

Universidade de Brasília - UnB
Instituto de Química-IQ
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica-TQB



“Produção de Ácido Xilônico com linhagens recombinantes
de *Komagataella phaffii*.”

Brasília
2019

Talita Gabriela Salles Ramos

Talita Gabriela Salles Ramos

**“Produção de Ácido Xilônico com linhagens recombinantes
de *Komagataella phaffii*.”**

Tese apresentada/submetida ao Programa
de Pós-Graduação Tecnologias Química e
Biológica, para obtenção do Título de
Doutora em Tecnologia Biológica

Orientador: Dr. João Ricardo M. de Almeida

Brasília

2019

Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese do (a) aluno (a) **Talita Gabriela Salles Ramos**, matrícula nº **15/0102445**, intitulada ***“Produção de ácido xilônico com linhagens recombinantes de komagatella phaffi”***, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 22 de março de 2019.

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

Prof.^a Dra. Talita Souza Carmo
Membro Titular (IB/UnB)

Prof. Dr. Alexsandro Sobreira Galdino
Membro Titular (UFSJ)

Prof.^a Dra. Viviane Castelo Branco Reis
Membro Titular (IB/UnB)

Dra. Jessica Carvalho Bergmann
Membro Suplente (EMBRAPA Agroenergia)

Em 22 de março de 2019.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador João Ricardo pela excelente orientação, ajuda e paciência nesses quatro anos de doutorado
- À Carol que ajudou a tornar o trabalho na Embrapa muito mais divertido
- À Clara por ser a melhor companheira de grupo que eu poderia querer nesses quatro anos de doutorado
- A todos do grupo de pesquisa do João pela ajuda sempre que necessária
- O Victor por me ajudar nos experimentos de fermentação
- À Jessica, Débora e Henrique que sempre estiveram disponíveis quando eu precisei dos seus conselhos e ajuda
- Aos meus pais que sempre me apoiaram ao longo desses quatro anos
- À Nina e ao Niel por estarem comigo quando eu precisei
- À Embrapa Agroenergia e UnB pelo espaço e recursos necessários para a minha pesquisa
- A mim mesma por nunca ter desistido, nesses quatro anos de trabalho, mesmo todas as vezes que as coisas não saíram como o esperado
- Aos membros da banca presente: Dra. Talita Souza, Dra. Viviane Reis, Dra. Jessica Bergman e Dra. Débora Trichez

RESUMO

RAMOS, T.G.S. Produção de Ácido Xilônico utilizando linhagens recombinantes de *Komagataella phaffii*. 2019. 92 f Tese (Tecnologia Biológica) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

A biomassa lignocelulósica quando desconstruída libera principalmente hexoses e pentoses. As hexoses podem ser usadas para a produção de etanol enquanto que as pentoses podem ser usadas para a produção de ácidos orgânicos, agregando valor a toda a cadeia de produção de etanol. O ácido xilônico é um ácido orgânico que pode ser utilizado como substituto do ácido glucônico nas indústrias alimentícias, química, farmacêutica e de construção civil. Uma das maneiras de se produzir esse ácido é por rota microbiana usando a enzima xilose desidrogenase. Ele já foi produzido em linhagens recombinantes de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia kudriavzevii*. A levedura *Komagataella phaffii* é bastante usada para modificações genéticas, por possuir diversas ferramentas que facilitam essas manipulações, e possui a capacidade de tolerar baixos pH. Nesse trabalho foram identificados novos genes que codificam para xilose desidrogenase (XDH) através de análises filogenéticas. Esses novos genes (denominados *xyIB-ap*, *xyIB-bs*, *xyIB-FM* e *xyIB-hl*) foram clonados sob controle do promotor constitutivo pGAP (gliceraldeído 3-P desidrogenase) e depois inseridos no genoma da levedura *Komagataella phaffii*. Linhagens recombinantes foram selecionadas a partir do perfil de produção de ácido xilônico para cada gene. As melhores linhagens obtidas, P1HL2 e P2BS6, foram caracterizadas em diferentes condições experimentais, incluindo variações nas condições de aeração e meios de cultura. A melhor produção ocorreu em biorreator, no modo batelada com meio FM22 suplementado com xilose 40g/L e glicerol 10 g/L. Para a linhagem P1HL2 a maior produção de ácido xilônico foi de 38,4 g/L com um rendimento de 0,98 g/g. Para a linhagem P2BS6 a maior produção de ácido xilônico foi de 36,2 g/L com um rendimento de 0,95 g/g. Também foi medida a capacidade das linhagens P1HL2 e P2BS6 de produzirem ácido xilônico usando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como meio de cultura. A linhagem P2BS6 foi capaz de produzir 11 g/L de ácido xilônico e teve um

rendimento de 0,4 g/g, em frasco. Já a linhagem P1HL2 foi capaz de produzir 13,4 g/L de ácido xilônico e teve um rendimento de 0,5 g/g, em frasco e 19,3 g/L, de ácido xilônico, e obter um rendimento de 0,68 g/g em biorreator.

Palavras-chave: Ácido xilônico. *Komagataella phaffii*. Xilose desidrogenase. *xyIB-ap*, *xyIB-bs*, *xyIB-FM* e *xyIB-hl*. P2BS6. P1HL2. Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

RAMOS, T.G.S. Production of Xylonic Acid Using Recombinant lines of *Komagataella phaffii*. 2019. 92 f Ph. D Thesis (Biological Technology) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

Lignocellulosic biomass when deconstructed mainly releases hexoses and pentoses. Hexoses can be used for the production of ethanol while the pentoses can be used for the production of organic acids, adding value to the entire ethanol production chain. Xylonic acid is an organic acid that can be used as a substitute for gluconic acid in the food, chemical, pharmaceutical and building industries. This acid can be produced by microbial route using the enzyme xylose dehydrogenase. It has already been produced, by microbial route, in several microorganisms, such as: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. The yeast *Komagataella phaffii* is widely used for genetic modification, because it has several tools that facilitate these manipulations, and has the capacity to tolerate low pH. These characteristics make it a target microorganism for the production of xylonic acid. In this work new genes coding for xylose dehydrogenase (XDH) were identified using the template sequence of *Caulobacter crescentus* bacteria. These new genes (*xyIB-ap*, *xyIB-bs*, *xyIB-FM* and *xyIB-hl*) were cloned into the pGAPZB vector and then inserted into the genome of the yeast *Komagataella phaffii*. Recombinant strains were selected from the xylonic acid production profile for each gene. With the best lineages of the two best genes, P1HL2 and P2BS6, the bioreactor lineages were characterized with controlled temperature, agitation, aeration and pH conditions using FM22 medium supplemented with 40 g / L xylose and 10 g / L glycerol. For the lineage P1HL2 the highest production of xylonic acid was 38.4 g / L in a yield of 0.98 g / g. For the P2BS6 line the highest production of xylonic acid was 36.2 g / L in a yield of 0.95 g / g. The ability of the P1HL2 and P2BS6 lines to produce xylonic acid using sugarcane bagasse hydrolyzate as the culture medium was also measured. The P2BS6 strain was able to produce 11 g / L xylonic acid and had a yield of 0.4 g / g, in flask. The P1HL2 strain was able to produce 13.4 g / L xylonic acid and

had a yield of 0.5 g / g in a flask and 19.3 g / L xylonic acid to give a yield of 0,68 g / g in bioreactor.

Keywords: Xylonic acid. *Komagataella phaffii*. Xylose dehydrogenase. *xyIB-ap*, *xyIB-bs*, *xyIB-FM* and *xyIB-hl*. P2BS6. P1HL2. Sugarcane bagasse hydrolyzate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais componentes da lignocelulose.....	19
Figura 2: Esquema demonstrando as principais fases para o processo de produção do bioetanol no Brasil.....	22
Figura 3: Xilose e exemplos de compostos que podem ser obtidos, por microrganismos, a partir da xilose.....	22
Figura 4: Estrutura química de alguns dos principais ácidos orgânicos.	26
Figura 5: Rota química de produção do ácido xilônico utilizando eletrodos de ouro e platina, respectivamente, em meio alcalino	28
Figura 6: Rota microbiana de produção de ácido xilônico utilizando D-xilose e a enzima xilose desidrogenase.....	29
Figura 7: Principais vias do metabolismo de xilose encontrado em microrganismos.....	30
Figura 8: Mapa do vetor de clonagem em <i>E. coli</i> pMAT.....	37
Figura 9: Mapa do vetor de expressão em <i>K. phaffii</i> pGAP.....	38
Figura 10: Árvore filogenética construída com sequências de possíveis XDH de bactérias.. ..	53
Figura 11: Árvore filogenética construída com sequências de possíveis XDH de fungos filamentosos.	54
Figura 12: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% para análise de transformantes com pGAP- <i>xyIB</i>	56
Figura 13: Produção de ácido xilônico pelas linhagens selecionadas expressando os genes <i>ap</i> (a); <i>bs</i> (b); <i>fm</i> (c) e <i>hl</i> (d) e destacando as duas melhores linhagens.....	58
Figura 14: Produção de ácido xilônico (A) e crescimento (B) por linhagens recombinantes de <i>K. phaffii</i>	59
Figura 15: Biomassa (■) e produção de ácido xilônico (Δ) por linhagens recombinantes de <i>K. phaffii</i> P2BS6 e P1HL2.....	61
Figura 16: Biomassa (■), consumo de glicerol (●) e produção de ácido xilônico (Δ) por linhagens recombinantes de <i>K. phaffii</i> controle (A), P2BS6 (B) e P1HL2 (C).	63

Figura 17: Biomassa (■), consumo de glicerol (●) e produção de ácido xilônico (Δ) por linhagens recombinantes de <i>K. phaffii</i> controle (A), P2BS6 (B) e P1HL2 (C).....	65
Figura 18: Biomassa (■), consumo de glicerol (●) e produção de ácido xilônico (Δ) por linhagens recombinantes de <i>K. phaffii</i> P2BS6 (A) e P1HL2 (B).....	67
Figura 19: Biomassa (■), consumo de glicose (●), ácido acético () e produção de ácido xilônico (Δ) por linhagens recombinantes de <i>K. phaffii</i> controle (A), P2BS6 (B) e P1HL2 (C).....	70
Figura 20: Biomassa (■), consumo de glicose (●), ácido acético () e produção de ácido xilônico (Δ) pela linhagem recombinante de <i>K. phaffii</i> P1HL2 (A) e a sua duplicata (B).....	72
Figura 21: Gráfico resumindo os dados de produção de ácido xilônico (A); rendimento (B) e produtividade (C) alcançados pelas linhagens: P2BS6, contendo o gene <i>xyIB-bs</i> e P1HL2, contendo o gene <i>xyIB-hl</i>	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina de diversos tipos biomassas.....	19
Tabela 2: Microrganismo modificados para a produção de ácido xilônico. Parâmetros de produção e genes empregados.	32
Tabela 3: Composição do Hidrolisado utilizado.....	40
Tabela 4: ligação dos genes no vetor pGAPZB.....	43
Tabela 5: Digestão para a confirmação da clonagem no vetor pGAPZB.....	44
Tabela 6: Digestão para a linearização do vetor pGAPZB com os genes que codificam para XDH clonados.....	45
Tabela 7: Genes <i>xyIB</i> escolhidos para expressão em <i>K. phaffii</i>	55
Tabela 8: Identidade entre as sequências de aminoácidos das XDH bacterianas selecionadas.....	55
Tabela 9: Resultados de fermentação em biorreator com oxigênio limitado das linhagens P2BS6, P1HL2 e controle.	64
Tabela 10: Resultados de fermentação em biorreator aeróbico das linhagens P2BS6, P1HL2 e controle..	66
Tabela 12: Consumo de xilose, rendimento e produtividade das linhagens P2BS6 e P1HL2 da fermentação em frasco utilizando bagaço de cana-de-açúcar 20%.	71

ABREVIACÕES

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	Enzyme Commission Number
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
g	gramas
XDH	Xilose desidrogenase
HCl	Ácido Clorídrico
kDa	Kilodáltons
Kg	Quilogramas
LB	Meio de Cultura Luria Bertrani
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potássio Dibásico
NaCl	Cloreto de Sódio
(NH ₄)SO ₄	sulfato de amônio
CaCl ₂ .2H ₂ O	cloreto de cálcio dihidratado
K ₂ SO ₄	sulfato de potássio
MgSO ₄ .7H ₂ O	sulfato de magnésio heptahidratado
CuSO ₄ .5H ₂ O	sulfato de cobre pentahidratado
NaI	Iodeto de sódio
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de Manganês hidratado
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sódio dihidratado
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
CaSO ₄ .2H ₂ O	Sulfato de cálcio dihidratado
CoCl ₂ 6H ₂ O	Cloreto de cobalto hexahidratdo

ZnCl₂ Cloreto de zinco

FeSO₄ 7H₂O Sulfato de ferro heptahidratado

H₂SO₄ Ácido sulfúrico

NCBI National Center for Biotechnology Information

BLASTx Basic Local Alignment Search Tool

kV Kilovolts

μF Microfarads

M Molar

mL Mililitros

μL Microlitros

MeOH Acetonitrila

UPLC Ultra-Performance Liquid Chromatography

HPLC High-Performance Liquid Chromatography

pb Pares de Bases

°C Graus Celsius

YNB Base nitrogenada de levedura sem aminoácidos e sulfato de amônio

1 SUMÁRIO

2	INTRODUÇÃO.....	16
	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	18
2.2	USO DA BIOMASSA EM BIOPROCESSOS.....	20
2.3	XILOSE EM BIOPROCESSOS.....	24
2.4	ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	26
2.5	PRODUÇÃO DE ÁCIDO XILÔNICO.....	27
2.6	<i>KOMAGATAELLA PHAFFII</i>	32
3	OBJETIVOS:.....	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	MICROORGANISMOS.....	36
4.2	VETORES.....	36
4.3	MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	38
4.4	IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS GENES QUE CODIFICAM PARA XDH.....	41
4.5	CÉLULA COMPETENTE DE <i>E. COLI</i> POR ELETROPORAÇÃO.....	42
4.6	TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. COLI</i>	42
4.7	MINIPREP E MAXI PREP.....	42
4.8	CLONAGEM DOS GENES XDH NO VETOR DE EXPRESSÃO PGAPZB.....	43
4.9	ANÁLISE DE RESTRIÇÃO.....	44
4.10	TRANSFORMAÇÃO DE <i>K. PHAFFII</i>	44
4.11	SELEÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE ÁCIDO XILÔNICO.....	46
4.12	PRODUÇÃO DE ÁCIDO EM FRASCO.....	46
4.13	ANÁLISE DO EFEITO DE COSUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO XILÔNICO.....	47
4.14	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE ÁCIDO XILÔNICO EM BIORREATOR NO MODO BATELADA.....	47

4.15	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE ÁCIDO XILÔNICO EM BIORREATOR NO MODO BATELADA ALIMENTADA	48
4.16	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE ÁCIDO XILÔNICO EM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM FRASCO	49
4.17	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE ÁCIDO XILÔNICO EM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM BIORREATOR.....	50
5	RESULTADOS	51
5.1	IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS XDH.....	51
5.2	CLONAGEM DOS GENES <i>XYLB</i> NO VETOR DE EXPRESSÃO PGAPZB	55
5.3	OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE <i>K. PHAFFII</i> PRODUTORAS DE ÁCIDO XILÔNICO	57
5.4	COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE GLICEROL E GLICOSE NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO XILÔNICO	60
5.5	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE ÁCIDO XILÔNICO EM BIORREATOR	62
5.6	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE ÁCIDO XILÔNICO EM BIORREATOR BATELADA ALIMENTADA	66
5.7	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE ÁCIDO XILÔNICO EM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	68
5.8	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE ÁCIDO XILÔNICO EM BIORREATOR COM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	71
6	DISCUSSÃO.....	74
7	CONCLUSÃO	79
8	TRABALHOS PUBLICADOS	80
8.1	PEDIDO DE PATENTE	80
8.2	CAPITULO DE LIVRO.....	80
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
10	ANEXOS.....	87

2 INTRODUÇÃO

A demanda mundial por fontes de energia renováveis tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Uma das principais fontes de energia renovável é a biomassa lignocelulósica, a qual engloba matéria orgânica na forma de resíduo agroindustriais e da produção agrícola. A biomassa lignocelulósica pode ser desconstruída em seus componentes básicos, os monômeros de açúcares, de cinco e de seis carbonos (C6 e C5), e de lignina.

O açúcar C6 que é liberado com a quebra da lignocelulose é facilmente convertido por microrganismos em bioprocessos, como por exemplo, fermentado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol. Já a xilose, açúcar C5, também liberada na quebra da hemicelulose não é facilmente convertido a produtos de interesse por microrganismos de interesse industrial, como é o caso da levedura *S. cerevisiae*.

Para agregar valor à cadeia de produção de bioetanol surge a alternativa de produção de ácidos orgânicos utilizando a xilose como substrato. Os ácidos orgânicos têm diferentes aplicações industriais, especialmente, nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e químicas como realçadores de sabor, antimicrobianos e bloco construtores, respectivamente. O ácido xilônico é um ácido de cinco carbonos produzido a partir de xilose e pode ser aplicado na indústria, como um substituto do ácido glucônico que é produzido a partir da glicose um açúcar utilizado na alimentação humana.

