* e os clones MM+pGAPZB, MN+pGAPZB e TM+pGAPZB com a enzima *Bsp HI*. Após a linearização os vetores foram transformados em *Komagataella phaffii*. Após três dias de incubação verificou-se que havia colônias transformantes para AM, CO, MM e MN. O sistema TM não apresentou colônias transformantes. Sendo assim, as colônias transformadas foram utilizadas nas etapas posteriores do trabalho.

6.6 Avaliação da produção de ácido xilônico pelas linhagens de *Komagataella phaffii* transformadas com os genes AM, CO, MM e MN

Foram selecionadas 10 colônias de *K. phaffii* para cada gene: AM, CO, MM e MN, as quais foram isoladas e inoculadas em placas com meio YPD e zeocina, para posteriores testes quanto à produção de ácido xilônico. O *screening* inicial foi realizado com as 10 colônias de cada gene, em placas deep well com meio YNB, suplementado com diferentes fontes de carbono (xilose e glicerol) (descrito no item 4.2.14). A adição da xilose ao meio foi para verificar se as linhagens construídas conseguiriam utilizar esta fonte de carbono para a produção do ácido xilônico. Já o glicerol foi adicionado para verificar se o mesmo auxiliaria na regeneração de cofatores e se isso interferiria na produção do ácido xilônico.

Com os resultados obtidos (Tabela 5 e Tabela 6), pode-se observar que o gene AM obteve uma produção máxima de 0,50 g/L no meio YNB + xilose 40 g/L e de 0,40 g/L no meio YNB + xilose 40 g/L + 2 g/L de glicerol após 96 horas de incubação. O gene CO apresentou uma produção máxima de 0,31 g/L no meio apenas com xilose e de 0,32 g/L no meio com xilose e glicerol após 96 h de fermentação. O gene MM não apresentou produção de ácido xilônico para nenhuma

das colônias em ambos os meios de produção testados. E o gene MN produziu 0,40 g/L de ácido xilônico no meio YNB com xilose e 0,30 g/L no meio YNB com xilose e glicerol, com 96 h de incubação.

Com base nos resultados obtidos, pode-se verificar que houve pouca diferença de produção de ácido xilônico entre os meios com ou sem suplementação de glicerol. De qualquer maneira, foram selecionadas duas linhagens de cada gene (AM, CO e MN) para serem testadas em meio mineral e em duplicata. Para essa escolha levou-se em consideração a produção de ácido xilônico em ambos os meios de produção. Baseado neste critério, as linhagens XDH-AM1, XDH-AM10, XDH-CO3, XDH-CO10, XDH-MN6 e XDH-MN9 foram escolhidas.

Tabela 5. Produção de ácido xilônico ([] g/L) em meio YNB + xilose 40 g/L.

	XDH-AM1	XDH- AM2	XDH-AM3	XDH-AM4	XDH-AM5	XDH-AM6	XDH-AM7	XDH-AM8	XDH-AM9	XDH-AM10	C-
24 h	0,10	0,07	0,04	0,00	0,04	0,04	0,04	0,06	0,00	0,00	0,00
48 h	0,20	0,10	0,20	0,00	0,06	0,10	0,07	0,20	0,04	0,08	0,00
72 h	0,30	0,10	0,20	0,00	0,20	0,20	0,20	0,30	0,10	0,10	0,00
96 h	0,50	0,40	0,30	0,00	0,30	0,30	0,30	0,40	0,20	0,30	0,00
	XDH-CO1	XDH-CO2	XDH-CO3	XDH-CO4	XDH-CO5	XDH-CO6	XDH-CO7	XDH-CO8	XDH-CO9	XDH-CO10	C-
24 h	0,07	0,07	0,09	0,06	0,07	0,08	0,07	0,08	0,07	0,10	0,00
48 h	0,10	0,11	0,17	0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	0,11	0,22	0,00
72 h	0,15	0,14	0,28	0,13	0,12	0,12	0,16	0,15	0,13	0,27	0,00
96 h	0,18	0,17	0,31	0,16	0,15	0,15	0,20	0,18	0,16	0,30	0,00
	XDH-MM1	XDH-MM2	XDH-MM3	XDH-MM4	XDH-MM5	XDH-MM6	XDH-MM7	XDH-MM8	XDH-MM9	XDH-MM10	C-
24 h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
48 h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
72 h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
96 h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	XDH-MN1	XDH-MN2	XDH-MN3	XDH-MN4	XDH-MN5	XDH-MN6	XDH-MN7	XDH-MN8	XDH-MN9	XDH-MN10	C-
24 h	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,07	0,06	0,00
48 h	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00
72 h	0,00	0,30	0,00	0,00	0,10	0,30	0,10	0,00	0,30	0,30	0,00
96 h	0,00	0,40	0,00	0,00	0,20	0,50	0,20	0,00	0,50	0,40	0,00

Tabela 6. Produção de ácido xilônico ([] g/L) em meio YNB + xilose 40 g/L + glicerol 2 g/L.

	XDH-AM1	XDH- AM2	XDH-AM3	XDH-AM4	XDH-AM5	XDH-AM6	XDH-AM7	XDH-AM8	XDH-AM9	XDH-AM10	C-
24 h	0,04	0,05	0,05	0,00	0,05	0,05	0,05	0,10	0,07	0,10	0,00
48 h	0,09	0,09	0,09	0,00	0,09	0,09	0,10	0,20	0,10	0,10	0,00
72 h	0,20	0,20	0,10	0,00	0,10	0,10	0,10	0,30	0,20	0,30	0,00
96 h	0,20	0,30	0,20	0,00	0,20	0,20	0,20	0,30	0,30	0,40	0,00

	XDH-CO1	XDH-CO2	XDH-CO3	XDH-CO4	XDH-CO5	XDH-CO6	XDH-CO7	XDH-CO8	XDH-CO9	XDH-CO10	C-
24 h	0,06	0,06	0,10	0,06	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07	0,10	0,00
48 h	0,09	0,09	0,18	0,10	0,09	0,10	0,09	0,11	0,09	0,20	0,00
72 h	0,14	0,12	0,32	0,14	0,12	0,12	0,12	0,18	0,16	0,28	0,00
96 h	0,14	0,14	0,32	0,14	0,14	0,14	0,15	0,20	0,18	0,31	0,00

	XDH-MM1	XDH-MM2	XDH-MM3	XDH-MM4	XDH-MM5	XDH-MM6	XDH-MM7	XDH-MM8	XDH-MM9	XDH-MM10	C-
24 h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
48 h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
72 h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
96 h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

	XDH-MN1	XDH-MN2	XDH-MN3	XDH-MN4	XDH-MN5	XDH-MN6	XDH-MN7	XDH-MN8	XDH-MN9	XDH-MN10	C-
24 h	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,07	0,06	0,00
48 h	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00
72 h	0,00	0,20	0,00	0,00	0,10	0,30	0,10	0,00	0,20	0,20	0,00
96 h	0,00	0,30	0,00	0,10	0,10	0,30	0,10	0,00	0,20	0,30	0,00

6.7 Produção de ácido xilônico em diferentes meios de cultivo e fontes de carbono

A avaliação da capacidade de produção de ácido xilônico em pequena escala (50 mL) foi feita realizada com as linhagens AM1, AM10, CO3, CO10, MN6 e MN9. Como as linhagens expressando o gene MM não apresentaram produção, elas foram excluídas dessa etapa. As linhagens foram testadas em meio contendo YNB e em meio mineral FM22, para verificar se os sistemas também conseguiam produzir o ácido xilônico.