Neste trabalho, a fim de se produzir ácido xilônico a partir de hidrolisados lignocelulósicos ricos em xilose foram construídas linhagens recombinantes de *Komagataella phaffii*. Inicialmente, foram identificados novos possíveis genes que codificam para xilose desidrogenase (XDH) a partir de análises filogenéticas empregando sequências de dados público. Esses novos genes foram sintetizados e clonados no vetor de expressão sobre controle do promotor constitutivo pGAP (gliceraldeído 3-P- desidrogenase). Após transformação genética da levedura *K. phaffii*, foram selecionadas linhagens produtoras de ácido xilônico. Finalmente, linhagens produtoras de ácido xilônico foram caracterizados em diferentes condições de produção.

Os resultados aqui obtidos demonstram pela primeira a capacidade de linhagens de *Komagataella phaffii* produzirem ácido xilônico, e em especial a utilização dessa levedura para conversão de açúcares em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é formada por fibras de celulose emaranhadas por hemicelulose e lignina (Figura 1). A lignocelulose está associada à parede celular das células vegetais proporcionando-lhes sustentação. A quantidade de celulose, hemicelulose e lignina presente na parede celular varia de acordo com cada planta (Tabela 1). O bagaço de cana, por exemplo, é constituído por 10-25% de lignina, 40-60% de celulose e de 30-40% de hemicelulose (CGEE 2010).

A celulose, por estar presente na parede celular dos vegetais, é o polissacarídeo mais abundante na Terra. É um homopolissacarídeo formado por moléculas de D-glicopiranosose ligadas umas às outras por ligações do tipo β -1,4. Ela pode ser hidrolisada em unidades menores chamadas de celobiose, que por sua vez, pode ser convertida em resíduos de glicose (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008) (Figura 1). A glicose é o açúcar C6 (açúcares com 6 carbonos) mais utilizado por organismos como fonte de carbono.

A hemicelulose é um polímero formado por diferentes monômeros de açúcares (pentose e hexoses) ligados uns aos outros por diferentes tipos de ligações (BERGENSTRÄHLE et al., 2010). Hemiceluloses são normalmente mais fáceis de hidrolisar quando comparadas com a celulose, porém certas estruturas oligoméricas são recalcitrantes devido às suas ramificações complexas e aos seus padrões de acetilação (AGGER; VIKSØ-NIELSEN; MEYER, 2010). A hemicelulose, segundo maior componente da parede celular, quando hidrolisada libera diversos açúcares, C6 e C5 (açúcares de 5 carbonos). Desses açúcares, a pentose xilose é o que se encontra em maior porcentagem, quase 60% da hemicelulose (Figura 1).

A lignina é uma macromolécula hidrofóbica constituída por três unidades básicas de monolignóis: cumérico, coniferílico e sinapílico (Figura 1). Na lignocelulose, a lignina está ligada aos carboidratos por ligações do tipo éter ou éster (CHEN; DIXON, 2007).

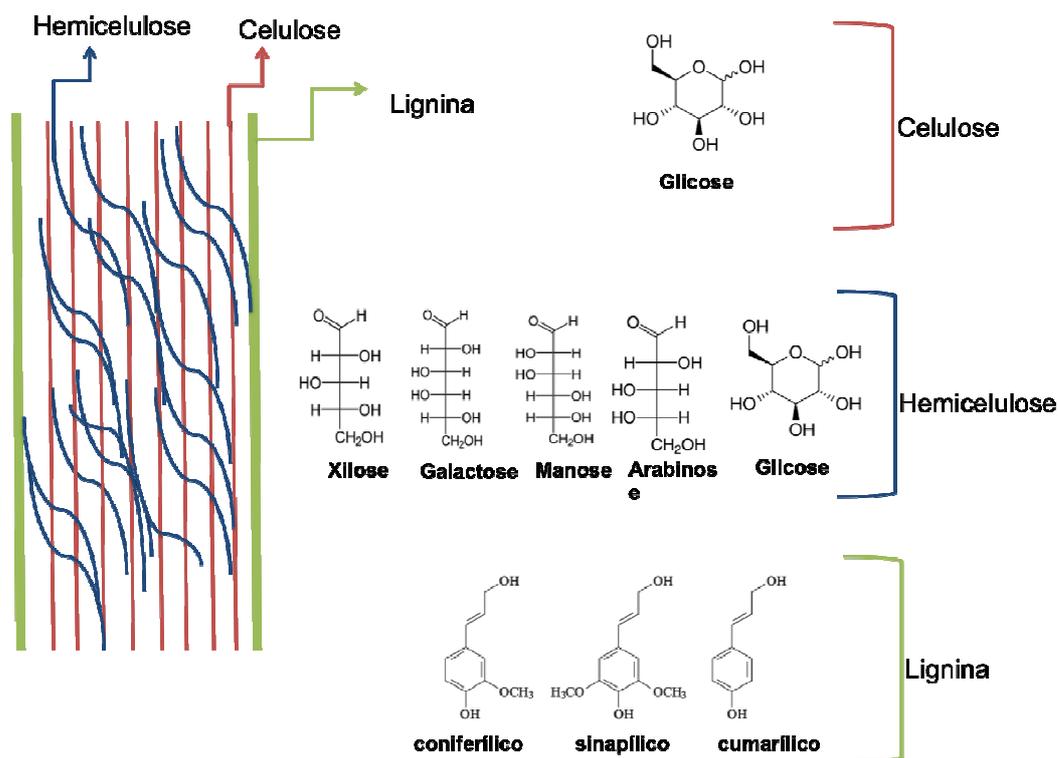


Figura 1: Principais componentes da lignocelulose.

Tabela 1: Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina de diversos tipos biomassas (Adaptado de (KIM, 2018)).

Bagaço	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referências
Cana-de-açúcar	43.1	31.1	11.4	(MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007)
Palha de milho	37.0	22.7	18.6	(KIM et al., 2016)
Palha de arroz	31.1	22.3	13.3	(CHEN et al., 2011)
Palha de trigo	30.2	21.0	17.0	(BALLESTEROS et al., 2006)
Palha de centeio	30.9	21.5	22.1	(GARCÍA-CUBERO et al., 2009)
Cevada	33.6	37.2	19.3	(KIM; TAYLOR; HICKS, 2008)
Capim elefante	29.5	20.3	17.8	(LI et al., 2010b)
Sorgo doce	27.3	13.1	14.3	(LI et al., 2010a)

2.2 Uso da biomassa em bioprocessos

A produção de combustíveis e químicos a partir de fontes renováveis é desejado por reduzir impactos ambientais e por reduzir a dependência do petróleo. O etanol produzido no Brasil e nos Estados Unidos, a partir da cana-de-açúcar e milho, respectivamente, é um bom exemplo de sucesso nesse sentido. Porém a demanda brasileira e mundial por combustíveis e químicos renováveis aumenta a cada ano. A produção de etanol de segunda geração, o qual é baseado no uso de lignocelulose, tem sido a principal opção avaliada para aumento da produção. A lignocelulose é atraente por ser um substrato barato e disponível mundialmente o qual engloba, entre outros, resíduos agroindustriais (ASSUNÇÃO; CGEE, 2010).

O Brasil produz milhões de toneladas de resíduos agroindustriais anualmente, no ano de 2017/18 a produção de cana-de-açúcar alcançou mais de 640 milhões de toneladas, gerando aproximadamente 160 milhões de toneladas de bagaço (UNICA, 2018). Assim, o desenvolvimento de processos de produção de etanol de biomassa lignocelulósica representa uma grande oportunidade para aumentar a produção de etanol. Estima-se que se etanol fosse produzido a partir da lignocelulose do bagaço de cana, a quantidade produzida aumentaria em aproximadamente 40% por unidade de área plantada com cana-de-açúcar (STAMBUK et al., 2008). Mas para isso, o Brasil ainda precisa desenvolver rotas tecnológicas para o desenvolvimento do processo de produção.

Diferentes configurações de processo têm sido propostas para a produção de etanol de biomassa lignocelulósica. Entretanto algumas etapas são comuns independentemente do tipo de biomassa, microrganismo e hidrólise do substrato utilizados, sendo elas i) o pré-tratamento, ii) a hidrólise e iii) a fermentação.

O pré-tratamento tem por objetivo reduzir a recalcitrância da biomassa e facilitar o processo de hidrólise. Na hidrólise os polímeros celulose e hemicelulose (dependendo do pré-tratamento) são quebrados por enzimas

hidrolíticas a seus monômeros. Na fermentação, os açúcares são finalmente convertidos a etanol (Figura 2) (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007).

Microrganismos são essenciais tanto no processo de hidrólise da biomassa quanto na fermentação. Na hidrólise eles atuam como produtores de enzimas hidrolíticas, enquanto na fermentação são essenciais para a conversão dos açúcares a etanol/ outros metabólitos (MEHTIÖ et al., 2016).

Embora monômeros de hexose sejam eficientemente utilizados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual é utilizada na produção industrial de etanol, a eficiente bioconversão de pentoses a etanol continua sendo uma barreira tecnológica (KIM et al., 2013). Entre as pentoses, encontra-se a xilose, que é o C5 mais abundante no planeta. No bagaço de cana, por exemplo, a xilana (polímero de xilose) corresponde a aproximadamente 33% do total de açúcares disponíveis para fermentação (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). Portanto, a utilização de leveduras capazes de fermentar esse açúcar em condições industriais permitirá um aumento significativo no rendimento de etanol do processo. De fato, fermentação de hidrolisados de biomassa com linhagens microbianas capazes de fermentar xilose resultaram em maior concentração final, rendimento e produtividade de etanol ao final do processo em escala laboratorial (KIM et al., 2013).

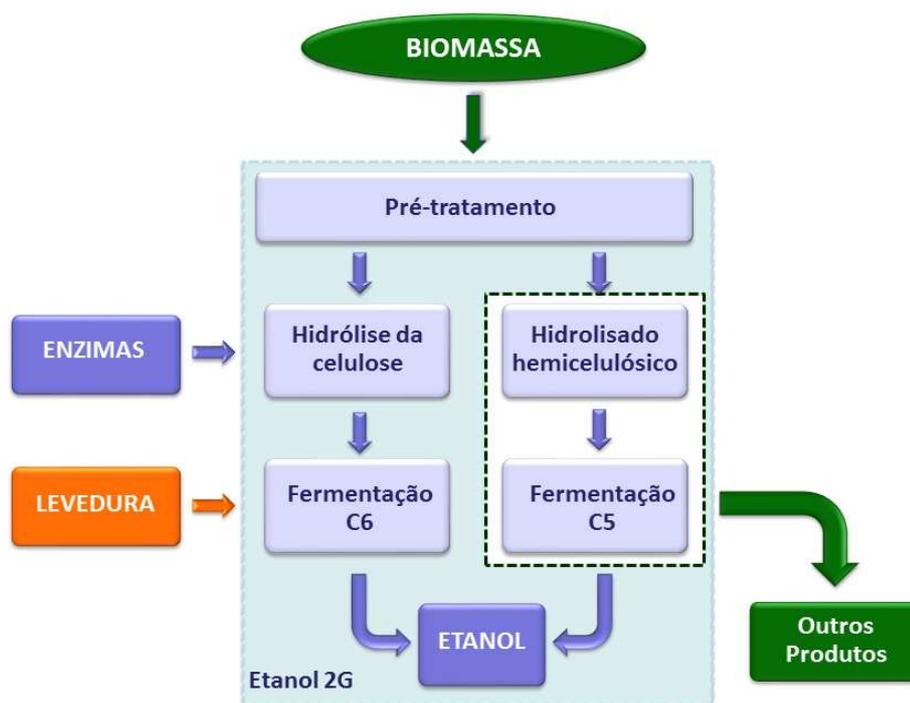


Figura 2: Esquema demonstrando as principais fases para o processo de produção do bioetanol no Brasil

O desenvolvimento de biorefinarias é baseado na integração de processos de conversão de biomassa para a produção de combustíveis, energia e produtos químicos. Dentro desta linha, diversos grupos têm trabalhado no conceito de biorrefinarias, onde cada fração da biomassa pode ser empregada em um processo diferente (ALMEIDA; HONG E NIELSEN, 2012). De fato, a valorização da biomassa através da produção de metabólitos microbianos via processos fermentativos tem sido substancialmente avaliada (MENON E RAO, 2012), inclusive plantas piloto ou industriais para produção de biocombustíveis e outros químicos de origem renovável já estão em operação em diferentes partes do mundo. Citando-se, por exemplo, butanol e etanol lignocelulósico, isobutanol, ácido 3-hidroxipropiônico, ácido succínico, 1,3-propanodiol, antibiótico cefalexina e vitamina B2 (riboflavina) e outros químicos (HONG E NIELSEN, 2012).

Além do apelo ambiental para produção de químicos renováveis, deve-se considerar que o mercado mundial de produtos químicos envolve valores em torno de USD 100 bilhões ao ano, onde cerca de 3% desse montante diz respeito aos bioprodutos, ou derivados da biomassa, havendo uma estimativa

de aumento desta participação total para 25% até o ano 2025 (VIAJAYENDRAN, 2010).

No Brasil, esforços têm sido feitos de modo a se levantar o potencial econômico da biomassa lignocelulósica segundo a visão da utilização de fontes renováveis para o desenvolvimento de uma química sustentável nacional (CGEE, 2010). Porém, o número de trabalhos voltados exclusivamente para o aproveitamento tecnológico dos coprodutos e resíduos agroindustriais ainda é pequeno, excetuando-se aqueles mais voltados para a obtenção de etanol lignocelulósico (ou etanol de segunda geração). Neste contexto, é importante destacar que i) a indústria química brasileira importa quase que em sua totalidade compostos de alto valor agregado para uso, principalmente, em química fina, não tendo tecnologia nacional desenvolvida que possa inverter o déficit atual deste setor, acima de USD 25 bilhões no ano de 2011 (ABIQUIM); ii) a necessidade de intermediários de síntese, principalmente para fármaco-químicos, pode abrir oportunidades tão interessantes quanto a busca por bloco-construtores.

Desta forma, o aproveitamento da xilose presente na fração hemicelulósica, por exemplo, remanescente da produção de etanol lignocelulósico da biomassa de cana, oferece uma excelente oportunidade para o maior desenvolvimento de biorrefinarias no Brasil. A produção de químicos a partir da xilose evitará a eliminação de resíduos e simultaneamente ajudará na viabilização econômica do processo de produção de biocombustíveis, além de dar suporte ao desenvolvimento da indústria química brasileira. Neste sentido, bioprocessos que visem à utilização da xilose para produção de compostos químicos com ampla aplicabilidade na indústria e que tenham sido pouco explorados por empresas nacionais ou multinacionais e/ou grupos de pesquisa, que detém várias patentes na área, terão maior chance de sucesso. Grandes empresas da área química como Braskem, Dow, Evonik e Petrobras, têm apostado no uso da xilose para a obtenção de “produtos verdes” em substituição a petroquímicos não renováveis. Neste contexto, bloco-construtores se destacam na busca pelo desenvolvimento de rotas de síntese.

2.3 Xilose em bioprocessos

Conforme mencionado anteriormente, a xilose é uma pentose encontrada na parede celular de plantas. Enquanto que a glicose é amplamente utilizada por diversos organismos, a xilose é utilizada por um número restrito de microrganismos (KIM; WOO, 2018).

A xilose pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis (etanol) (MATSUSHIKA et al., 2009), polióis (d-arabitol e d-xilitol) (ERICKSON; NELSON; WINTERS, 2012), glicolipídeos (MONDALA et al., 2013), químicos de interesse (furfural e 2,3-butanodiol) (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009), e ácidos orgânicos (ácido acético e ácido xilônico) (TOIVARI et al., 2012b) (Figura 3), dentre outros.

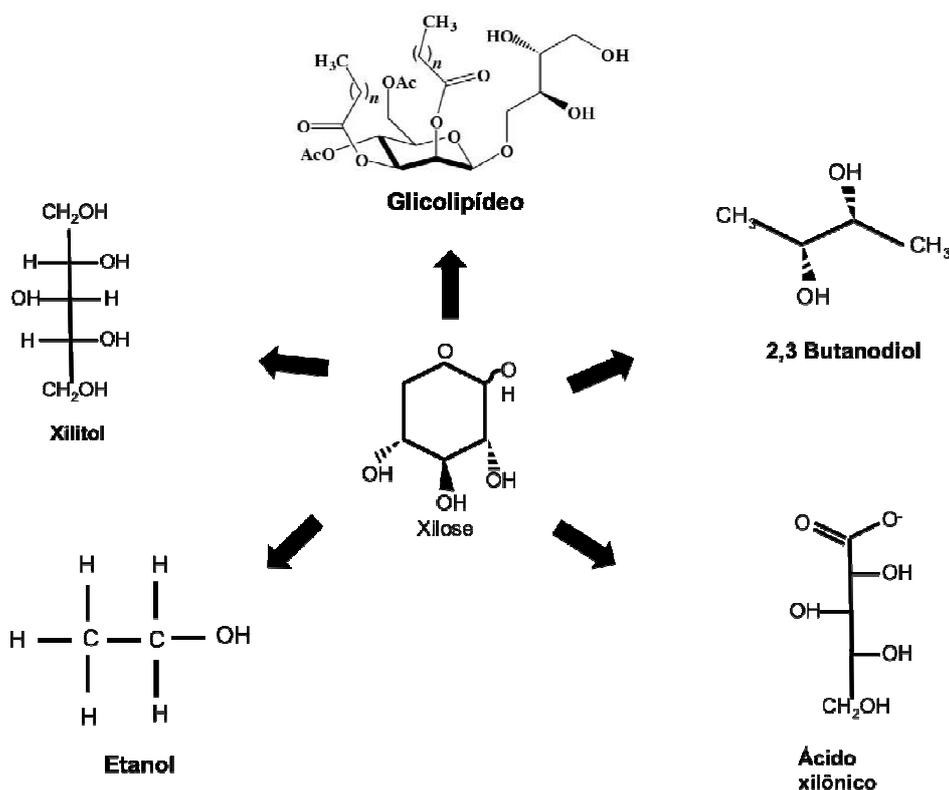


Figura 3: Xilose e exemplos de compostos que podem ser obtidos, por microrganismos, a partir da xilose.

O etanol pode ser produzido de forma natural, a partir da xilose, por certos tipos de microrganismos tais como *Spathaspora passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis* (VERAS; PARACHIN; ALMEIDA, 2017). Atualmente existem diversos estudos que visam melhorar essa produção de etanol, a partir

de xilose, usando essas duas leveduras. Outra linha de estudos para viabilizar a produção de etanol usando a xilose como substrato é a modificação genética de *S. cerevisiae*. Essa levedura não é capaz de utilizar a xilose para a produção de etanol apesar de possuir os genes da via oxo-redutiva de xilose (MATSUSHIKA et al., 2009).

Tanto o xilitol quanto o arabitol são polióis que podem ser formados usando xilose como substrato. Esses polióis possuem aplicações nas nas indústrias alimentícias e farmacêuticas e podem ser usados para adocicar, texturizar, humectar e estabilizantes (ERICKSON; NELSON; WINTERS, 2012). Para a produção destes polióis podem ser usadas algumas leveduras tais como *Debaryomyces hansenii* (KUMDAM; NARAYANA MURTHY; GUMMADI, 2013), *Pichia manchurica* (SUNDARAMOORTHY; GUMMADI, 2019) e *Komagataella pastoris* (ARAÚJO et al., 2017).

O 2,3-butanodiol é um químico que pode ser usado como base para a fabricação de diversos outros produtos tais com: borrachas, agentes anticongelantes e aditivos para combustíveis (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009). Para a produção do 2,3-butanodiol em microrganismos, usando a xilose como substrato, a levedura *S. cerevisiae* foi modificada geneticamente primeiro para a produção do químico e depois para a utilização da xilose (KIM et al., 2017). A bactéria *Enterobacter aerogenes* também foi modificada para a produção de 2,3-butanodiol a partir de xilose (UM et al., 2017).

A produção de glicolipídeos, a partir de microrganismos vem sendo estudada como uma fonte para a produção de biocombustível usado na aviação, pois foi visto que microrganismos que conseguem acumular lipídeos, tidos como oleaginosos, podem ter até 80% do seu peso seco na forma de lipídeos (MONDALA et al., 2013). As leveduras *Rhodotorula glutinis* (BABAU et al., 2013), *Candida curvata* (EVANS; RATLEDGE, 1983) e *Trichosporum cutanaeum* (HU et al., 2011), assim como os fungos *Mortierella isabelina* (GAO et al., 2013a) e *Cunninghamella echinullata* (FAKAS et al., 2009) estão sendo estudados para melhorar a sua produção de lipídeos usando xilose como substrato.

A xilose também pode ser usada por microrganismos para produção de ácidos orgânicos. O ácido xilônico é um exemplo de ácido orgânico que pode ser produzido a partir de xilose e utilizado como um substituto do ácido

glucônico nas indústrias químicas, alimentícias e de construção (TOIVARI et al., 2012b). Dentre os microrganismos que foram modificados para a sua produção encontra-se as leveduras: *S. cerevisiae* (TOIVARI et al., 2012a) e *Pichia kudriavzevii* (TOIVARI et al., 2013) e a bactéria *E. coli* (LIU et al., 2012).

2.4 Ácidos Orgânicos

Ácidos orgânicos são compostos orgânicos com propriedades ácidas que possuem o grupo funcional carboxila (COOH). A maioria dos ácidos orgânicos, são ácidos fracos e podem ser produzidos por organismos. Comercialmente, ácidos orgânicos podem ser produzidos por rotas químicas ou biológicas e podem ter diversos usos na indústria. Os ácidos cítrico, láctico, glucônico, acético e succínico são alguns exemplos de ácidos orgânicos (Figura 4) (DE LEDERKREMER; MARINO, 2003).

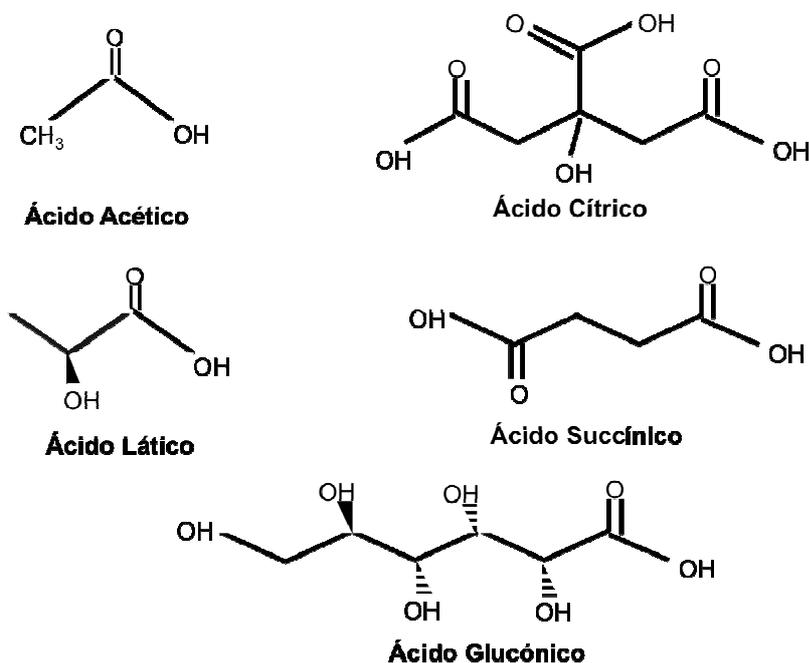


Figura 4: Estrutura química de alguns dos principais ácidos orgânicos.

Ácido láctico pode ser usado na produção de biopolímeros tais como o polilactato (PLA). Diversos microrganismos podem ser usados na produção de ácido láctico tais como as bactérias do ácido láctico (*Lactic Acid Bacteria* - LAB) e fungos do gênero *Rhizopus*. Uma vantagem na produção de ácido láctico por

rota microbiana em relação à rota química é que os microrganismos produzem a forma pura de *D* ou *L* ácido láctico, enquanto que a rota química sempre produz uma mistura racêmica dos isômeros de ácido láctico (CHEN; NIELSEN, 2016). Diversos microrganismos já foram modificados para a produção de ácido láctico entre eles a levedura *K. phaffii* (DE LIMA et al., 2016).

Ácido cítrico foi o primeiro ácido orgânico produzido por microrganismos em escala industrial. Sua produção usa o fungo filamentosso *Aspergillus niger* em um processo de fermentação submersa. O ácido cítrico pode ser usado na indústria alimentícia para a conservação de alimentos e amaciamento de carnes. Nas indústrias farmacêutica e cosmética como antioxidante em cremes para a pele (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013).

O ácido succínico pode ser usado na produção de 1,4-butanodiol (BDO), poliésteres biodegradáveis e do solvente tetrahidrofurano (THF). Atualmente a bactéria *E. coli* modificada geneticamente é utilizada para a produção em escala industrial desse ácido. Ainda se utiliza glicose obtida de cana-de-açúcar ou milho para a produção do ácido succínico porém existe uma pressão para que passe a se utilizar matérias não-alimentícios como biomassa e glicerol (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2015).

O ácido glucônico pode ser encontrado naturalmente em plantas, frutas e mel ou produzido por diferentes microrganismos como: *Pseudomonas ovalis*, *Gluconobacter oxydans*, *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus niger* (RAMACHANDRAN et al., 2006). Atualmente, a indústria utiliza o fungo *Aspergillus niger* em um processo de fermentação submersa para a produção desse ácido, usando glicose como substrato e a enzima glicose oxidase. O ácido glucônico pode ser usado nas indústrias alimentícias, químicas, farmacêuticas e de construção civil (SINGH; KUMAR, 2007).

2.5 Produção de Ácido xilônico

O ácido xilônico começou a ser estudado a partir de 1990. Suas propriedades químicas fazem desses ácidos um possível substituto para o ácido glucônico. O ácido xilônico pode ser utilizado na indústria alimentícia para conservar os alimentos e para realçar sabores; na indústria química, como

bloco construtor e precursor de vários outros químicos de interesse tais como: 1,2,4-butanotriol, que pode ser usado para a produção de polímeros; na indústria farmacêutica como antimicrobiano, e na indústria de construção como um agente dispersante do cimento (TOIVARI et al., 2012b).

Uma das vantagens na substituição do ácido glucônico pelo ácido xilônico é que a xilose não é utilizada como alimento pelos seres humanos, como acontece com a glicose. Outra vantagem da utilização do ácido xilônico é que por possuir um alto valor de mercado potencial ele pode agrega valor a produção do bioetanol nas biorefinarias, tornando assim todo o processo mais economicamente viável (TOIVARI et al., 2012b).

O ácido xilônico é um ácido orgânico fraco, que pode ser obtido por via química (Figura 5) ou por via microbiana com a enzima xilose desidrogenase (Figura 6). A produção do ácido xilônico pela via química envolve a eletro-oxidação da D-xilose usando eletrodos de platina ou ouro em meio alcalino. A via química de produção do ácido xilônico também é utilizada para síntese de outros ácidos orgânicos, em menor escala, como ácido glicérico, fórmico e glicólico (GOVERNO et al., 2004). A produção de ácido xilônico por via química ainda está em escala laboratorial.

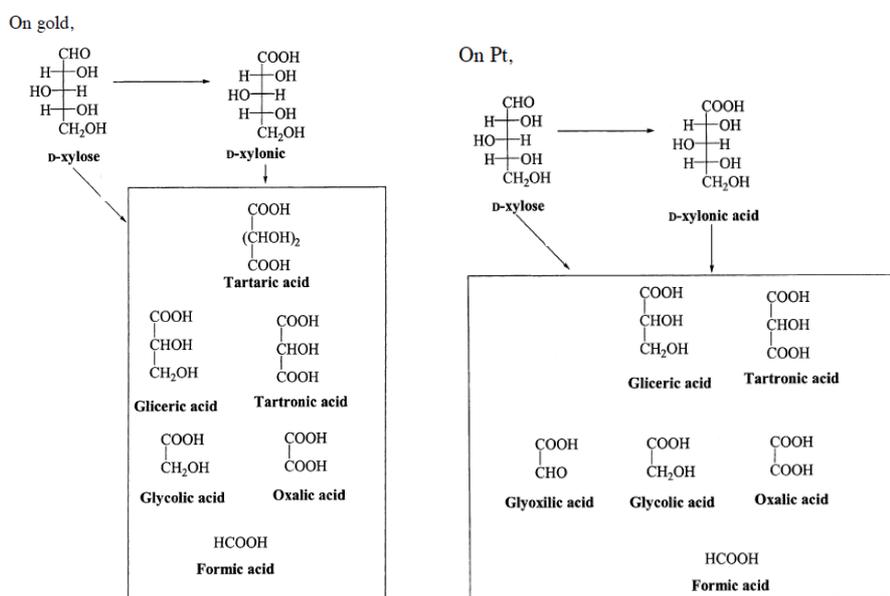


Figura 5: Rota química de produção do ácido xilônico utilizando eletrodos de ouro e platina, respectivamente, em meio alcalino (Adaptada de GOVERNO et al., 2004)

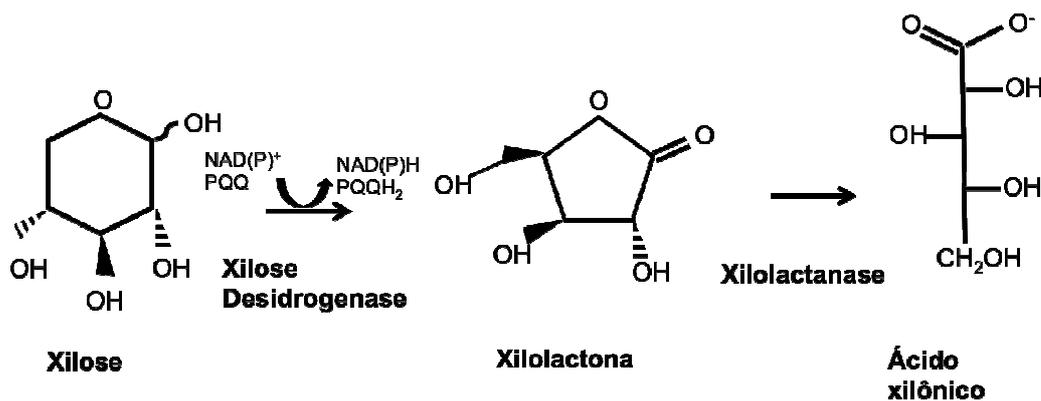


Figura 6: Rota microbiana de produção de ácido xilônico utilizando D-xilose e a enzima xilose desidrogenase.

Na via microbiana, o ácido xilônico é produzido pelo intermédio da enzima xilose desidrogenase (Figura 6). Desidrogenases (EC 1) são enzimas oxiredutoras que fazem a transferência de íons de hidrogênio para uma molécula aceptora. As desidrogenases podem atuar em diferentes substratos levando a uma maior especificação da enzima tais como álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1 e 2), glicerol desidrogenase (EC 1.1.1.6) e a xilose desidrogenase (EC 1.1.1.175 e 179).

A xilose desidrogenase vai atuar na D-xilose oxidando-a à xilolactona usando $\text{NAD}^{(+)}$ ou $\text{NADP}^{(+)}$ como cofatores da reação. Numa segunda reação a xilolactona vai ser hidrolisada gerando ácido xilônico. Essa segunda etapa da reação ocorre de maneira espontânea, ou também, pode ser realizada pela enzima xilolactanase (TOIVARI et al., 2012b).

A via de oxidação da xilose é mais comumente encontrada em Archaea mas também é possível ser encontrada em algumas bactérias e fungos (VALDEHUESA et al., 2018). A produção de ácido xilônico por microrganismos é possível porque este é um intermediário da via metabólica de assimilação de xilose naturalmente encontrada em alguns microrganismos, os quais são capazes de utilizar esse açúcar com fonte de carbono. De fato, após a formação do ácido xilônico o mesmo é convertido em ácido 2-ceto-3-deoxi-D-xilônico (KDX), pela ação da enzima xilonato desidratase. O KDX é então convertido em glicaldeído e piruvado, sendo esses dois compostos assimilados pelo ciclo celular (Figura 7). Em outros microrganismos, a xilose é assimilada por via redutiva, empregando as enzimas xilose redutase/xilitol

desidrogenase ou xilose isomerase, as quais resultam na formação de xilulose-5-P (Figura 7). Este último é metabolizado via das pentoses fosfato e glicólise levando à formação de piruvato.

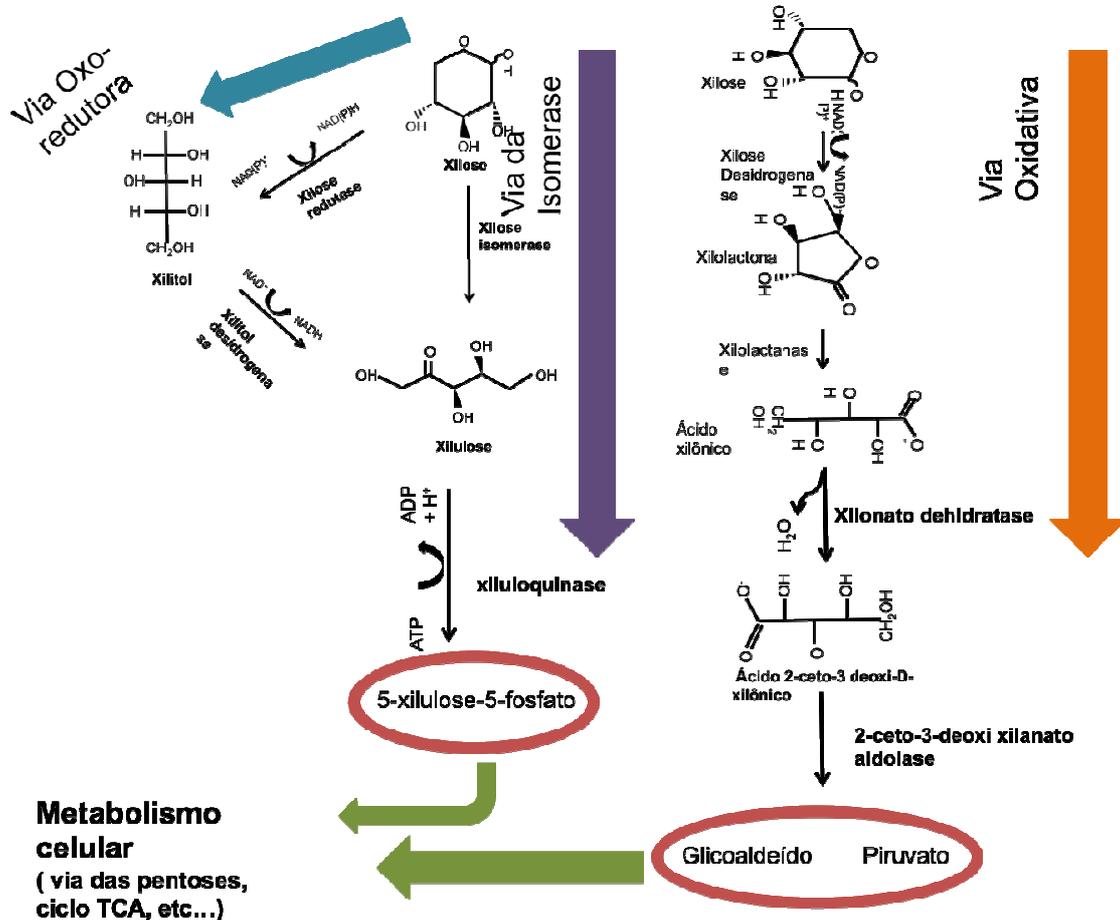


Figura 7: Principais vias do metabolismo de xilose encontrado em microrganismos: via oxido-redutora (seta azul); via da isomerase (seta roxa) e via oxidativa (seta laranja).