Para ambos os meios foram testadas duas condições de fonte de carbono: a primeira, xilose 40 g/L e a segunda, xilose 40 g/L e glicerol 2 g/L. Este experimento foi realizado em duplicata técnica e conforme os itens 4.2.15 e 4.2.16. Também se avaliou o efeito da produção do ácido sobre o pH do meio de cultura. Os resultados apresentados são os valores da média para as linhagens CO3 e CO10 (Figura 6), AM1 e AM10 (Figura 7), MN6 e MN9 (Figura 8). Os dados de produção estão apresentados nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7: Produção de ácido xilônico por linhagens construídas em *Komagataella phaffii*, no meio FM22 com diferentes fontes de carbono.

Estirpe	Xilose (g/L)*	Glicerol (g/L)*	Ácido xilônico (g/L)**
XDH-AM1	40	2	7,25 ± 0,07
XDH- AM1	40	-	5,60 ± 0,28
XDH-AM10	40	2	6,05 ± 0,21
XDH-AM10	40	-	4,65 ± 0,50
XDH-CO3	40	2	1,68 ± 0,82
XDH-CO3	40	-	1,31 ± 0,43
XDH-CO10	40	2	1,30 ± 0,28
XDH-CO10	40	-	0,95 ± 0,23
XDH-MN6	40	2	7,60 ± 5,23
XDH-MN6	40	-	7,25 ± 3,75
XDH-MN9	40	2	8,60 ± 6,90
XDH-MN9	40	-	8,60 ± 6,20

* Concentração inicial de fonte de carbono.

**Resultados são representados pela media e desvio padrão da duplicata.

Tabela 8: Produção de ácido xilônico por linhagens construídas em *Komagataella phaffii*, no meio YNB com diferentes fontes de carbono.

Estirpe	Xilose (g/L)*	Glicerol (g/L)*	Ácido xilônico (g/L)**
XDH- AM1	40	2	2,15 ± 0,50
XDH- AM1	40	-	0,00 ± 0,00
XDH-AM10	40	2	3,00 ± 1,27
XDH-AM10	40	-	0,00 ± 0,00
XDH-CO3	40	2	0,63 ± 0,76
XDH-CO3	40	-	0,70 ± 0,44
XDH-CO10	40	2	0,65 ± 0,21
XDH-CO10	40	-	0,10 ± 0,09
XDH-MN6	40	2	0,00 ± 0,00
XDH-MN6	40	-	0,00 ± 0,00
XDH-MN9	40	2	0,00 ± 0,00
XDH-MN9	40	-	0,00 ± 0,00

* Concentração inicial de fonte de carbono.

**Resultados são representados pela média e desvio padrão da duplicata.

Na Figura 6 pode-se observar que a produção de ácido xilônico para o gene CO foi maior no meio FM22 do que no meio YNB. Quando comparado à produção de ácido xilônico pela disponibilidade de fontes de carbono no meio, o meio que era composto por xilose e glicerol apresentou um aumento de ~22% em relação ao meio só com xilose. O meio FM22 suplementado com xilose e glicerol a produção foi de 1,68 g/L para a amostra CO3 e de 1,30 g/L para a amostra CO10. Enquanto, que quando suplementado com xilose a produção foi de 1,31 g/L para CO3 e 0,95 g/L para CO10. No meio contendo YNB suplementado com xilose e glicerol a produção de ácido xilônico foi de 0,63 g/L para CO3 e de 0,65 g/L para CO10. Na condição de YNB com apenas xilose a produção foi de 0,70 g/L para CO3 e de 0,10 g/L para CO10. Também se verificou que o pH (Figura 7) do meio com YNB caiu de 5 para 2,5 até o final da fermentação (100 h), enquanto que no meio FM22 caiu de 5 para 3,3.

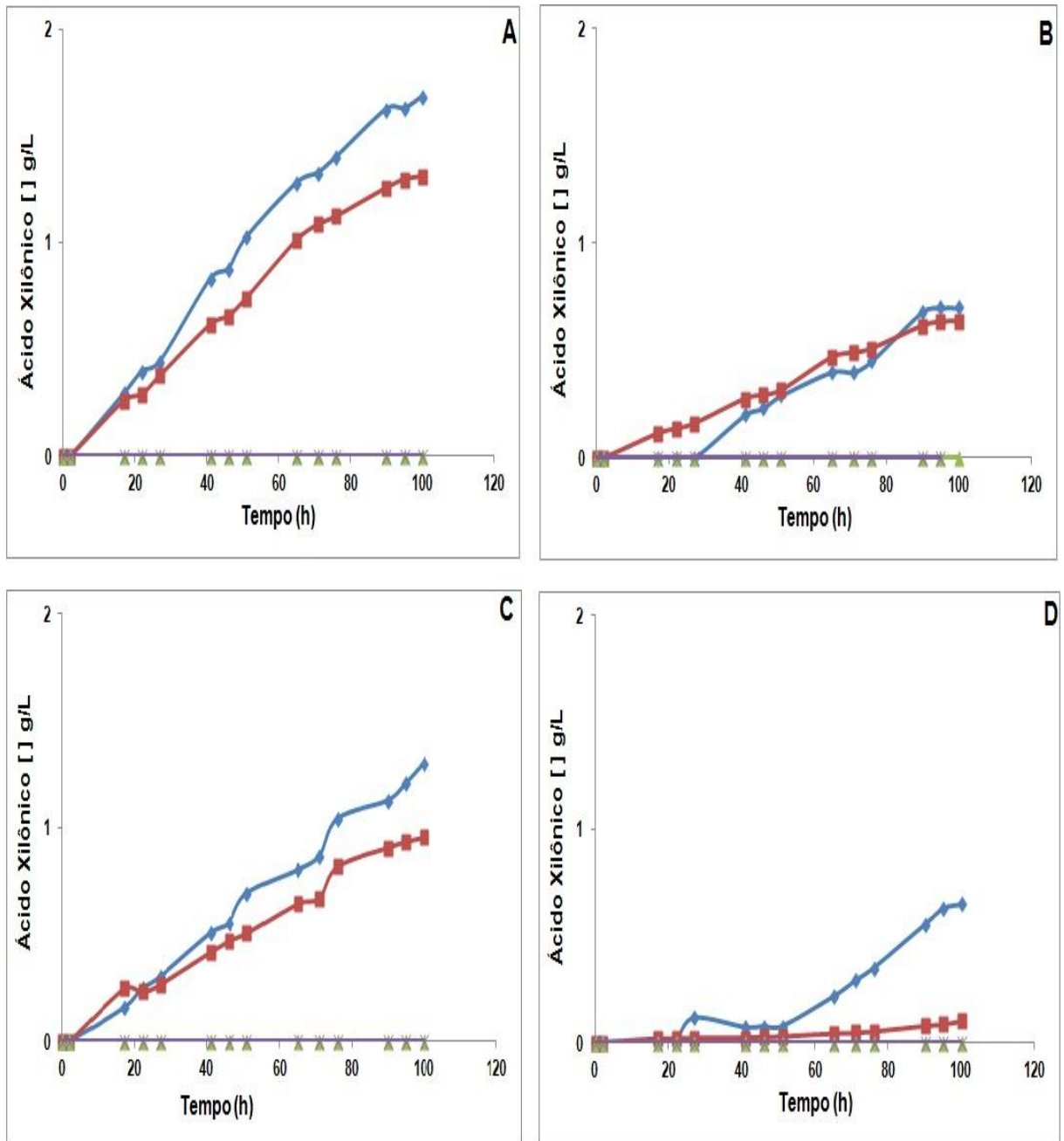


Figura 6: Produção de ácido xilônico pelas linhagens de *Komagataella phaffii* XDH-CO3 (A e B) e XDH-CO10 (C e D) em meio FM22 e YNB. Os meios FM22 (A e C) e YNB (B e D) foram suplementados com as fontes de carbono xilose ou com xilose e glicerol. —◆— Amostra/Xilose e Glicerol; —■— Amostra/Xilose; —▲— Controle/Xilose e Glicerol; —×— Controle/Xilose.

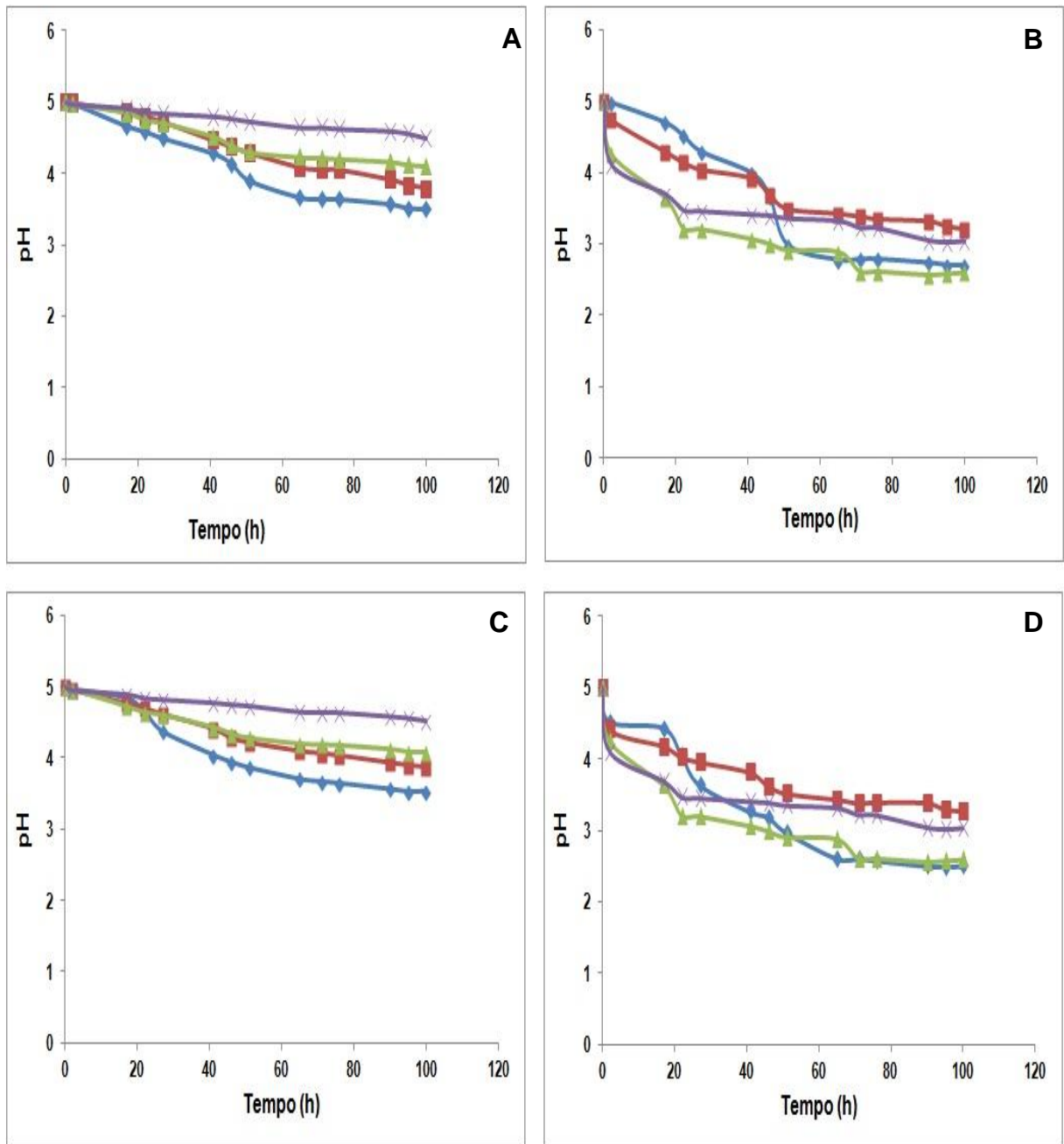


Figura 7: Variação do pH nos meios FM22 (A e C) e YNB (B e D) para as linhagens XDH-CO3 (A e B) e XDH-CO10 (C e D) em *Komagataella phaffii*. Os meios FM22 (A e C) e YNB (B e D) foram suplementados com as fontes de carbono xilose ou com xilose e glicerol. —◆— Amostra/Xilose e Glicerol; —■— Amostra/Xilose; —▲— Controle/Xilose e Glicerol; —×— Controle/Xilose.

Já na Figura 8 observa-se que a produção de ácido xilônico para o gene AM apresentou um comportamento semelhante ao gene CO. A produção de ácido xilônico foi de ~23% maior no meio FM22 do que no meio contendo YNB. No meio FM22 suplementado com xilose a produção de ácido xilônico foi de 5,60 g/L para a

amostra AM1 e para a amostra AM10 de 4,65 g/L. Já quando o meio FM22 foi suplementado com xilose e glicerol a produção do ácido xilônico foi de 7,25 g/L para a amostra AM1 e de 6,05 g/L para AM10. No meio contendo YNB a produção de ácido xilônico ocorreu apenas quando o mesmo foi suplementado com xilose e glicerol. Para a amostra AM1 a produção do ácido xilônico foi de 2,15 g/L e para a amostra AM10 de 3,00 g/L. O pH (Figura 9) se manteve constante no meio FM22 enquanto que no meio YNB caiu rapidamente, chegando a um pH 2,0.