Caulobacter crescentus, *Gluconobacter oxydans*, *Pseudomonas fragi*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Acetobacter* sp. são alguns microrganismos capazes de produzir ácido xilônico naturalmente. Nas bactérias a xilose desidrogenase ou glicose desidrogenases ficam no periplasma e usam a piroloquinolona quinol (PQQ) ou NADP⁽⁺⁾ como cofatores para transferir elétrons ao citocromo c na cadeia respiratória (TOIVARI et al., 2012b).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro microrganismo modificado geneticamente para a produção de ácido xilônico. Primeiramente foi introduzido o gene de xilose desidrogenase, *XYD1* oriundo do fungo filamentoso *Trichoderma reesei*. A levedura foi capaz de produzir 3,8 g/L de ácido xilônico. Em seguida o mesmo grupo deletou o gene *GRE3* da levedura

(ortólogo do gene que codifica para xilose redutase), porém não foi visto uma melhora na produção de ácido (TOIVARI et al., 2010). Em seguida foi introduzido o gene *xyIB*, que codifica para uma xilose desidrogenases da bactéria *C. crescentus*. A levedura foi capaz de produzir 17 g/L de ácido xilônico. Para melhorar a produção de ácido, o grupo deletou o gene *GRE3*, natural da levedura, e expressou o gene de xilolactanase *xyIC*, também de *C. crescentus*. Com isso a produção final de ácido xilônico alcançou 43 g/L de ácido xilônico e um rendimento de 0,8 g/g (Tabela 2) (TOIVARI et al. 2012a).

Escherichia coli foi a primeira bactéria modificada geneticamente para produzir ácido xilônico. O grupo usou os mesmos genes (*xyIB* e *xyIC*) de *C. crescentus* empregados em *S. cerevisiae*. Após os primeiros testes decidiu-se interromper os genes *xyIA* e *xyIB*, naturais da bactéria, que codificam para xilose isomerase e xiluloquinase para que não houvesse um desvio da xilose para essa segunda via metabólica. Com isso o grupo foi capaz de ter um rendimento de 0,98 g/g de ácido xilônico (Tabela 2) (LIU et al. 2012).

Kluyveromyces lactis foi modificada usando o gene *XYLD1* de *T. reesei* que codifica para uma xilose desidrogenase. Em seguida o grupo fez a deleção dos genes *xyI1* e *xyI2*, naturais de *K. lactis*, que codificam para uma xilose redutase e uma provável xilitol desidrogenase, respectivamente em duas linhagens diferentes. Foi visto que a linhagem que sofreu a deleção do gene de xilose redutase favoreceu a produção de ácido enquanto que a linhagem que sofreu a deleção do gene de xilitol desidrogenase diminuiu sua produção. Ao final a levedura foi capaz de produzir ácido xilônico com um rendimento de 0,6 g/g (Tabela 2) (NYGÅRD et al. 2011).

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* foi modificada para a coprodução de ácido glucônico e ácido xilônico. A bactéria já possuía a via de oxidação de xilose, necessária para produção de ácido xilônico, por tanto foi somente deletado o gene *gag*, que codifica para uma gluconato desidrogenase, para que assim a bactéria fosse capaz de acumular os ácidos xilônico e glucônico produzidos. A linhagem recombinante de *K. pneumoniae* foi capaz de chegar a um rendimento de 1.0 g/g, o que equivale ao máximo teórico, de ácido xilônico usando hidrolisado de bambu (Tabela 2) (WANG et al.,2016).

A levedura *Pichia kudriavzevii* também foi modificada para a produção de ácido xilônico, usando o gene *xyIB* de *C. crescentus*, e chegou a um

rendimento de 1.0 g/g de ácido e produtividade de 1.4 g.L⁻¹.h⁻¹ em pH 5.5 e 1.2 g.L⁻¹.h⁻¹ em pH 3 (Tabela 2)(TOIVARI et al.,2013).

Mais recentemente a levedura *Candida glycerinogenes* foi modificada usando o gene *xyiB* de *C. crescentus*. O grupo modificou o promotor pGUKd, que é induzido em pHs baixos usando o promotor do gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (pGAP) combinado com uma sequência do gene de guanilatoquinase (pGUK1) para a produção do ácido. *C. glycerinogenes* foi capaz de produzir 38 g/L de ácido em um pH de 2.5 (Tabela 2) (JI et al., 2017a).

Tabela 2: Microrganismo modificados para a produção de ácido xilônico. Parâmetros de produção e genes empregados.

Microrganismo	Genes expressos	Organismo doador	Rendimento (g _{ax} /g _x)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Referências
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>xyiB</i> e <i>xyiC</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>	0.8	0.36	(TOIVARI et al. 2012a)
<i>Escherichia coli</i>	<i>xyiB</i> e <i>xyiC</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>	0.98	1.09	(LIU et al. 2012),
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>XYLD1</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	0.6	0.16	(NYGÅRD et al. 2011)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>gag</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.0	*	(WANG et al.,2016)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>xyiB</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>	1.0	1.40	(TOIVARI et al.,2013)
<i>Candida glycerinogenes</i>	<i>xyiB</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>	0.76	0.79	(JI et al., 2017b)

2.6 *Komagataella phaffii*

O gênero *Komagataella* foi proposto em 1995 por Yamada et al. após análises das sequências de D1/D2 de rRNA para reclassificar a levedura previamente conhecida como *Pichia pastoris*. Dentro desse novo gênero, criado para acomodar a espécie *Pichia pastoris*, estão inseridas as espécies *Komagataella pastoris*, *Komagataella phaffii* e *Komagataella pseudopastoris* (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). As três espécies de *Komagataella* não demonstram diferenças visíveis nos testes de fermentação e assimilação comumente usados em taxonomia de leveduras, por essa razão a espécie *K. phaffii* foi classificada dentro a espécie *K. pastoris* até que análises nas sequencias de rDNA provaram que elas eram espécies diferentes (KURTZMAN, 2005).

Assim como as outras espécies do gênero *Komagataella*, *K. phaffii* possui a capacidade de crescer utilizando metanol como substrato. Essa capacidade se dá pela presença dos genes *AOX1* e *AOX2*, que codificam para enzima álcool desidrogenase (AOX). Na presença de metanol esses genes são ativados, produzindo a enzima AOX, que faz a oxidação do metanol à formaldeído e gerando peróxido de hidrogênio durante esse processo. Toda essa etapa de oxidação do metanol se passa dentro de peroxissomos espalhados dentro da levedura já que o peróxido de hidrogênio é tóxico para a célula (CREGG et al., 2000).

A capacidade da levedura de metabolizar metanol aliada com a sua capacidade de chegar a altas densidades celulares, sua capacidade de n-glicosilar similar à de células de mamíferos, e técnicas de manipulação genéticas similares às de *S. cerevisiae* fizeram da *K. phaffii* um sistema alvo para a expressão de enzimas heterólogas (CREGG et al., 1998).

Além de capacidade de utilização de metanol como fonte de carbono, *K. phaffii* também consegue usar o glicerol de maneira eficiente como fonte de carbono para o seu crescimento. Uma possível explicação para essa eficiente utilização do glicerol é a presença de 4 genes, no genoma da levedura, que codificam para proteínas de simporte H⁺/ glicerol (MATTANOVICH et al., 2009).

Para se fazer uso de técnicas de manipulação genética um dos promotores mais utilizados é o AOX, derivado dos genes *aox1* e *aox2*. Esse promotor é usado em vetores de expressão induzidos pelo acréscimo de metanol ao meio de cultura, o que permite um controle da expressão do gene alvo pela indução com metanol. Esse tipo de expressão pode ser vantajoso quando o gene de interesse se mostra tóxico para a levedura. O vetor pPICZαA é um exemplo de vetor de expressão em *K. phaffii* que utiliza o promotor AOX (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Outro tipo de promotor existente para expressão em *K. phaffii* é o GAP. Esse promotor está presente no gene *GAP* que codifica para a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Ele é um promotor constitutivo, ou seja, o gene alvo não precisa do acréscimo de uma molécula indutora no meio de cultura para a sua ativação, ele é continuamente expresso. O vetor pGAPZB é um exemplo de vetor de expressão em *Komagataella phaffii* que utiliza o promotor GAP (CREGG et al., 2000).

Foi apenas após o sequenciamento do seu genoma que *K. phaffii* começou a ser usada para produção de metabólitos por engenharia metabólica. O primeiro metabólito produzido em *K. phaffii* foi a superexpressão de S-adenosil-L-metionina (SAM), um componente do metabolismo de enxofre que age como doador de metil em diversas reações bioquímicas (HE et al., 2006). A partir de então diversos metabólitos começaram a ser produzidos em *K. phaffii* tais como: D-arabitol e xilitol (CHENG et al., 2014), isobutanol e isobutil (SIRIPONG et al., 2018) e ácido 6-metil-salicílico (GAO et al., 2013b).

DE LIMA et al., (2016) conseguiu, de maneira eficiente, produzir ácido láctico usando a levedura *K. phaffii*, modificada geneticamente, como organismo hospedeiro. Eles utilizaram o gene *LDHb* proveniente de *Bos taurus* na levedura e avaliaram a produção do ácido. Em seguida um novo transportador de lactato chamado PAS foi introduzido e a capacidade de produção de ácido láctico, da levedura, foi novamente avaliada e comparada com a capacidade de uma linhagem utilizando o transportador Jen1p. Esse estudo reforça a capacidade dessa levedura de produzir, eficientemente, ácidos orgânicos.

Apesar de possuir em seu genoma os genes necessários para o metabolismo de xilose, a levedura *K. phaffii* não consegue utilizar a xilose como fonte de carbono para o seu crescimento. Essa característica aliada a sua capacidade de crescimento em baixos pH tornam ela uma forte candidata a produção de ácido xilônico (LI et al., 2015).

3 OBJETIVOS:

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver processo de produção de ácido xilônico com linhagens recombinantes de *Komagataella phaffii*.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar genes que codificam para xilose desidrogenase (XDH);
- 2) Construir linhagens recombinantes de *K. phaffii* expressando diferentes genes que codificam para XDH;
- 3) Avaliar a capacidade de produção de ácido xilônico pelas linhagens recombinantes em frasco;
- 4) Avaliar a capacidade de produção de ácido xilônico pelas melhores linhagens recombinantes em biorreator;
- 5) Avaliar capacidade de produção de ácido xilônico pelas linhagens recombinantes utilizando hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar como substrato.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

4.1 Microrganismos

As linhagens microbianas utilizadas nesse estudo foram:

Escherichia coli XL10GOLD:

TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]. (Os genes listados possuem mutações significantes nos alelos. Os genes localizados no F' episoma, entretanto, são do tipo selvagem a menos que sejam indicados de forma diferente.)

K. phaffii X-33: Prototrófica de GS115 (Invitrogen).

4.2 Vetores

Vetores de clonagem

Os vetores pMAT contendo os genes que codificam para desidrogenases foram recebidos da empresa GENEONE. Como exemplo, apresenta-se o mapa do vetor contendo o gene XDH-CC (Figura 8).

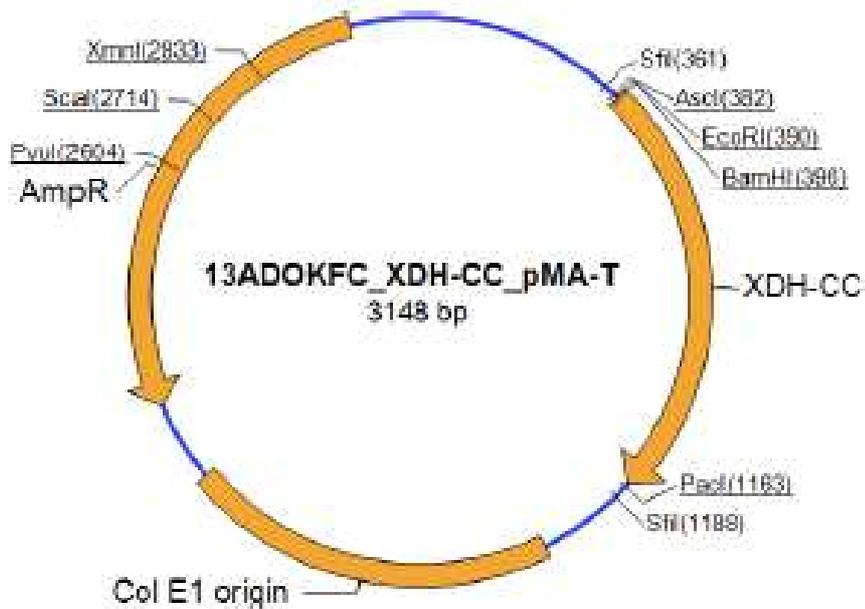


Figura 8: Mapa do vetor de clonagem em *E. coli* pMAT.

Vetor de expressão

O vetor de expressão para *K. phaffii* utilizado foi o pGAPZB (Figura 9) (Invitrogen). O plasmídeo pGAPZB é um vetor bifuncional que pode ser utilizado tanto em bactérias como em leveduras. Apresenta como marca de seleção o gene de resistência a zeocina. Além disso, possui o promotor constitutivo GAP e a região terminadora AOXtt.

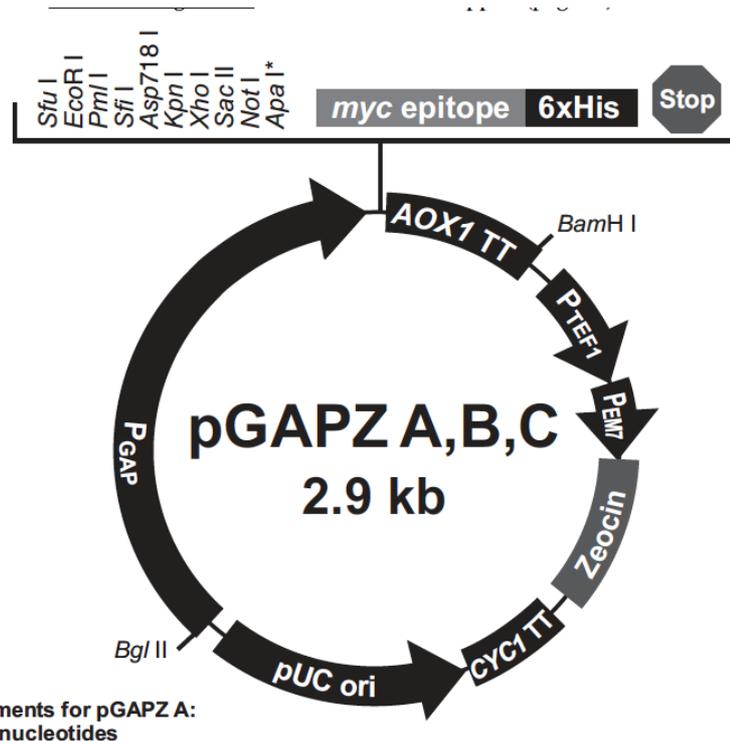


Figura 9: Mapa do vetor de expressão em *K. phaffii* pGAP.

4.3 Meios de cultura e soluções

FM22

- 4,29% KH_2PO_4
- 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0,2% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 1,43% K_2SO_4
- 1,17% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

PTM4

- 0,2% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- 0,008% NaI
- 0,3% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 0,02% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,002% H_3BO_3 ;
- 0,05% $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

- 0,05% $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,7% ZnCl_2 ;
- 2,2% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,01% H_2SO_4
- 0,02% biotina

LB

- Peptona 1%
- NaCl 1%
- Extrato de levedura 0,5%
- Ágar 1,5%

LB baixo sal

- Peptona 1%
- NaCl 0,5%
- Extrato de levedura 0,5%
- Ágar 1,5%

YPD

- Extrato de levedura 1%
- Peptona 2%
- Glicose 2%

YP

- Extrato de levedura 1%
- Peptona 2%

YPDS

- Extrato de levedura 1%
- Peptona 2%
- Glicose 2%

- Sorbitol 1 M
- Ágar 2%

SOB

- Triptona 2%
- Extrato de levedura 0,5%
- NaCl 0,05%
- KCl 250 mM 1%
- MgCl₂ 2 M 0,5%

Hidrolisado C5 diluído 20%

- O hidrolisado foi centrifugado
- O sobrenadante foi filtrado
- O pH foi ajustado para 5,5
- Autoclavado
- Diluído para 20% em fluxo laminar

Composição do Hidrolisado

O hidrolisado utilizado nesse estudo foi obtido pelo pre-tratamento por explosão a vapor de bagaço de cana-de-açúcar, seguido por hidrólise ácida da fração hemicelulósica.