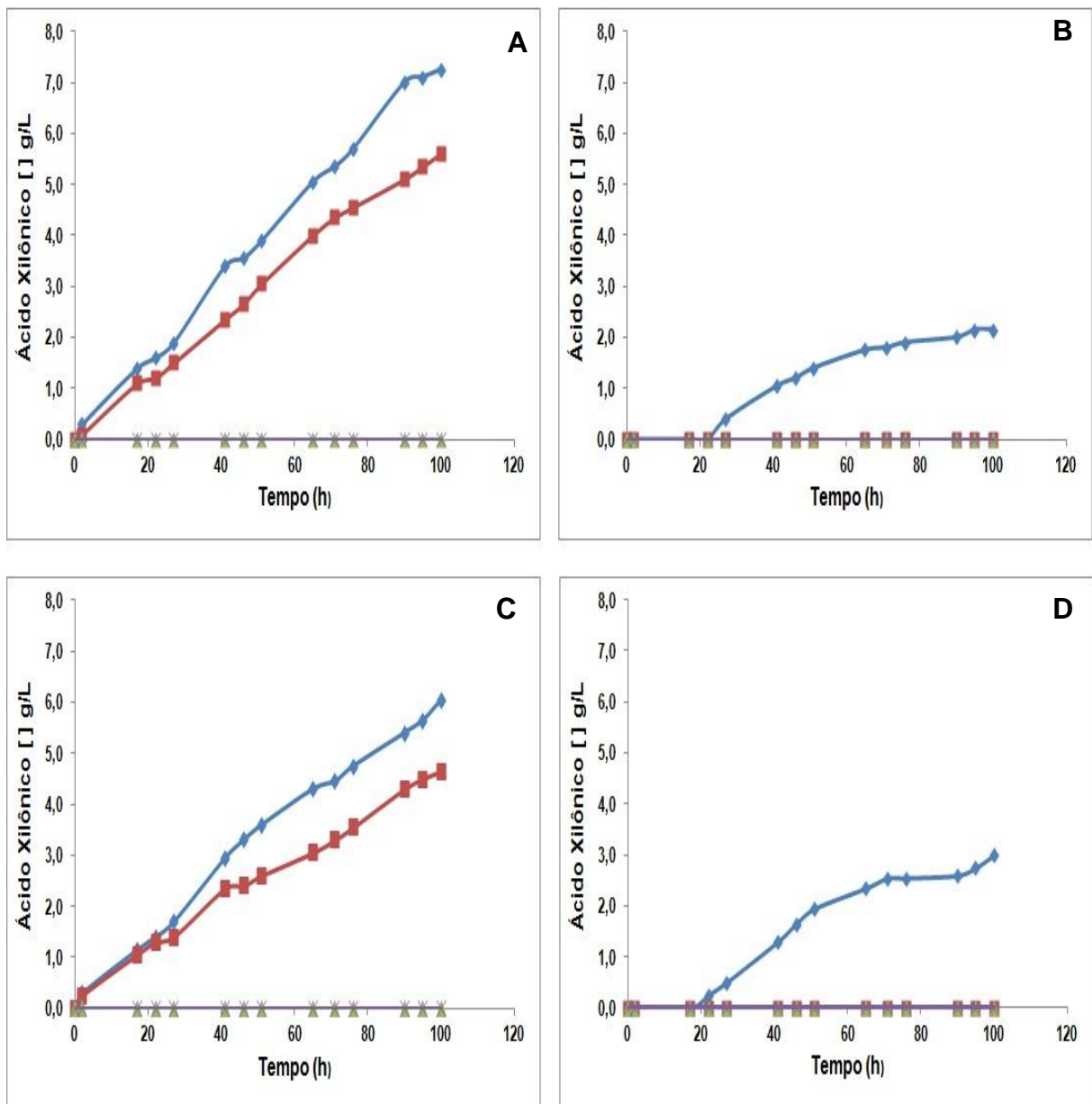


Figura 8: Produção de ácido xilônico pelas linhagens de *Komagataella phaffii* XDH-AM1 (A e B) e XDH-AM10 (C e D) em meio FM22 e YNB. Os meios FM22 (A e C) e YNB (B e D) foram suplementados com as fontes de carbono xilose ou com xilose e glicerol. ◆ Amostra/Xilose e Glicerol; ■ Amostra/Xilose; ▲ Controle/Xilose e Glicerol; × Controle/Xilose.

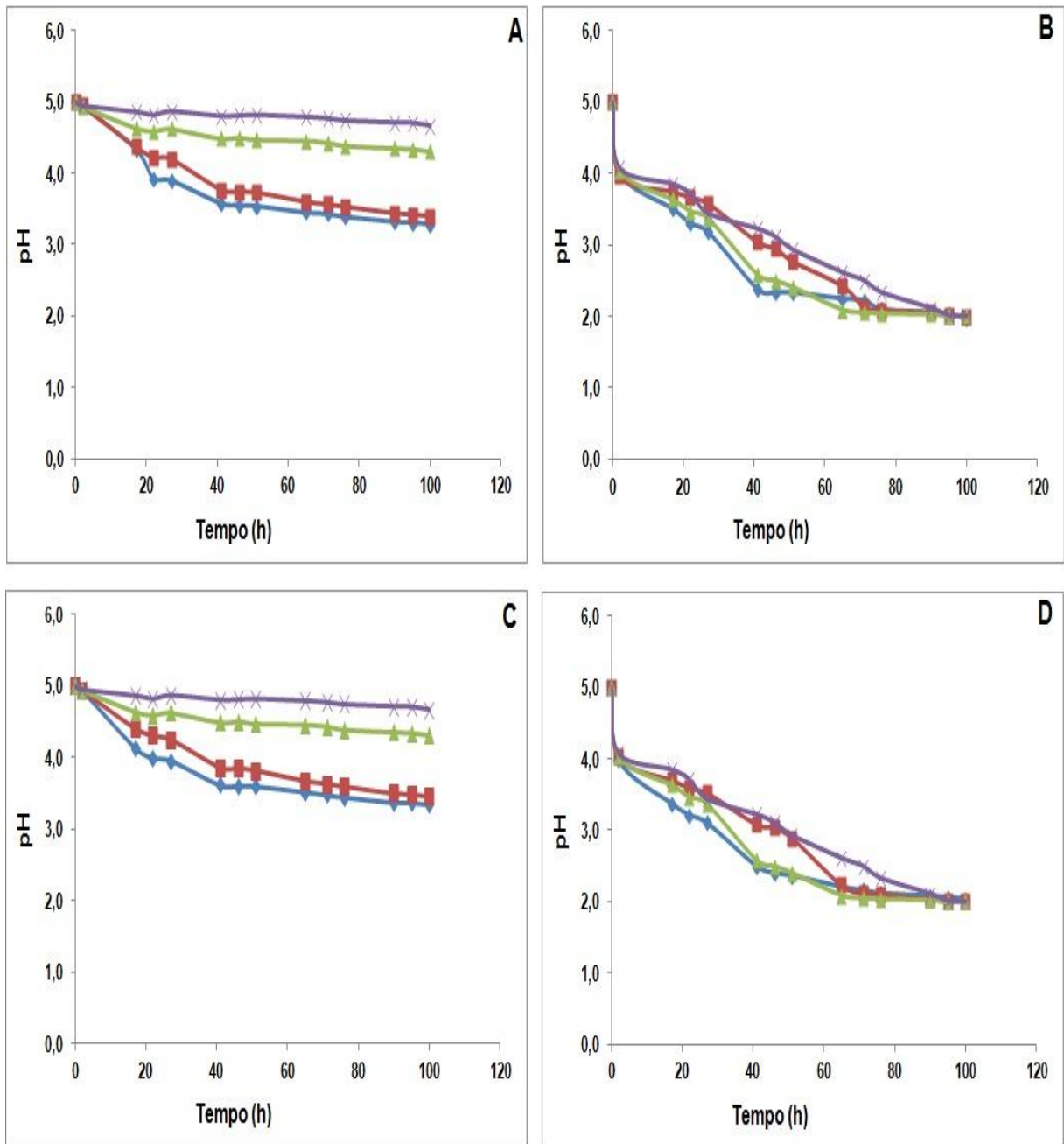


Figura 9: Variação do pH nos meios FM22 (A e C) e YNB (B e D) para as linhagens XDH-AM1 (A e B) e XDH-AM10 (C e D) em *Komagataella phaffii*. Os meios foram suplementados com as fontes de carbono xilose ou com xilose e glicerol. —●— Amostra/Xilose e Glicerol; —■— Amostra/Xilose; —▲— Controle/Xilose e Glicerol; —×— Controle/Xilose.

A Figura 10 apresenta a produção de ácido xilônico para a linhagem MN. A produção de ácido xilônico para essa linhagem ocorreu apenas no meio FM22 para as duas amostras testadas, MN6 e MN9. No meio contendo YNB não houve produção de ácido xilônico em ambas as fontes de carbono avaliadas. No meio FM22 suplementado com xilose e glicerol a produção de ácido xilônico pela

linhagem MN6 foi de 7,60 g/L e de 8,60 g/L para a linhagem MN9. Na condição com apenas xilose a produção de ácido xilônico foi de 7,25 g/L para a linhagem MN6 e de 8,60 para MN9. O pH (Figura 11) apresentou um comportamento similar ao apresentado pelas linhagens AM e CO.

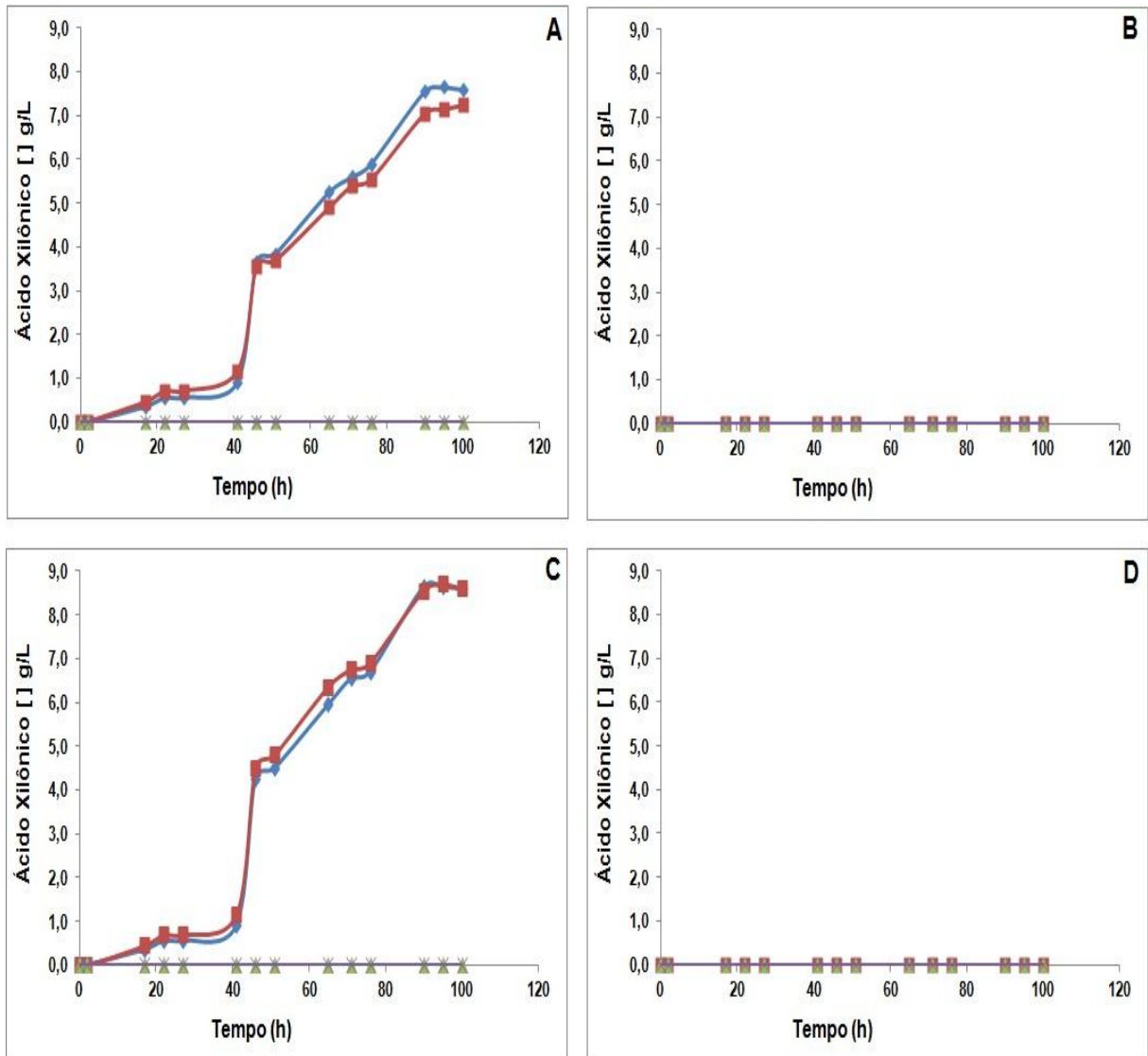


Figura 10: Produção de ácido xilônico pelas linhagens de *Komagataella phaffii* XDH-MN6 (A e B) e XDH-MN9 (C e D) em meio FM22 e YNB. Os meios FM22 (A e C) e YNB (B e D) foram suplementados com as fontes de carbono xilose ou com xilose e glicerol. —◆— Amostra/Xilose e Glicerol; —■— Amostra/Xilose; —▲— Controle/Xilose e Glicerol; —×— Controle/Xilose.