Tabela 3 Composição do Hidrolisado utilizado

Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Furfural (g/L)	5-HMF (g/L)
1,85	5,08	95,24	21,62	3,13	0,38

Ao longo desse trabalho foram utilizados genes que codificam para xilose desidrogenase provenientes de bactéria e de fungos. Para os genes provenientes de bactérias usou-se itálico minúsculo (ex: *xyIB-ap*) e quando o

gene é proveniente de fungo usou-se itálico maiúsculo (ex: *xyIB-FM*). Esses genes foram clonados em plasmídeos (ex: pGAP- *xyIB-ap*) que por sua vez foram inseridos na levedura *K. phaffii*. Assim foram geradas linhagens (ex: P1BS6) de *K. phaffii* modificadas.

MÉTODOS

4.4 Identificação de possíveis genes que codificam para XDH

Primeiramente as sequências de aminoácidos das xiloses desidrogenases da bactéria *Caulobacter crescentus* e do fungo *Trichoderma reesei* foram utilizadas como molde para buscas de sequências com diferentes graus de similaridade no banco de dados NCBI ([www. blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)). A ferramenta BLASTx foi utilizada para permitir a busca por sequências de DNA do banco.

A partir dos resultados de similaridade, sequências de proteínas com grau de identidade de 50 a 70% de diferentes espécies foram escolhidas para construção de árvores filogenéticas. Foi montada uma árvore filogenética empregando o programa Geneious (Biomatters), utilizando sequências derivadas de bactérias e outra com sequências de fungos. Para tanto, foi feito um alinhamento das sequências utilizando o método Muscle e a partir desse alinhamento foram geradas as árvores: Modelo de distância genética: Jukes-Cantor; Método de construção das árvores: Neighbord-Joining; Método de reescalonamento: Bootstrap; Geração aleatória: 376, 575; Número de replicatas: 1000; Porcentagem de suporte limite: 50.

A partir das árvores filogenética, sequências gênicas foram escolhidas de forma a representar diferentes ramos.

4.5 Preparo de célula competente de *E. coli* para eletroporação

Para a transformação da bactéria *E coli* com os plasmídeos de interesse, antes foi preciso preparar as células para torná-las aptas a receber um DNA externo. Para tanto, foi seguido o seguinte protocolo de preparação de

células competentes para eletroporação adaptado (SAMBROOK AND RUSSEL; 2001).

Foi feito um pré-inóculo de 5 mL de meio LB e incubado no shaker à 37 °C e 200 rpm por 16 horas. Após esse período 4 mL do pré-inóculo foram inoculados em 2 L de meio SOB. Os frascos foram novamente incubados no shaker à 37 °C e 200 rpm até a OD₆₀₀ atingir 0,5-0,6, e em seguida incubados no gelo por 30 minutos. As células foram centrifugadas à 5000 x *g* por 20 minutos à 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 500 mL de glicerol 10% gelado. As células foram centrifugadas, pela segunda vez, à 5000 x *g*, por 20 minutos à 4 °C, o sobrenadante foi descartado e pellet foi ressuscitado em 120 mL de glicerol 10% gelado. As células foram centrifugadas, pela terceira vez, à 5000 x *g*, por 20 minutos à 4 °C, o sobrenadante foi descartado e pellet foi ressuscitado em 2 mL de meio SOB gelado. Por último as células competentes foram alíquotas em tubos eppendorfs, congeladas em banho de gelo seco com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 80 °C para serem usadas posteriormente.

4.6 Transformação de *E. coli*

A transformação de plasmídeos ou sistemas de ligação foi feita pela técnica de eletroporação. Utilizou-se uma adaptação do protocolo (SAMBROOK AND RUSSEL; 2001) em que se emprega 2 µL de DNA (80 ng/µL) e 100 µL de *E. coli* XL10GOLD competentes. A eletroporação foi realizada em cubeta com os seguintes parâmetros elétricos: 1,8 kV, 25 µF e 200 Ω. A seguir, as células foram ressuscitadas em 1 mL de meio LB e incubadas à 37 °C por 50 minutos. Foram, então, plaqueadas em placas com LB ágar, suplementado com o antibiótico de interesse, ampicilina (100 µg/mL) ou Zeocina (25 µg/mL), e deixadas na estufa 37 °C por 16 horas.

4.7 Miniprep e Maxi prep

O DNA plasmidial dos transformantes bacterianos foi extraído usando o kit de miniprep da Invitrogen (K2100-10) seguindo o seguinte protocolo de extração de DNA plasmidial.

Do inóculo, 3 mL foram centrifugados a 10.000 x g por 2 minutos. O sedimentado foi ressuspenso em 250 µL de solução R3 com Rnase A. Foi adicionado 250 µL de solução L7 e deixado por 5 minutos na bancada. Adicionou-se 350 µL de solução N4 e centrifugou-se por 10 minutos à 12.000 x g. O sobrenadante foi transferido para a coluna acoplada a um novo tubo e centrifugou-se por 1 minuto à 12.000 x g. O sobrenadante foi descartado e a coluna foi lavada com 700 µL de solução W9 e centrifugou-se por 1 minuto à 12.000 x g. Após a coluna foi lavada com 40 µL da solução TE e centrifugada por 1 minuto à 12.000 g. O DNA plasmidial foi então armazenado à -20°C

O DNA plasmidial dos transformantes foi extraído usando o kit de maxiprep. da Qiagen (K2100-10) seguindo o protocolo de extração de DNA plasmidial do fabricante. O protocolo segue no mesmo modelo do de miniprep descrito acima, porém utilizando maiores volumes.

4.8 Clonagem dos genes XDH no vetor de expressão pGAPZB

Para a ligação dos genes que codificam para XDH (*xyIB-ap*; *xyIB-bs*; *xyIB-bx*; *xyIB-cs*; *xyIB-fm* e *xyIB-hl*) no vetor de expressão foi utilizado 1 µL do vetor pGAP (50 ng/µL) (Invitrogen), 7 µL de DNA (10 ng/µL), 1 µL de tampão 10X T4 ligase (Thermo Scientific), 1 µL da ligase T4 (Thermo Scientific) (Tabela 4). A ligação foi deixada a 22 °C por 16 horas e depois 5 µL foram usados na transformação de 100 µL de *E. coli* XL10GOLD competentes. As células transformadas foram plaqueadas em placas de LB *low salt* ágar contendo zeocina [25 µg/mL] como antibiótico, e deixadas na estufa 37 °C por 16 horas.

Tabela 4: Reação de ligação dos genes no vetor pGAPZB.

Solução	Quantidade	Marca
Enzima T4 DNA ligase	1 µL	Thermo Scientific
Tampão 10X T4	1 µL	Thermo Scientific
Vetor pGAPZB	1 µL	-

DNA	7 µL	-
Total	10 µL	-

Ligação incubada por 16 horas à 4 °C.

4.9 Análise de restrição

De forma geral, os plasmídeos obtidos utilizando o kit de minipreparação foram digeridos conforme descrito na Tabela 5. Um gel de agarose 0,8% corado brometo de etídeo foi usado para visualizar a digestão.

Tabela 5: Digestão com as enzimas de restrição para a confirmação da clonagem no vetor pGAPZB.

Solução	Quantidade	Marca
Enzima <i>EcoR</i> I	0,5 µL	Thermo Scientific
Enzima <i>Xba</i> I	0,5 µL	Thermo Scientific
Tampão 10X Tango	4 µL	Thermo Scientific
DNA plasmidial (90-100 ng/ µL)	3 µL	-
Água ultrapura	12 µL	-
Total	20 µL	-

Digestão incubada por 2 horas à 37 °C.

4.10 Transformação de *K. phaffii*

Os plasmídeos pGAPZB-*xyIB* obtidos foram linearizados através de reação de digestão usando as enzimas de restrição *BspH* I (*xyIB-bs*; *xyIB-bx*; *xyIB-cs*; *xyIB-FM* e *xyIB-hl*) ou *Avr* II (*xyIB-ap*), incubada por 4 horas à 37 °C (Tabela 6). Um gel de agarose 0,8% foi usado para visualizar a digestão.

Tabela 6: Digestão para a linearização do vetor pGAPZB com os genes que codificam para XDH clonados.

Solução	Quantidade	Marca
Enzima <i>BspHI</i> / <i>Avr II</i>	2 μ L	Thermo Scientific
Tampão 10X <i>O</i> /Tango	4 μ L	Thermo Scientific
DNA plasmidial (1 mg/ μ L)	15 μ L	-
Água ultrapura	19 μ L	-
Total	40 μ L	-

Digestão incubada por 4 horas à 37 °C.

K. phaffii X-33 foi transformada por eletroporação utilizando os plasmídeos linearizados pGAPZB (pGAP-*xyIB-ap*; pGAP-*xyIB-bs*; pGAP-*xyIB-bx*; pGAP-*xyIB-cs*; pGAP-*xyIB-FM* e pGAP-*xyIB-hl*) e seguindo o protocolo abaixo descrito que foi adaptado do manual da Invitrogen (Cat. no. V195-20).

Foram feitos dois inóculos da linhagem de X-33 de 250 mL de YPD e incubados no shaker à 30 °C até atingir a OD₆₀₀ de 1,3. A seguir as células foram centrifugadas à 1.500 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuscitado em 500 mL de água destilada estéril gelada e as células foram centrifugadas à 1.500 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuscitado com 250 mL de água destilada estéril gelada e as células foram centrifugadas à 1.500 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuscitado com 20 mL de sorbitol 1M estéril gelado e as células foram centrifugadas à 1.500 x *g* por 5 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado com 1 mL de sorbitol 1M estéril gelado.

Foram colocados no gelo, as células competentes, o DNA e as cubetas de eletroporação. Depois 5 μ L do DNA linearizado foi misturado com 80 μ L células, e o sistema incubado por 5 minutos. A alíquota das células foi transferida, junto com o DNA, para a cubeta de eletroporação. Com o eletroporador ajustado para 2.500 volts, 25 μ F, 400 Ω , as células foram submetidas ao choque elétrico. Em seguida 1 ml de sorbitol 1 M foi adicionado, as células foram passadas para um frasco de 1.5 mL e incubadas à 30 °C por 2 hora. Por último, as células transformadas foram plaqueadas em meio YPDS ágar com zeocina [100 μ g/mL] e incubadas na estufa 30 °C por 3 dias.

4.11 Seleção das linhagens produtoras de ácido xilônico

Para seleção de linhagens produtoras de ácido xilônico os transformantes foram inoculados em meio líquido contendo xilose e a produção analisada em UPLC. Para tanto, linhagens de cada gene (*xyIB-ap*; *xyIB-bs*; *xyIB-FM* e *xyIB-hl*) foram então cultivados no shaker a 30 °C, com agitação de 200 rpm por 48 horas, em falcons de 50 mL, inicialmente, contendo 5 mL de meio YPD com zeocina [100 µg/mL]. Essas células foram centrifugadas à 2000 x g por 10 minutos, o meio de cultura descartado e as células lavadas com água destilada. Depois as células foram ressuspensas em 5 mL de meio YNB 1% suplementado com 20 g/L de xilose. Então, os frascos foram incubados no shaker à 30 °C com agitação de 200 rpm por 48 horas. Ao final foram coletadas amostras de 2 mL para as análises no UPLC.

As amostras referentes à produção de ácido xilônico de todas as linhagens construídas foram analisadas por UPLC (Marca: Waters, modelo UPLC Acquity PDA), utilizando o detector fotodiodo de varredura (PDA). As condições de análise das amostras foram: coluna HSS T3 (1,8 µm; 2,1 x 150 mm); fase móvel, solvente A (Tampão KH₂PO₄, 0,01 M, pH 2,0), solvente B (MeOH); fluxo 0,3 mL min⁻¹; volume da injeção 1 µL; temperatura da coluna 30 °C e temperatura ambiente para as amostras.

4.12 Produção de ácido xilônico em frasco

Cada linhagem produtora de ácido xilônico foi inicialmente inoculada em Erlenmeyers de 100 mL contendo 10 mL de meio mineral FM22 suplementado com glicerol 40 g/L, cultivados no shaker a 30 °C, com agitação de 200 rpm por 16 horas. As células foram coletadas com uma centrifugação de 1500 x g por 15 minutos. O meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com água destilada e centrifugadas nas mesmas condições. As células foram inoculadas em 50 mL de meio mineral FM22 com 40 g/L de xilose e 1 g/L de glicerol, biotina 0,2 g/L e iniciou-se a fermentação com uma OD₆₀₀ de 1. Incubou-se a 30 °C, com uma agitação de 200 rpm e por 72 horas. Foram

coletados pontos diários para serem analisados por UPLC-PDA e HPLC-RI, posteriormente, e 1 g/L de glicerol foi adicionada a cada 24 horas.

As amostras referentes ao consumo de glicose, glicerol e ácido acético de todas as linhagens construídas foram analisadas por HPLC (Marca: Waters, modelo UPLC Acquity RI), utilizando o detector de índice de refração (RI). As condições de análise das amostras foram: coluna Aminex HPX-87H; fase móvel, solvente A (ácido sulfúrico 5 mM), solvente B (MeOH); fluxo 0,6 mL min⁻¹; volume da injeção 10 µL; temperatura da coluna 45 °C e temperatura de 10 °C para as amostras.

4.13 Análise do efeito de cosubstrato na produção de ácido xilônico

Foram inoculadas uma colônia de cada linhagem, P2BS6, P1HL2, em 25 mL de meio de cultura (YP+ glicose e YP+ glicerol). Os pré-inóculos foram armazenados no shaker 30 °C, 200 rpm por 24 horas. A OD₆₀₀ dos pré-inóculos, foi medida, e a partir disso foi calculado para que cada inóculo começasse com uma OD₆₀₀ = 2,0. As células, então, foram centrifugadas à 4000 x g por 15 minutos e ressuspendidas em 50 mL de meio de cultura (FM22 + xilose 40 g/L + glicose 20 g/L ou FM22 + xilose 40 g/L + glicerol 20 g/L). Foi medida a OD₆₀₀ de cada inóculo e uma alíquota de 1 mL foi retirada e armazenada no freezer -20 °C (T₀). Em intervalos a OD₆₀₀ de cada inóculo, foi medida, e uma alíquota de 1 mL foi retirada, centrifugada e o sobrenadante armazenado à -20 °C, para posterior análises no HPLC e UPLC.

Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.14 Caracterização das linhagens produtoras de ácido xilônico em biorreator no modo batelada

As linhagens de interesse foram inicialmente inoculadas em 100 mL de meio YPG em Erlenmeyer de 1L e incubados no shaker a 30 °C, com agitação de 200 rpm por 24 horas. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a 1500 x g por 15 minutos e lavadas com água destilada.

Finalmente, foram inoculados em 500 mL de meio de sais FM22 em fermentador multifors (Infors HT, suíça) para uma OD₆₀₀ inicial de 1 para cada fermentador.

O meio de sais FM22 suplementado de 40 g/L de xilose, 10 g/L de glicerol e 0,5 mL de PTM4 foi acrescentado em cada fermentador. O pH da fermentação foi mantido em 5.0 (sem alimentação com ar) ou 5.5 (completamente aeróbica) com adição de KOH 3M, e agitação de 400 rpm. O cultivo foi mantido em condições de oxigenação limitada (sem alimentação com ar sintético) ou completamente aeróbica (fluxo de ar sintético de 0,8 L min⁻¹). O ar sintético é composto por 20% de oxigênio puro e 80% de nitrogênio puro.

Amostras para averiguação de biomassa e metabólitos foram retiradas em intervalos regulares de tempo. A biomassa foi medida utilizando espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices). Para peso seco foram retiradas alíquotas de 5 mL do pré-inóculo e do final da fermentação, essas alíquotas foram armazenadas numa estufa 60 °C, para que a água evaporasse e então o peso seco, de cada alíquota, foi medido e calculado. Para análise de metabólitos, a amostra foi centrifugada à 14.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado à -20 °C para posterior análise em UPLC-PDA e HPLC-RI.

O consumo de xilose foi estimado de forma indireta, para todos os experimentos, utilizando os dados de xilose inicial do meio menos os dados produção de ácido xilônico.

Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.15 Caracterização das linhagens produtoras de ácido xilônico em biorreator no modo batelada alimentada

Para cada linhagem foram feitos um inóculo, usando 100 mL de meio YPG em um frasco aletado de 1 L. Os inóculos foram armazenados no shaker à 30°C e 200rpm por 24 horas. Os fermentadores foram montados, 300 mL de meio FM22 foram inseridos em cada reator, 600 mL de meio de alimentação (0,25% de FM22 + 100 g de xilose e 5 g de glicerol) foi colocado no frasco de

alimentação e 150 mL de KOH 3M foi colocado no frasco de base, para cada fermentador. Os inóculos das linhagens P2BS6 e P1HL2 foram centrifugados, as células ressuspensas em 6 mL de glicerol 20 g/L + PTM4 e usadas para inocular os reatores. A temperatura dos reatores foi ajustada para 30 °C, agitação de 400 rpm, pH 5.5, e fluxo de ar de 0,8 L min⁻¹. Ao longo do experimento foram retirados pontos de cada cultivo, a OD₆₀₀ foi medida e as amostras foram armazenadas no freezer -20°C. Ao final das 12 horas foi iniciada a fase de alimentação e a bomba foi acionada para um fluxo constante de 6% por 48 horas. Amostra de 5 mL de cada inóculo, e do final da fermentação foram retiradas para fazer o peso seco. Essas amostras foram centrifugadas, o pellet foi ressuspensas em 1 mL de água destilada e os tubos armazenados na estufa 60 °C até a secagem completa do material.

Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.16 Caracterização das linhagens produtoras de ácido xilônico em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em frasco

Cada linhagem produtora de ácido xilônico foi inicialmente inoculada em Erlenmeyers de 1 L contendo 100 mL de meio YPD suplementado com glicose 40 g/L e zeocina [100 µg/mL] , cultivados no shaker a 30 °C, com agitação de 200 rpm por 16 horas. As células foram coletadas com uma centrifugação de 1500 x g por 15 minutos. O meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com água destilada e centrifugadas nas mesmas condições. As células foram inoculadas em 50 mL de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com xilose para uma concentração final de 40 g/L e glicose para uma concentração final de 10 g/L, e iniciou-se a fermentação com uma OD₆₀₀ de 20. Incubou-se a 30°C, com uma agitação de 200 rpm por 96 horas. Foram coletados pontos diários para serem analisados por UPLC-PDA e HPLC-RI, posteriormente.

Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.17 Caracterização das linhagens produtoras de ácido xilônico em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator

As linhagens selecionadas foram inicialmente inoculadas em 100 mL de meio YPD em Erlenmeyer de 1 L e incubados no shaker a 30 °C, com agitação de 200 rpm por 24 horas. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a 1500 x g por 15 minutos e lavadas com água destilada. Finalmente, foram inoculados em 500 mL de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar 20% suplementado com xilose para uma concentração final de 40 g/L e glicose para uma concentração final de 10 g/L no fermentador multifors (Infors HT, suíça) e uma OD₆₀₀ inicial de 10 para cada fermentador. O pH da fermentação foi mantido em 5.5 com adição de KOH 3M, a agitação de 400 rpm. O cultivo foi mantido em condições de oxigenação aeróbica (fluxo de ar sintético de 0,8 L min⁻¹).

Amostras para averiguação de biomassa e metabólitos foram retiradas em intervalos regulares de tempo. A biomassa foi medida utilizando espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices). Para peso seco foram retiradas alíquotas de 5 mL do pré-inóculo e do final da fermentação, essas alíquotas foram centrifugadas à 2000 g por 15 minutos, o sobrenadante foi ressuspendido em água destilada e armazenado numa estufa 60 °C, para que a água evaporasse e então o peso seco, de cada alíquota, foi medido e calculado. Para análise de metabólitos, a amostra foi centrifugada à 14.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado à -20 °C para posterior análise em UPLC-PDA e HPLC-RI.

Os experimentos foram realizados em duplicata.

5 RESULTADOS

Esse trabalho se desenvolveu em duas etapas principais: a primeira consistiu na identificação de enzimas que convertem xilose a ácido xilônico e a engenharia da levedura *K. phaffii* com os respectivos genes. A segunda etapa, consistiu na otimização do processo de produção de ácido xilônico pelas linhagens recombinantes

5.1 Identificação de novas XDH

Com o objetivo de identificar novos genes que codificam para xilose desidrogenases (XDH), duas árvores filogenéticas foram construídas utilizando sequências de bactérias (Figura 10) e de fungos (Figura 11). Para tanto, sequências de XDH previamente conhecidas (gene *xyIB* de *Caulobacter crescentus* para as bactérias e o gene *XYLD* de *Trichoderma reesei* pra os fungos) foram utilizadas como molde para identificação de outras putativas no banco de dados NCBI utilizando a ferramenta BLASTx. Com base na árvore obtida com as sequências bacterianas (Figura 10) foram escolhidas 5 sequências que possivelmente codificam para XDH, as quais foram denominadas *xyIB-ap*, *xyIB-bs*, *xyIB-bx*, *xyIB-cs* e *xyIB-hl* (Tabela 7). Com base na árvore obtida com as sequências fúngicas (Figura 11), foi escolhida 1 sequência que possivelmente codifica para uma XDH, denominada *xyIB-FM* (Tabela 7).

O gene *cs* da bactéria *Caulobacter segnis* é o que apresenta maior grau de identidade (87,10%) com o gene controle *xyIB-cc* pertencente a bactéria *Caulobacter crescentus* (Tabela 7). Na árvore filogenética podemos ver que eles também foram agrupados mais próximos (Figura 10). Considerando que os dois vem do mesmo gênero, *Caulobacter*, isso já era esperado. Já os genes *xyIB-ap* e *xyIB-hl*, pertencentes as bactérias *alpha proteobacterium* e *Halomonas lutea* respectivamente, foram os que apresentaram menor grau de identidade com o controle (51,63% e 52,42%) (Tabela 7).

Os genes escolhidos foram sintetizados por empresa terceirizada e entregues clonados no vetor comercial pMAT (Figura 8). A Tabela 7 resume as

principais características dos genes selecionados. A Tabela 8 mostra o grau de similaridade entre as sequências bacterianas escolhidas. O gene fúngico escolhido (*FM*) apresenta identidade de 39.76% com a de *T. reesei*.

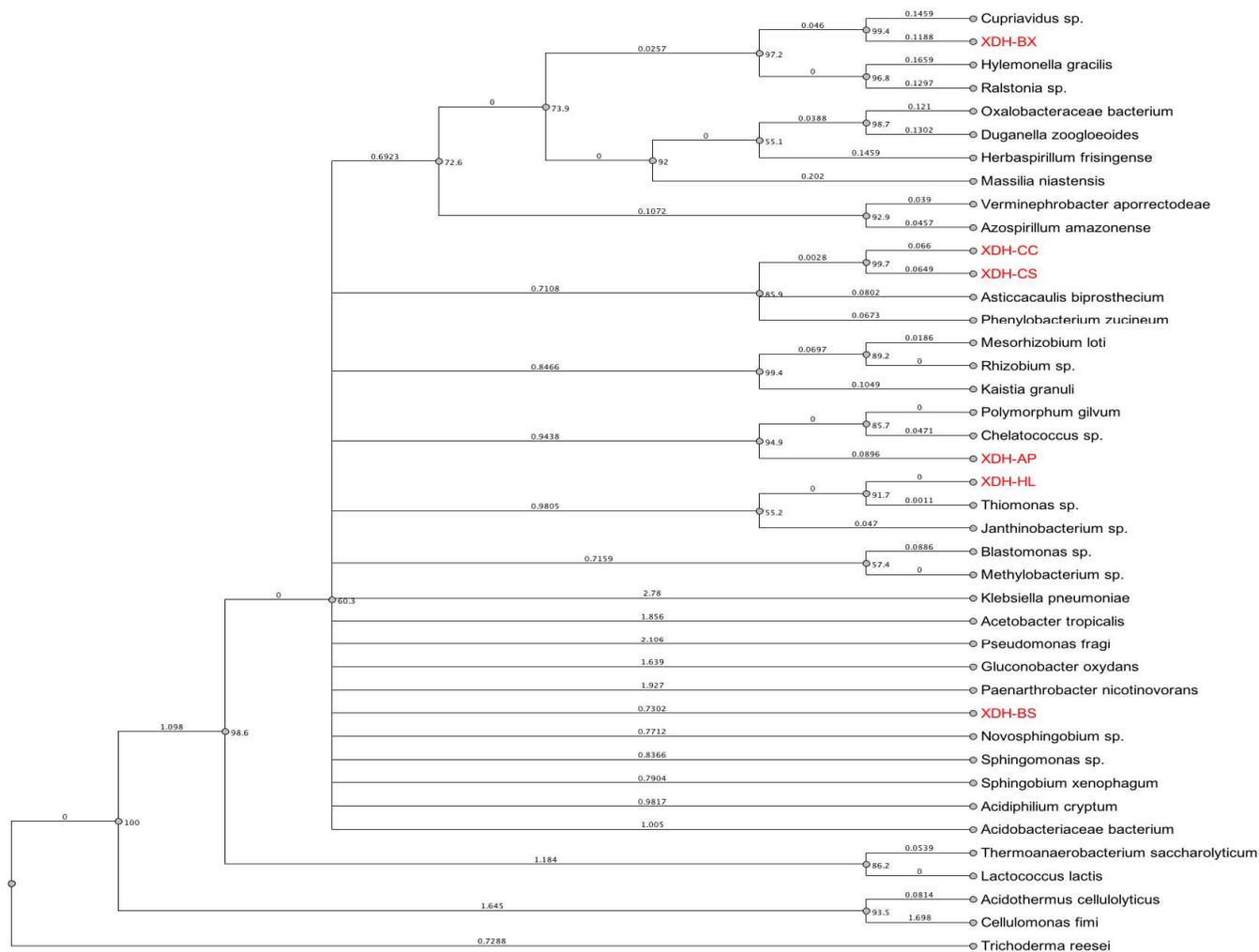


Figura 10: Árvore filogenética construída com seqüências de possíveis XDH de bactérias. As seqüências escolhidas para serem empregadas neste trabalho estão destacadas em vermelho. A seqüência do fungo filamentosso *Trichoderma reesei* foi usada como grupo externo.

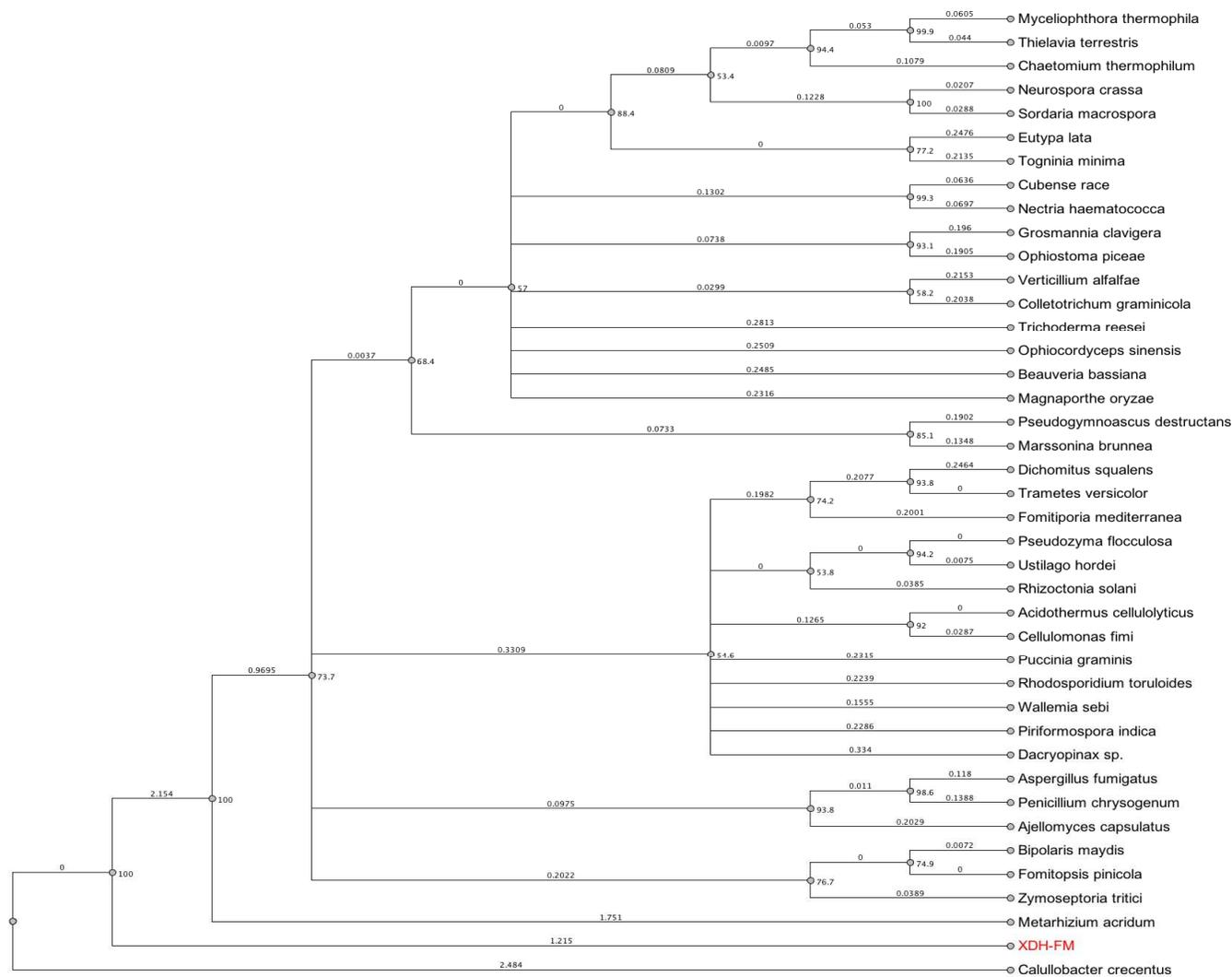


Figura 11: Árvore filogenética construída com seqüências de possíveis XDH de fungos filamentosos. A seqüência escolhida para ser empregada neste trabalho é destacada em vermelho. A seqüência da bactéria *Caulobacter crescentus* foi usada como grupo externo.

Tabela 7: Genes *xyIB* escolhidos para expressão em *K. phaffii*.

Identificação	Microrganismo de origem	Tamanho (pb)	Filo	Classificação
<i>ap</i>	<i>alpha proteobacterium</i>	846	Proteobacteria	Bactéria gram-negativa
<i>bs</i>	<i>Brevundimonas subvibrioides</i>	780	Proteobacteria	Bactéria gram-negativa
<i>bx</i>	<i>Burkholderia xenovorans</i>	828	Proteobacteria	Bactéria gram-negativa
<i>cc</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>	768	Proteobacteria	Bactéria gram-negativa
<i>cs</i>	<i>Caulobacter segnis</i>	771	Proteobacteria	Bactéria gram-negativa
<i>FM</i>	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	1182	Basidiomycota	Fungo filamentoso
<i>hl</i>	<i>Halomonas lutea</i>	792	Proteobacteria	Bactéria gram-negativa

Tabela 8: Identidade entre as sequências de aminoácidos das XDH bacterianas selecionadas

	<i>cc</i>	<i>cs</i>	<i>ap</i>	<i>hl</i>	<i>bs</i>	<i>bx</i>
<i>cc</i>	100					
<i>cs</i>	87,10	100				
<i>ap</i>	51,63	52,44	100			
<i>hl</i>	52,42	51,00	51,38	100		
<i>bs</i>	70,16	69,76	49,20	51,98	100	
<i>bx</i>	59,68	59,27	47,73	52,55	64,29	100

5.2 Clonagem dos genes *xyIB* no vetor de expressão pGAPZB

Os genes selecionados foram sintetizados por empresa especializada e clonados no vetor pMAT (Figura 8). Para clonar os genes (*xyIB-ap*, *xyIB-bs*, *xyIB-bx*, *xyIB-cc*, *xyIB-cs*, *xyIB-FM* e *xyIB-hl*) no vetor de expressão pGAPZB, primeiramente foi realizada a digestão do pMAT com as enzimas *EcoR I* e *Xba I*, para a liberação de cada gene. Posteriormente, os fragmentos gênicos foram purificados e ligados ao pGAPZB previamente digerido com as mesmas enzimas. Os genes foram clonados, no vetor pGAPZB em fase com

his tag. Após transformação de *E. coli*, foram selecionados 10 transformantes de cada gene para análise da clonagem. Para confirmar a inserção dos genes que codificam para XDH no vetor de expressão pGAPZB foi feita digestão do DNA plasmidial com as enzimas *EcoR* I e *Xba* I. No gel podem ser vistas duas bandas para cada restrição: uma de 2.9 Kb, que corresponde ao vetor pGAPZB e outra que corresponde ao gene de XDH inserido (Figura 12). Com isso foi possível confirmar a correta clonagem dos genes *xyIB-ap*, *xyIB-bs*, *xyIB-bx*, *xyIB-cc*, *xyIB-cs*, *xyIB-FM* e *xyIB-hl*, com tamanhos respectivos de 846 pb, 780 pb, 828 pb, 771 pb, 1182 pb e 792 pb.

O trabalho com o gene *xyIB-cc* teve que ser descontinuado, pois após várias tentativas não foi possível confirmar a clonagem do mesmo no vetor de expressão pGAPZB.