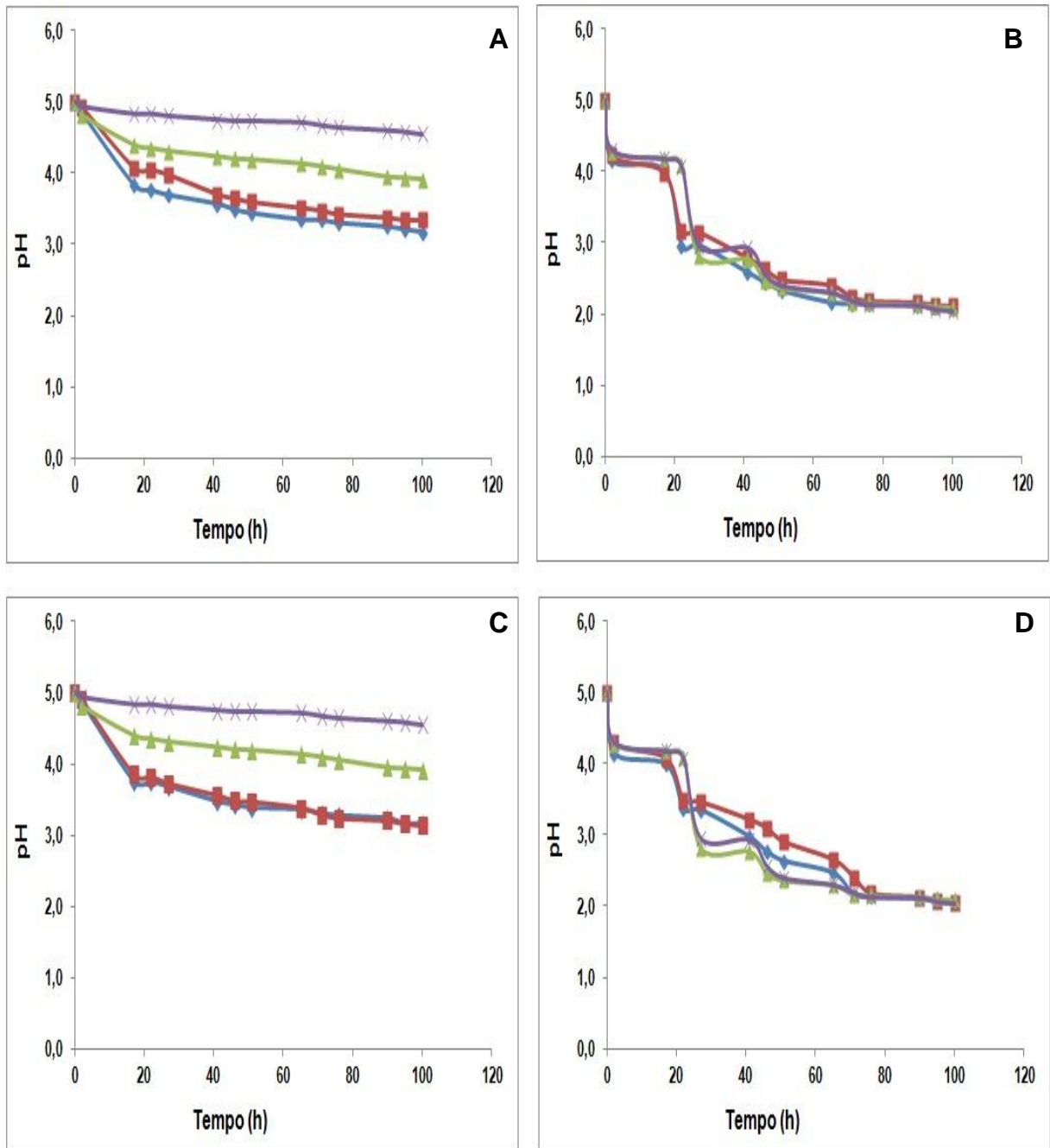


Figura11: Variação do pH nos meios FM22 (A e C) e YNB (B e D) para as linhagens XDH-MN6 (A e B) e XDH-MN9 (C e D) em *Komagataella phaffii*. Os meios foram suplementados com as fontes de carbono xilose ou com xilose e glicerol. —●— Amostra/Xilose e Glicerol; —■— Amostra/Xilose; —▲— Controle/Xilose e Glicerol; —×— Controle/Xilose.

7. Discussão

Neste trabalho, linhagens recombinantes de *Komagataella phaffii* capazes de produzir ácido xilônico foram obtidas pela primeira vez. Para tanto, possíveis genes codificantes para xilose desidrogenase foram identificados através de uma busca no banco de dados. Baseado nessa busca, seis genes de origem bacteriana ou fúngica foram selecionados. Após a clonagem e transformação destes em *Komagataella phaffii*, três possíveis genes codificantes de xilose desidrogenases, apresentaram possuir atividade. As sequências de xilose desidrogenase originárias dos microrganismos *Azospirillum amazonense* (AM), *Colletotrichum orbiculare* (CO) e *Massilia niastensis* (MN) mostraram ser funcionais para a produção de ácido xilônico. Anteriormente, apenas *Escherichia coli* (LIU et al., 2012), *Kluyveromyces lactis* (NYGÅRD et al., 2011), *Saccharomyces cerevisiae* (TOIVARI et al., 2010, NYGARD, et al., 2014), *Pichia kudriavzevii* (TOIVARI et al., 2013) e *Pseudomonas fragi* foram modificadas para produção de ácido xilônico utilizando XDH de *Gluconobacter oxydans*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e/ou *Caulobacter crescentus* (TOIVARI et al., 2012).

Dentre as linhagens construídas nesse estudo, a produção variou de 0,63 g/L a 8,60 g/L para os clones expressando as sequências de XDH de AM, CO e MN, após 100 h. Esses valores de produção estão superiores aos valores obtidos por linhagem recombinante de *E. coli* expressando XDH, onde a produção atingiu cerca de 5,05 g/L de ácido após 60h (Liu et al. 2012). E também estão superiores os valores obtidos por *S. cerevisiae*, que foram de 1,2 g/L após 53 h de incubação (TOIVARI et al., 2010).

Níveis de produção melhores foram obtidos com a levedura *Pichia kudriavzevii*, onde uma produção de 171 g/L em pH 5,5 e de 146 g/L em um pH 3,0 foram obtidas (TOIVARI et al., 2013). Essa diferença de resultado está relacionada com a maior disponibilidade inicial de xilose (153 – 171 g) e de glicose (24,1 – 24,7 g). E também pelas condições de fermentação (pH, oxigenação, fonte de carbono) terem sido controladas, o que não foi realizado nos experimentos deste trabalho.

O pH foi avaliado neste trabalho, em diferentes condições de meio (FM22 e YNB) e de fontes de carbono (xilose e xilose + glicerol) para verificar o quanto a produção de ácido xilônico poderia interferir. Para essa análise comparou-se o pH apresentado pela linhagem controle (*K. phaffii* – X33) com as linhagens construídas (*K. phaffii* – AM, *K. phaffii* – CO e *K. phaffii* – MN). Baseado nos gráficos (Anexos 4, 5 e 6) é possível verificar que a produção de ácido xilônico não interferiu significativamente na variação do pH, pois a queda do pH para as linhagens foi semelhante a variação apresentada pelos controles negativos. A queda do pH verificada estava dentro do esperado, pois as linhagens não deixariam de desenvolver suas atividades metabólicas e conseqüentemente alterar o pH de forma gradual.

Além da avaliação da queda do pH, avaliou-se se a presença de glicerol nos meios interferiria na produção do ácido xilônico. Nas linhagens AM e CO a presença de glicerol em ambos os meios (FM22 e YNB) favoreceu a produção de ácido xilônico. Ocorreu um aumento de ~22% na produção do ácido xilônico nos dois meios. Este aumento deve-se ao fato do glicerol ser absorvido mais lentamente, quando comparado com a absorção da glicose, e com isso a regeneração de co-fatores (NAD(P)⁺) ocorre por mais tempo no interior da célula. Já a produção de ácido xilônico pela linhagem MN ocorreu apenas no meio FM22 e não apresentou uma diferença significativa entre a produção apresentada no meio com xilose e glicerol ou só com xilose. A não produção de ácido xilônico pela linhagem MN no meio contendo YNB justificasse pela presença de colônias mistas em *Komagataella phaffii*.

No meio FM22 com xilose a linhagem que apresentou a melhor produção de ácido xilônico foi a MN (6 e 9), com uma produção variando entre 7,25 a 8,60 g/L. Essa linhagem também apresentou os melhores resultados quando o meio foi suplementado com as fontes de carbono xilose e glicerol. A produção do ácido xilônico variou entre 7,60 a 8,60 g/L. A linhagem AM1 também apresentou uma produção significativa de ácido xilônico, 7,25 g/L.

Quando a avaliação da produção de ácido xilônico foi realizada no meio contendo YNB suplementado apenas com xilose como fonte de carbono, a linhagem que apresentou um melhor resultado foi a CO, com uma produção variando de 0,1 – 0,7 g/L. Esse mesmo meio quando foi suplementado com xilose e glicerol a linhagem que apresentou uma maior produção de ácido xilônico foi a AM, variando de 2,15 – 3,00 g/L.

Além dessas linhagens que produziram ácido xilônico outras três não apresentaram produção, sendo elas TR, TM e MM. As linhagens TR e TM apresentaram problemas nas fases de clonagem e não chegaram até a fase de avaliação de produção de ácido xilônico. A linhagem MM apresentou colônias transformantes em *Komagataella phaffii*, mas quando foram realizados os testes de fermentação as dez colônias não apresentaram produção de ácido xilônico. As colônias transformantes foram falsos positivos, pois conseguiram crescer no meio de seleção, mas não ocorreu a produção de ácido xilônico.

Nem todas as linhagens chegaram até a fase de avaliação de produção de ácido xilônico, mas as linhagens que alcançaram essa fase demonstraram um potencial de serem testadas e otimizadas em outros níveis de produção. As linhagens AM e MM evidenciaram ter potencial para serem escalonadas em biorreatores e como futuras candidatas para produção industrial, utilizando o meio FM22 suplementado com xilose e glicerol.

8. Conclusão

A partir dos seis genes possivelmente codificantes para xilose desidrogenase identificados (AM, CO, MM, MN, TM e TR) e avaliados quanto a produção de ácido xilônico, três destes (AM, CO e MN) mostraram-se funcionais em *Komagataella phaffii*.

As linhagens construídas foram capazes de produzir ácido xilônico através da conversão de xilose. E a produção do ácido xilônico variou de acordo com o meio e com a fonte de carbono disponível, chegando a uma produção de 8,60 g/L.

O pH não foi alterado pela produção de ácido xilônico e sim pelas condições da fermentação (crescimento celular, respiração, oxigenação). O pH apresentou alteração quando comparado o comportamento no meio FM22 com o do meio contendo YNB. No meio FM22 o pH manteve-se mais constante, diferentemente do que aconteceu no meio YNB que apresentou uma variação maior.

9. Perspectivas

As metas principais agora são aperfeiçoar e escalonar a produção do ácido xilônico para as linhagens MN e AM, definindo as melhores condições de fermentação. Além de testar estas linhagens com glicerina como fonte de carbono, o que poderá agregar valor produtivo também a produção do biodiesel.

E concluir as clonagens e transformações para as possíveis sequências codificadoras de xilose desidrogenase TR, TM. Além de analisar essas linhagens e a linhagem MM para a produção de ácido xilônico.

Finalizando o projeto, o objetivo também é a publicação de um artigo em revista internacional de impacto.

10. Referências Bibliográficas

AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, p. 5301-5317, 2014.

ALMEIDA, J. R. M. de; MORAES, L. M. P. de; TORRES, F. A. G. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*PGKI*) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Wiley InterScience**, v. 22, p 725-737, 2005.

BATISTA, V. D. F. **Construção de um vetor para a expressão heteróloga em *Pichia pastoris***. Dissertação de Mestrado, Programa de pós-graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, f- 82, 2012.

BETANCUR, M. O. **Desenvolvimento de linhagem auxotrófica de *Pichia pastoris* para o metabolismo de leucina**. Dissertação de Mestrado, Programa de pós-graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, f-104, 2014.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519 – 546, 2003.

BUCHERT, J.; VIIKARI, L. The role of xylonolactone in xylonic acid production by *Pseudomonas fragi*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 27, p.333 – 336, 1988.

CARVALHO, W.; SILVA, D. D. V.; CANILHA, L.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte I: ácidos orgânicos. **Revista Analytica**, n. 18, 2005.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24; p. 45-66, 2000.

ÇELİK, E.; ÇALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1108–1118, set. 2012.

CHANDEL, A. K. et al. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11–20, jan. 2012.

COLABARDINI, A. C. et al. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 46, 2014.

CREGG, J.M. Heterologous proteins expressed in *Pichia pastoris*. [<http://faculty.kgi.edu/cregg>], 2004.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, n. 2, p. 119–138, mar. 2005.

DRABER K. M. M. etanol de segunda geração já é realidade. monografia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São paulo. f- 54, 2013.

FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. Ácidos orgânicos: dos primórdios da química experimental à sua presença em nosso cotidiano. **Química Nova na Escola**, n. 15, 2002.

GALAR, M. L.; BOIARDI, J. L. Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose-dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 43, p.713 – 716, 1995.

GAN, P. IKEDA, K.; IRIEDA, H.; NARUSKA, M. O'CONNELL, R. J.; NARUSKA, Y.; TAKANO, Y.; KUBO, Y.; SHIRASU, K. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. **New Phytologist**, v. 197, n. 4, p. 1236–1249, mar. 2013.

GELLISSEN, G. et al. New yeast expression platforms based on methylotrophic and on dimorphic and – A comparison. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 11, p. 1079–1096, nov. 2005.

GOMES, M. A. **Destoxificação de hidrolisados lignocelulósicos visando à obtenção de etanol 2G**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade de Alagoas, f. 96, 2015.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550–567, jan. 2015.

INAN, M.; MEAGHER, M. M. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOXI) promoter of *Pichia pastoris*. **Papers in Biochemical Engineering**, paper 14, 2001.

invitrogen EUA, manual *Pichia Expression Kit*.

JORDAN, D. B. et al. Plant cell walls to ethanol. **Biochemical Journal**, v. 442, n. 2, p. 241–252, 1 mar. 2012.

KURTZMAN, C. P. Biotechnological strains of Komagataella (*Pichia*) *pastoris* are Komagataella *phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1435–1438, nov. 2009.