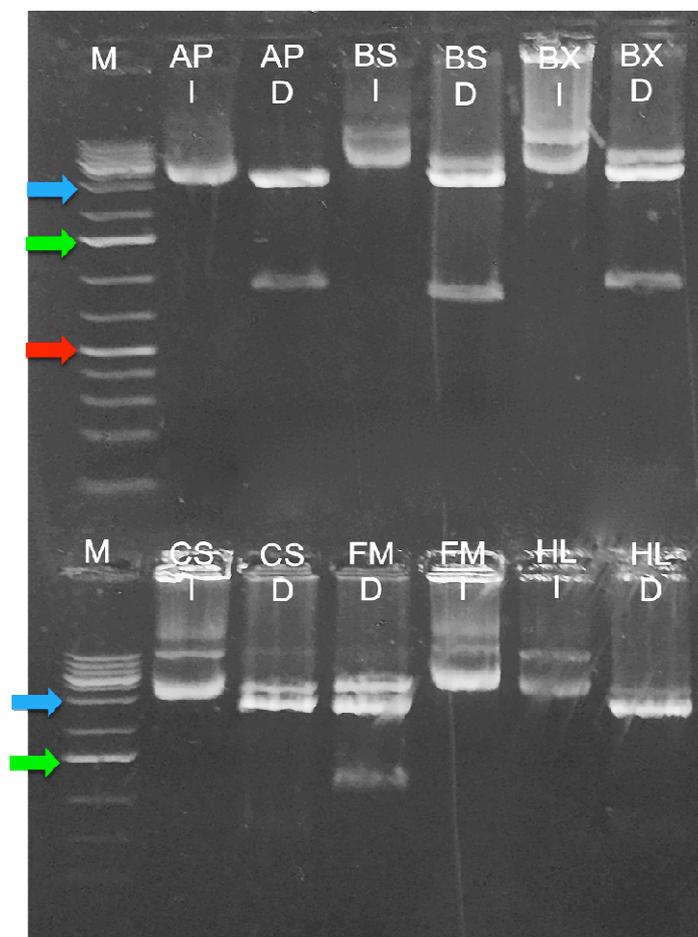


Figura 12: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% para confirmação da clonagem dos genes *xyIB* no plasmídeo pGAP-*xyIB*. DNA plasmidial intacto (I) ou digerido com *EcoR* I e *Xba* I (D) das linhagens pGAP-XDH. A identificação de cada gene é indicada no gel. Setas azuis: 3000pb; setas verdes: 1000pb; seta vermelha: 500pb; M: marcador 1Kb plus (Thermo Scientific);

5.3 Obtenção de linhagens recombinantes de *K. phaffii* produtoras de ácido xilônico

Para obter linhagens recombinantes de *K. phaffii* produtoras de ácido xilônico, os genes que codificam para XDH clonados no vetor pGAPZB na etapa anterior foram inseridos na levedura *K. phaffii*. Para tanto, os plasmídeos pGAP-XDH obtidos foram linearizados com as enzimas de restrição *BspH* I (pGAP-*xyIB-bs*; pGAP-*xyIB-bx*; pGAP-*xyIB-cs*; pGAP-*xyIB-FM* e pGAP-*xyIB-hl*) ou *Avr* II (pGAP-*xyIB-ap*), purificados e posteriormente transformados na levedura. Para a seleção das linhagens produtoras, 16 transformantes capazes de crescer em meio seletivo com zeocina, para cada gene, foram inoculados em meio YNB suplementado com 20 g/L de xilose e 1 g/L de glicerol. Os transformantes foram denominados por P1 ou P2 (placa de transformação) seguido pelo nome de origem do gene (HL, BS, etc) seguido do número do transformante selecionado. Após 48 horas, a produção de ácido xilônico foi analisada utilizando UPLC-PDA. Foram confirmadas as produções de ácido xilônico em linhagens expressando os genes *xyIB-ap*, *xyIB-bs*, *xyIB-FM* e *xyIB-hl* (Figura 13).

Das 16 colônias analisadas para o gene *xyIB-ap*, somente 3 se mostraram capazes de produzir ácido xilônico e mesmo assim em concentrações abaixo de 1 g/L (Figura 13A). As colônias expressando os genes *xyIB-bs*, *xyIB-FM* e *xyIB-hl* apresentaram maior produção e variação de produção de ácido xilônico entre eles (Figura 13 B, C e D). Isso pode ser explicado pela possibilidade de múltiplas cópias dos genes terem sido inseridas no genoma de alguns desses clones, gerando assim uma possível maior produção de ácido. A maior produção de ácido xilônico com as linhagens expressando os genes *xyIB-bs* e *xyIB-FM* foi de 4,77 g/L e 3,69 g/L, respectivamente, com os transformantes P2BS6 e P1FM7.

A linhagem P1HL1, do gene *xyIB-hl*, foi a que mais produziu ácido xilônico (8,4 g/L) dentre todas colônias de todos os genes analisados na seleção (Figura 13 D).

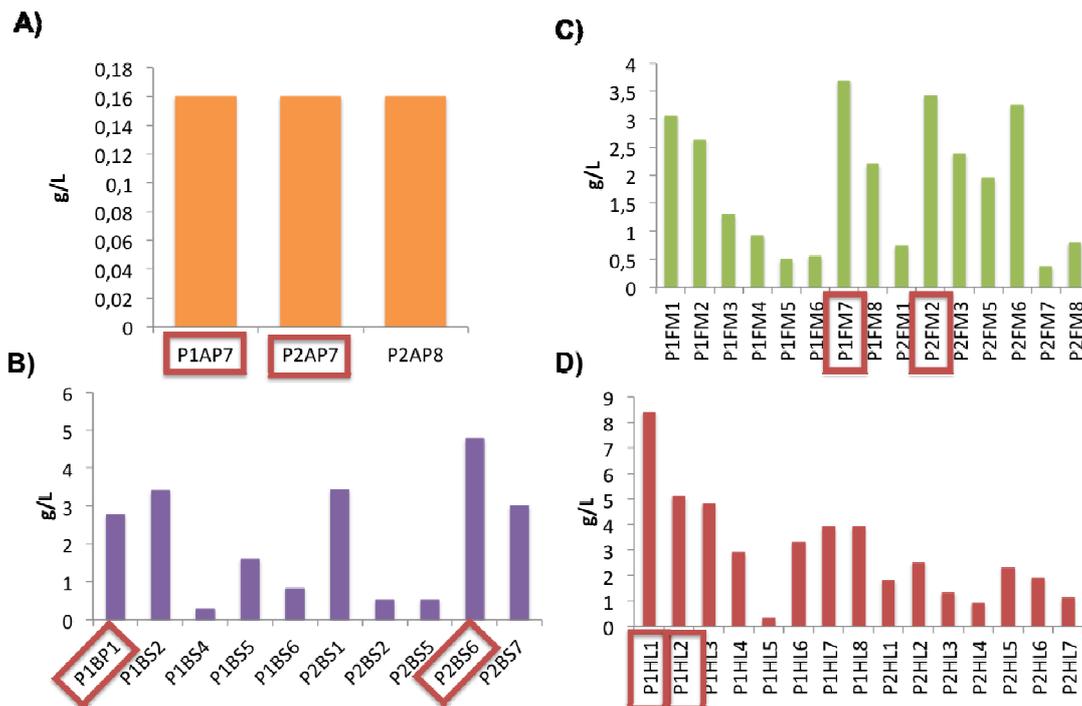


Figura 13: Produção de ácido xilônico pelas linhagens selecionadas expressando os genes *ap* (A); *bs* (B); *fm* (C) e *hl* (D) e destacando as duas melhores linhagens (quadrado vermelho) de cada gene. A escala de cada gene foi mantida diferente para facilitar a visualização dos dados.

Para confirmar a capacidade de produção de ácido xilônico pelas linhagens obtidas, as duas linhagens de cada gene com maior produção (P1AP7; P2AP8; P1BS2; P2BS6; P1FM7; P2FM2; P1HL1 e P1HL2) foram selecionadas para novos experimentos de fermentação. Cada clone foi cultivado em frasco Erlenmeyer, em meio de cultura FM22 suplementado com xilose 40 g/L, glicerol inicial de 1 g/L e biotina. A cinética de fermentação foi acompanhada em intervalos regulares de tempo por 72 horas e a cada 24 horas foi adicionado 1 g/L de glicerol nos inóculos. A biomassa e a produção de ácido xilônico foram medidos (Figura 14).

O crescimento das 8 linhagens analisadas foi semelhante, sendo caracterizado por um pico de crescimento seguido de uma estabilização e um novo pico de crescimento (Figura 14B). Esse padrão pode ser explicado pelo acréscimo de 1 g/L de glicerol a cada 24 horas no meio de cultura. O glicerol foi acrescentado, para permitir o crescimento das células, pois as leveduras não são capazes de usar xilose como fonte de carbono.

As linhagens expressando o gene *xyIB-ap* (P1AP7 e P2AP8), que no experimento de seleção tinham demonstrado a menor produção de ácido

dentre todos os clones analisados, não apresentaram nenhuma produção de ácido xilônico nesse experimento (Figura 14A). Por outro lado, as linhagens expressando o *gene xyIB-hl* (P1HL1 e P1HL2) confirmaram a melhor produção de ácido xilônico, i.e. maior concentração (cerca de 6 g/L) (Figura. 13A). Da mesma forma, a produção com as linhagens expressando o gene *xyIB-bs* (3,44 g/L para a linhagem P2BS6 e 3,25 g/L para a linhagem P1BS2) foi maior que para o gene *xyIB-FM* (0,3 g/L para a linhagem P1FM7 e 0,4 g/L para a linhagem P2FM2), o qual apresentou uma produção significativamente baixa quando comparada com o experimento anterior (3,96 g/L para a linhagem P1FM7 e 3,44 g/L para a linhagem P2FM2) (Figura 14A).

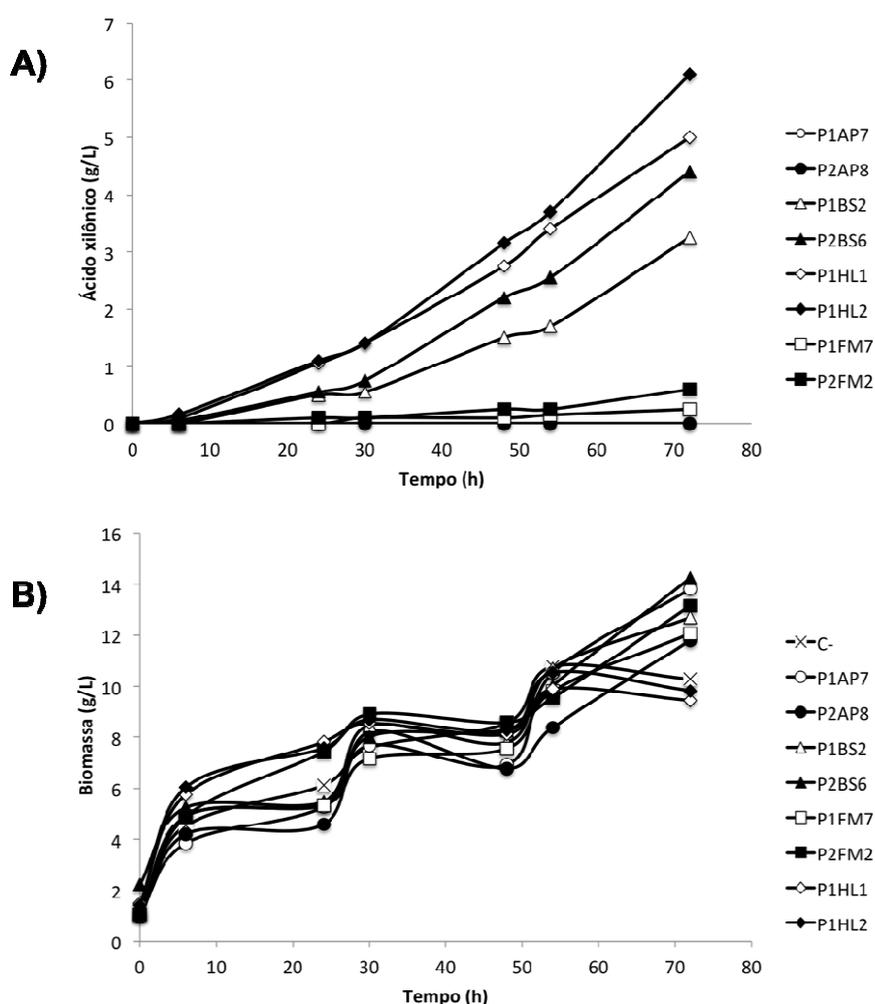


Figura 14: Produção de ácido xilônico (A) e crescimento (B) por linhagens recombinantes de *K. phaffii*. As linhagens P1AP7; P2AP8; P1BS2; P2BS6; P1FM1; P1FM7; P1HL1 e P1HL2 foram cultivados em meio FM22 suplementado com xilose (40 g/L) e glicerol (1 g/L a cada 24h).

Com base nos resultados nesse experimento, a linhagem P2BS6, do gene *xyIB-bs*, e a linhagem P1HL2, do gene *xyIB-hl* foram selecionadas para os próximos experimentos. Esses se mostraram os melhores produtores de ácido xilônico dos dois melhores genes.

5.4 Comparação dos efeitos da adição de glicerol ou glicose na produção de ácido xilônico

A levedura *K. phaffii* é capaz de crescer usando tanto glicose quanto glicerol com fontes de carbono. Para verificar se a fonte de carbono utilizada para o crescimento da levedura poderia interferir na produção de ácido xilônico, foi feito um experimento crescendo as linhagens P2BS6 e P1HL2 em meio FM22 suplementado com xilose e glicose ou glicerol. Esses clones foram selecionados por serem as melhores linhagens dos dois melhores genes produtores de ácido xilônico nos experimentos passados. Cada linhagem foi cultivada em frasco Erlenmeyer contendo meio FM22 suplementado com 20 g/L de glicose ou 20 g/L de glicerol, e a cinética de fermentação foi acompanhada por 96 horas. A biomassa e a produção de ácido xilônico foram medidos em intervalos regulares de tempo (Figura 15).

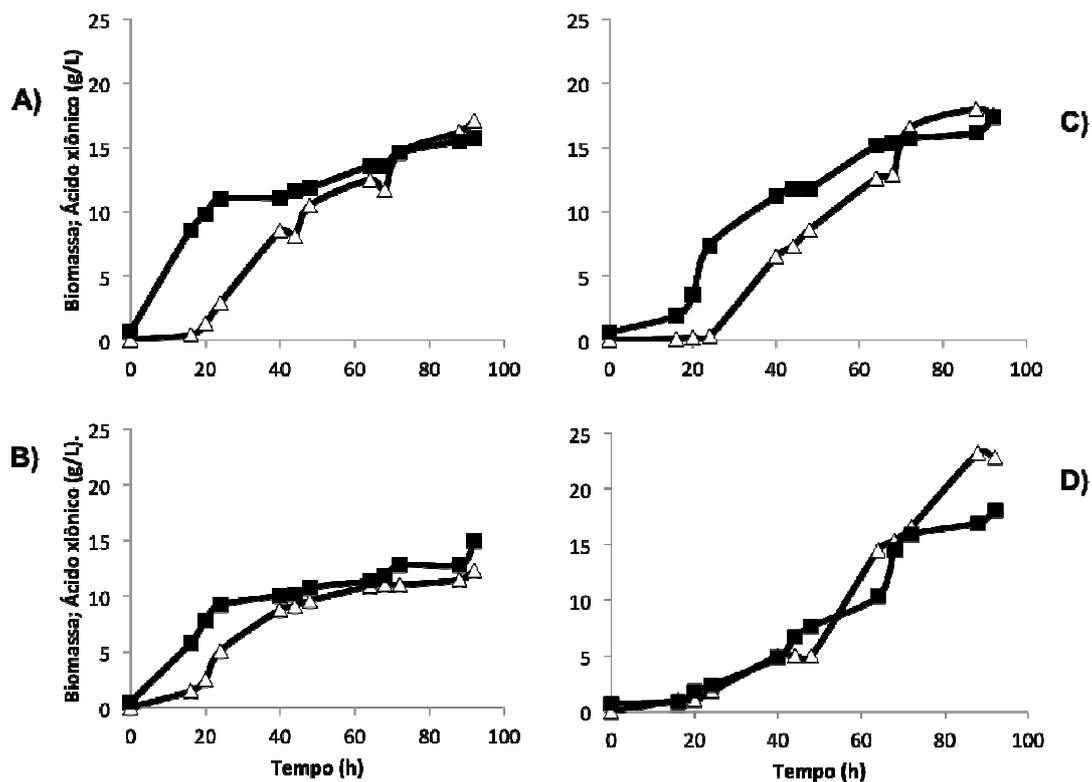


Figura 15: Biomassa (■) e produção de ácido xilônico (Δ) por linhagens recombinantes de *K. phaffii* P2BS6 (A e B) e P1HL2 (C e D). As linhagens P2BS6 e P1HL2 foram cultivados em meio FM22 suplementado com xilose (40 g/L) e glicose 20 g/L (A e C) ou glicerol 20 g/L (B e D). Os experimentos foram realizados em duplicata e os gráficos exemplificam o perfil visualizado para cada linhagem.

Para a linhagem P2BS6 a suplementação do meio com glicose ou glicerol não fez diferença significativa no crescimento e na produção de ácido xilônico (Figura 15 A e B). Com a adição de glicose, a produção de ácido xilônico foi de $17,1 \pm 0,21$ g/L e a produção do composto na presença de glicerol foi de $17,5 \pm 0,14$ g/L. Já para a linhagem P1HL2 a fonte de carbono resultou em uma diferença significativa na produção de ácido xilônico (Figura 15 C e D). Com glicose a produção foi de $12,3 \pm 1,06$ g/L já com glicerol foi de $22,8 \pm 3,53$ g/L, um aumento de quase 2 vezes na produção de ácido xilônico. Não houve diferença significativa no crescimento, da linhagem P1HL2, com as diferentes fontes de carbono. Por esse motivo foi escolhido fazer as fermentações em biorreator utilizando glicerol como fonte de carbono.

5.5 Caracterização das linhagens produtoras de ácido xilônico em biorreator

As linhagens P2BS6 e P1HL2 que foram as melhores produtoras de ácido xilônico foram escolhidas para avaliação em biorreator. O biorreator permite melhor controle das condições experimentais, tais como: temperatura, pH e aeração, o que possivelmente pode favorecer a produção de ácido xilônico. Como a utilização de glicerol como substrato favorece a produção do ácido, os experimentos foram realizados em meio FM22 suplementado com xilose 40 g/L e glicerol 20 g/L. A linhagem controle foi comparada nas mesmas condições.

As fermentações iniciais foram realizadas com e sem oxigenação. A levedura demonstrou baixa taxa de crescimento e de produção de metabólitos. A formação de biomassa, a produção de ácido xilônico e o consumo de xilose e glicerol para as linhagens P1HL2, P2BS6 e controle são mostrados na Figura 16. O controle negativo (C-) teve um crescimento similar ao das linhagens expressando as xilose desidrogenases, porém não houve a produção de ácido xilônico, como era esperado (Figura 16A). As linhagens P2BS6 e P1HL2 tiveram uma produção de ácido xilônico final de 0,9 g/L e 2,1 g/L respectivamente (Figura 16 B e C). Além disso, rendimento e produtividade de ácido xilônico foi extremamente baixo para ambas as linhagens (Tabela 9).