LI, P. et al. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, n. 2, p. 105–124, 28 set. 2007.

LI, P. et al. Construction of efficient xylose utilizing *Pichia pastoris* for industrial enzyme production. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, dez. 2015.

LIU, H. et al. High yield production of d-xylonic acid from d-xylose using engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 244–248, jul. 2012.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249 - 270, 2005.

MATSUSHIKA, A. et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 37–53, ago. 2009.

NETO, O. DE S. O. Identificação e análise funcional de sinais de secreção de *Pichia pastoris*. Dissertação de mestrado do programa de pós-graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, f-86, 2012.

NYGÅRD, Y. et al. Bioconversion of d-xylose to d-xylonate with *Kluyveromyces lactis*. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 4, p. 383–391, jul. 2011.

NYGÅRD, Y. **Production of D-xylonate and organic acid tolerance in yeast**. Espoo: VTT, 2014a.

NYGARD, Y. et. al. Single cell and *in vivo* analyses elucidate the effect of xylC lactonase during production of D-xylonate in *saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v.25, p. 238 -247, 2014b.

POOLE, R. K. **Advances in microbial physiology. Volume 40**. San Diego, Calif.: Academic Press, 1998.

TOIVARI, M. et al. Low pH d-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 555–562, abr. 2013.

TOIVARI, M. H. et al. *Saccharomyces cerevisiae* engineered to produce D-xylonate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 751–760, out. 2010.

TOIVARI, M. H. et al. Microbial d-xylonate production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 1–8, out. 2012.

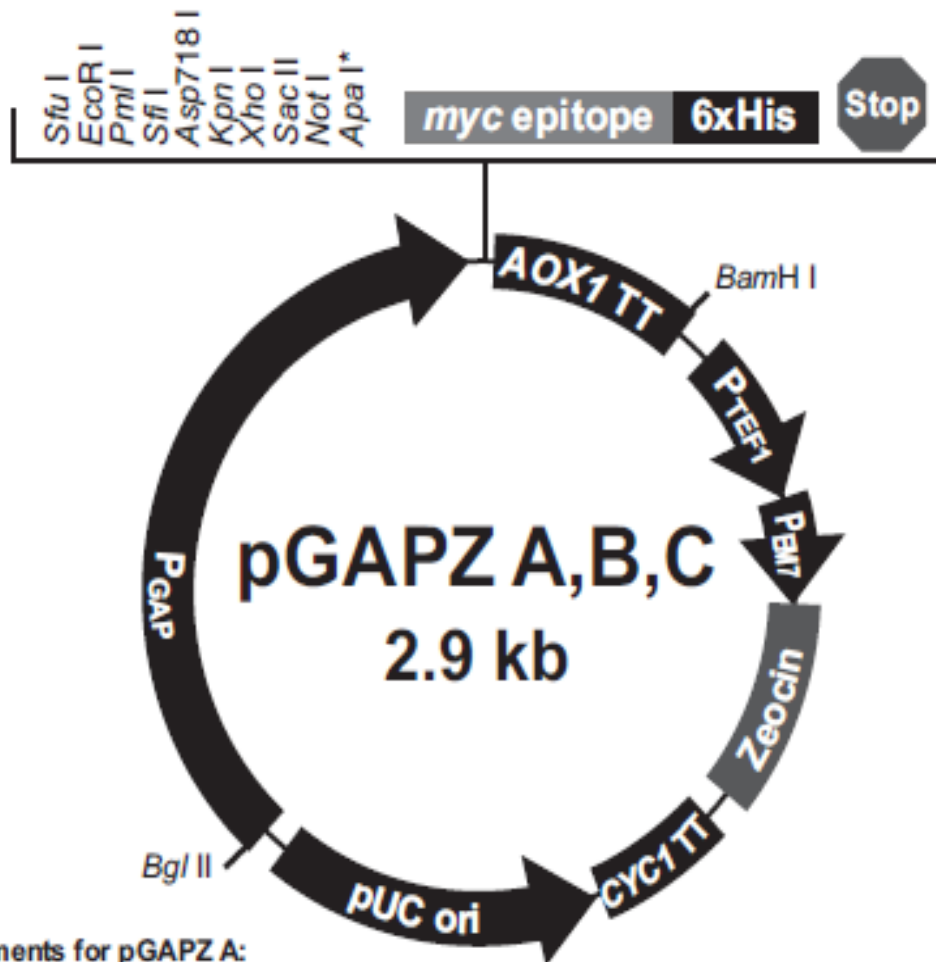
ZAMORA, F. et al. Stereoregular Copolyamides Derived from D -Xylose and L - Arabinose. **Macromolecules**, v. 33, n. 6, p. 2030–2038, mar. 2000.

ZHOU, X. et al. Improving the performance of cell biocatalysis and the productivity of xylonic acid using a compressed oxygen supply. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 196–199, jan. 2015.

ZHOU, X.; XU, Y.; YU, S. Simultaneous Bioconversion of Xylose and Glycerol to Xylonic Acid and 1,3-Dihydroxyacetone from the Mixture of Pre-Hydrolysates and Ethanol-Fermented Waste Liquid by *Gluconobacter oxydans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 1, p. 1–8, jan. 2016.

11. Anexos

Anexo 1: Representação esquemática do mapa do vetor pGAPZ B (Invitrogen).



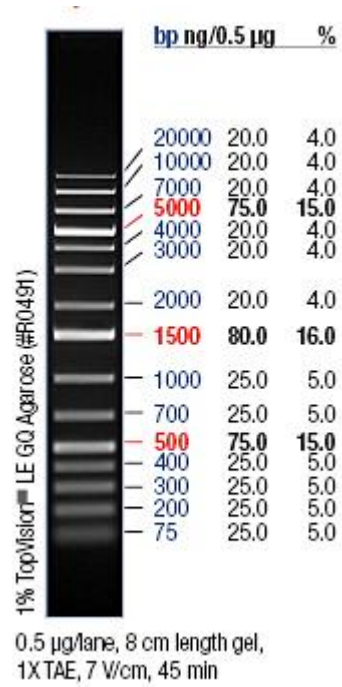
Comments for pGAPZ A:
2884 nucleotides

GAP promoter region: bases 1-483
 Multiple cloning site: bases 484-563
 myc epitope tag: bases 564-593
 Polyhistidine tag: bases 609-626
 AOX1 transcription termination region: bases 630-970
 Fragment containing *TEF1* promoter: bases 971-1381
 EM7 promoter: bases 1382-1449
Sh ble ORF: bases 1450-1824
 CYC1 transcription termination region: bases 1825-2142
 pUC origin: bases 2153-2826

* The restriction site between *Not* I and the *myc* epitope is different in each version of pGAPZ:

Apa I in pGAPZ A
Xba I in pGAPZ B
*Sna*B I in pGAPZ C

Anexo 2: Marcador molecular utilizado (1 kb Plus DNA Ladder- Thermo Scientific).



Anexo 3: Representação esquemática do mapa do vetor T&A RBC Cloning (Real-biotech).