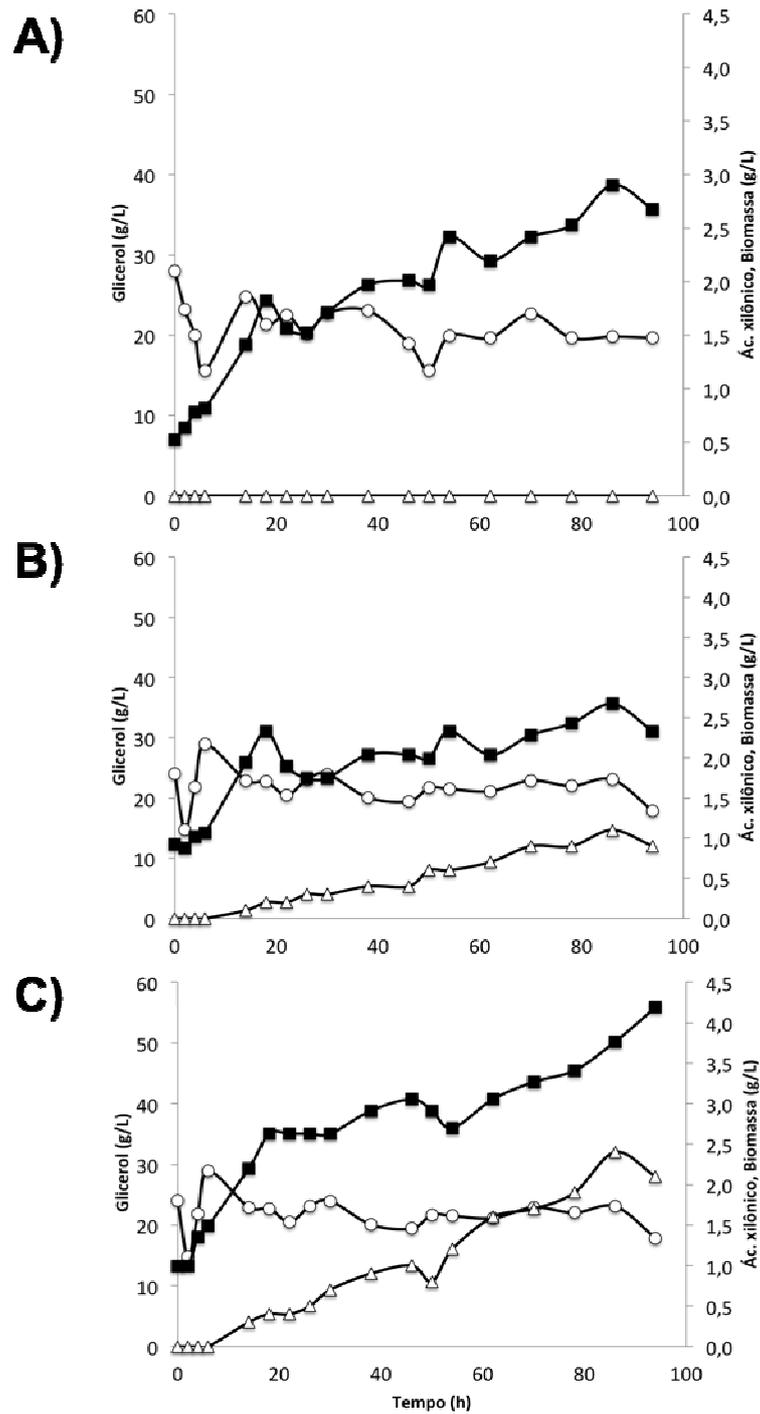


Figura 16: Biomassa (■), consumo de glicerol (●) e produção de ácido xilônico (Δ) por linhagens recombinantes de *K. phaffii* controle (A), P2BS6 (B) e P1HL2 (C). Os As linhagens P2BS6 e P1HL2 e o controle foram cultivados em meio FM22 suplementado com xilose (40 g/L) e glicerol (20 g/L).

Tabela 9: Resultados de fermentação em biorreator com oxigênio limitado das linhagens P2BS6, P1HL2 e controle. Valores médio e desvio padrão para consumo de xilose e parâmetros de produção de ácido xilônico são apresentados.

Linhagem	Xilose inicial (g/L)	Ácido Xilônico (g/L)	Xilose final (g/L)	Rendimento (g _{ax} /g _x)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
C-	39,248	0	49,248	0	0
BS	32,62	0,9 ± 0,14	31,72	0,027 ± 0,0042	0,0041 ± 0,0002
HL	40,306	2,1 ± 0,21	38,206	0,052 ± 0,0049	0,0053 ± 0,001

O rendimento da linhagem P2BS6 foi de 0,027 g/g e sua produtividade foi de 0,0041 g.L⁻¹.h⁻¹, enquanto que a linhagem P1HL2 mostrou um rendimento de 0,052 g/g e a produtividade de 0,0053 g.L⁻¹.h⁻¹ (Tabela 9).

Baseado nos resultados anteriores, decidiu-se aumentar a aeração do sistema. Para tanto, ar sintético foi injetado no biorreator constantemente durante a fermentação num fluxo de 0,8 L min⁻¹. O aumento da aeração favoreceu a atividade metabólica das diferentes linhagens, as quais foram capazes de consumir todo o glicerol fornecido (Figura 17). A linhagem P2BS6 produziu 36,2 g/L de ácido xilônico e a linhagem P1HL2 produziu 38,4 g/L. A linhagem expressando o gene *xyIB-hI* além de apresentar a maior produção também foi o que começou a produção de ácido xilônico mais cedo. Em experimentos passados (Figuras 15-16), a linhagem expressando o gene *xyIB-hI* sempre demonstrou melhor capacidade de produção de ácido xilônico.

Para esse experimento o rendimento obtido pela linhagem P2BS6 foi de 0,94 g/g e para a linhagem P1HL2 foi de 0,98 g/g (Tabela 10). Comparando-se com os rendimentos obtidos no experimento em frasco de produção de ácido xilônico (Figura 14A), que foram de 0,11 g/g para a linhagem P2BS6 e de 0,165 g/g para a linhagem P1HL2, pode-se ver um significativo aumento.

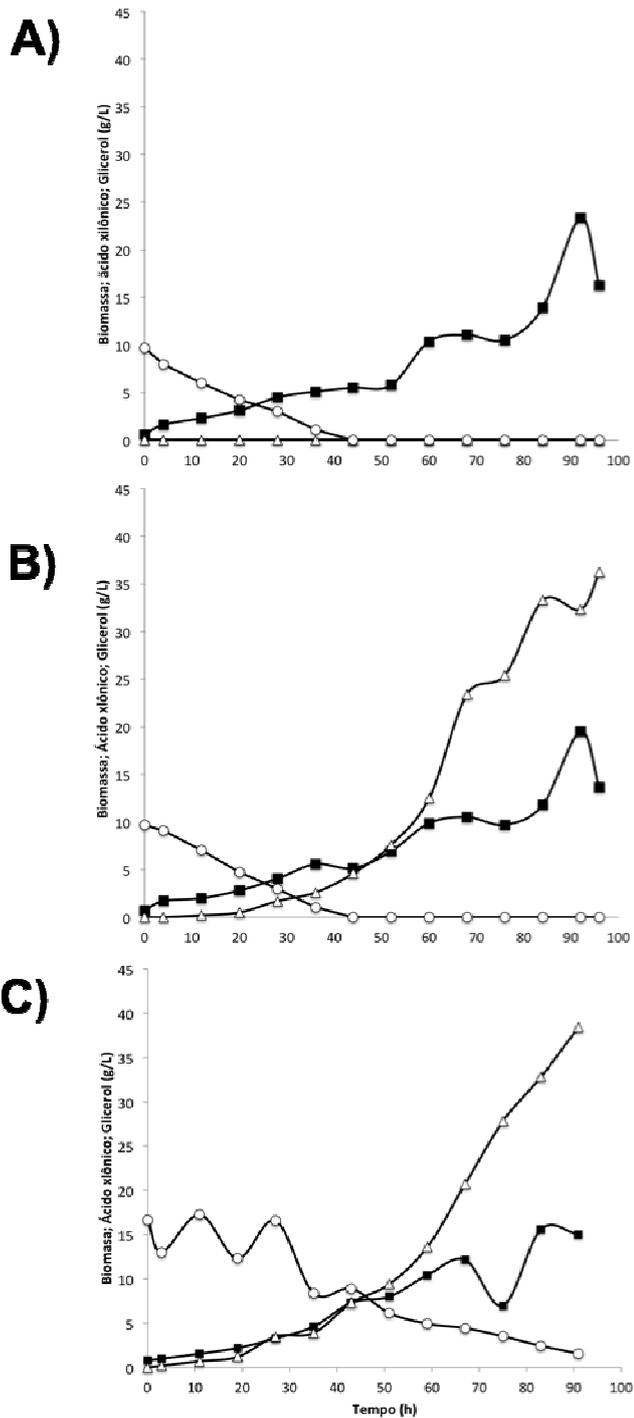


Figura 17: Biomassa (■), consumo de glicerol (○) e produção de ácido xilônico (Δ) por linhagens recombinantes de *K. phaffii* controle (A), P2BS6 (B) e P1HL2 (C). As linhagens P2BS6 e P1HL2 e o controle foram cultivados em meio FM22 suplementado com xilose (40 g/L) e glicerol (10 g/L).

Tabela 10: Resultados de fermentação em biorreator aeróbico das linhagens P2BS6, P1HL2 e controle. Valores médio e desvio padrão para consumo de xilose e parâmetros de produção de ácido xilônico são apresentados.

Linhagem	Xilose inicial (g/L)	Ácido Xilônico produzido (g/L)	Xilose final (g/L)	Rendimento (g _{ax} /g _x)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
C-	31,31	0	31,31	0	0
BS	38,604	36,2 ± 3,32	2,404	0,94 ± 0,09	0,028 ± 0,003
HL	39,368	38,4 ± 1,91	0,968	0,98 ± 0,05	0,028 ± 0,006

5.6 Caracterização das linhagens produtoras de ácido xilônico em biorreator batelada alimentada

Com o intuito de melhorar a produtividade das linhagens P2BS6 e P1HL2 foram realizadas novas fermentações em biorreator dessa vez utilizando batelada alimentada.

Cada linhagem foi cultivada em biorreator contendo inicialmente meio FM22 suplementado com 20 g/L de glicerol. Após 12 horas foi iniciada a fase de alimentação, que durou cerca de 24 horas e na qual foi utilizado 600 mL de meio de alimentação (0,25% de FM22 + 100 g de xilose e 5 g de glicerol). Esse meio foi inserido com a bomba acionada para um fluxo constante 6% por 48 horas nos biorreatores. A cinética de fermentação foi acompanhada totalizando 72 horas de experimento. A biomassa, a produção de ácido xilônico e consumo de glicerol foram medidos em intervalos regulares de tempo (Figura 18).

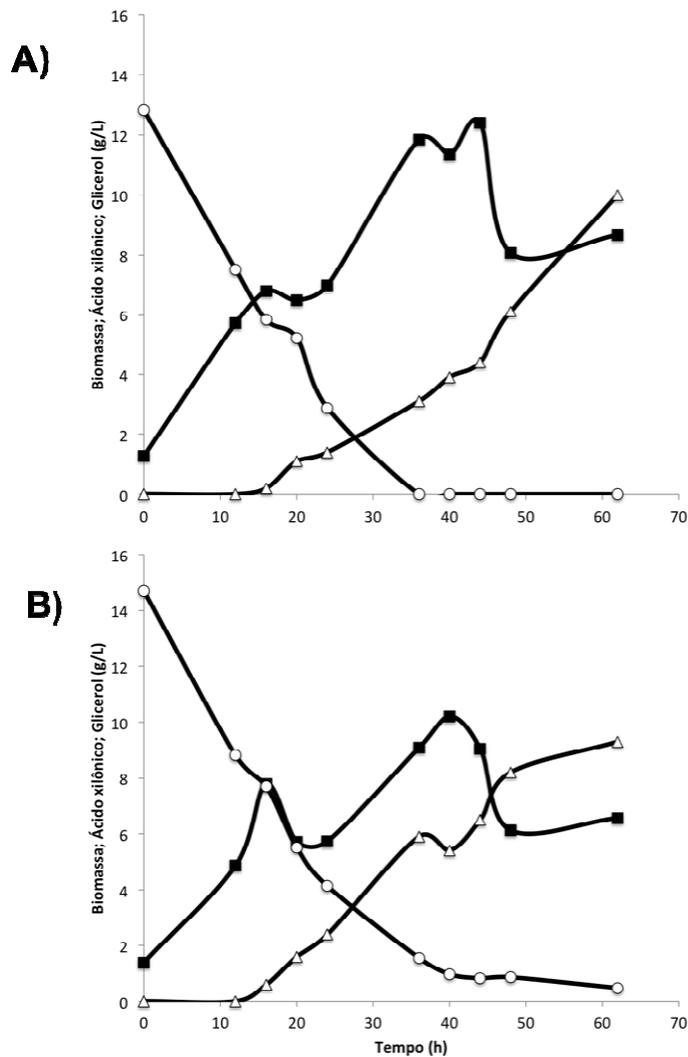


Figura 18: Biomassa (■), consumo de glicerol (○) e produção de ácido xilônico (Δ) por linhagens recombinantes de *K. phaffii* P2BS6 (A) e P1HL2 (B). As linhagens P2BS6 e P1HL2 foram cultivados em meio FM22 suplementado com glicerol (20 g/L) e depois de 12 horas alimentados com 600mL de meio de alimentação (0,25% de FM22 + 100 g de xilose e 5 g de glicerol).

Tabela 11: Consumo de xilose, rendimento e produtividade das linhagens P2BS6 e P1HL2 da fermentação em biorreator batelada alimentada.

Linhagem	Xilose inicial (g/L)	Ácido Xilônico produzido (g/L)	Xilose final (g/L)	Rendimento (g_{ax}/g_x)	Produtividade ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
BS	11,34	$10 \pm 3,32$	1,34	$0,881 \pm 0,29$	$0,023 \pm 0,009$
HL	10,43	$9,3 \pm 0,35$	1,13	$0,891 \pm 0,034$	$0,028 \pm 0,005$

Para tentar melhorar a produtividade das linhagens foram feitas duas fases no biorreator: Uma primeira fase de crescimento, sem xilose só glicerol, para obter uma maior concentração de biomassa antes de começar a produção do ácido xilônico. Nos experimentos anteriores a biomassa inicial era de aproximadamente 0,8 g/L enquanto que na batelada alimentada, a biomassa foi maior que 5 g/L para as duas linhagens (Figura 18). Na segunda fase começou a alimentação com meio contendo xilose para a produção do ácido xilônico.

Apesar da estratégia montada, é possível observar que o glicerol foi consumido completamente em menos de 40 horas para a linhagem P2BS6 (Figura 18A), enquanto que para a linhagem P1HL2 existe glicerol residual no final das 72 horas do experimento (Figura 18B).

Além disso, foi visto que ao final a produtividade foi de $0,023 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para a linhagem P2BS6 e de $0,028 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para a linhagem P1HL2 (Tabela 11). Se compararmos esses valores com os valores obtidos na batelada sem alimentação ($0,028 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para ambas as linhagens), não houve uma melhora para a linhagem P1HL2 e houve uma queda para a linhagem P2BS6. Além disso, os rendimentos de produção de ácido xilônico foram menores para ambas linhagens.

Foram feitos experimentos testado um aumento na concentração de glicerol do meio de alimentação, de 5 g para 50 g, e uma alimentação por pulsos, no qual após as primeiras 12 horas de crescimento foi iniciada a etapa de alimentação a cada 24 horas, por 48 horas (dados não mostrados). Porém a produtividade das linhagens P1HL2 e P2BS6 foi ainda pior do que os dados apresentados no experimento mostrado.

5.7 Caracterização das linhagens produtoras de ácido xilônico em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Decidiu-se testar a capacidade de produção de ácido xilônico das linhagens P2BS6 e P1HL2 em condições mais próximas de uma biorrefinaria utilizando hidrolisado obtido de bagaço de cana-de açúcar. Para tanto as linhagens P2BS6, P1HL2 e controle negativo foram inoculados em frasco

Erlenmeyer e a cinética de fermentação foi acompanhada. O hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (diluído 5x), utilizado possuía por volta de 1 g/L de glicose; 20 g/L de xilose e 4 g/L de ácido acético. Ele foi suplementado com glicose e xilose para que suas concentrações finais fossem por volta de 20 g/L e 40 g/L, respectivamente.

Tanto a linhagem P2BS6 quanto a linhagem P1HL2 foram capazes de produzir ácido xilônico a partir de hidrolisado, chegando a atingir uma produção de 11 g/L e 13,4 g/L, respectivamente, a partir de hidrolisado (Figura 19) (tabela 12). O rendimento e a produtividade (tabela 12) foram mais baixas para ambas as linhagens quando comparadas com os experimentos em biorreator (Tabela 10).

É possível observar também que toda a glicose e o ácido acético foram consumidos nas primeiras 24 horas de experimento para as duas linhagens. Após 48 horas ocorre uma estabilização no crescimento das duas linhagens (P2BS6 e P1HL2) o que não é visto no controle, que por sua vez mostra sinais de crescimento ao longo de todo o experimento.

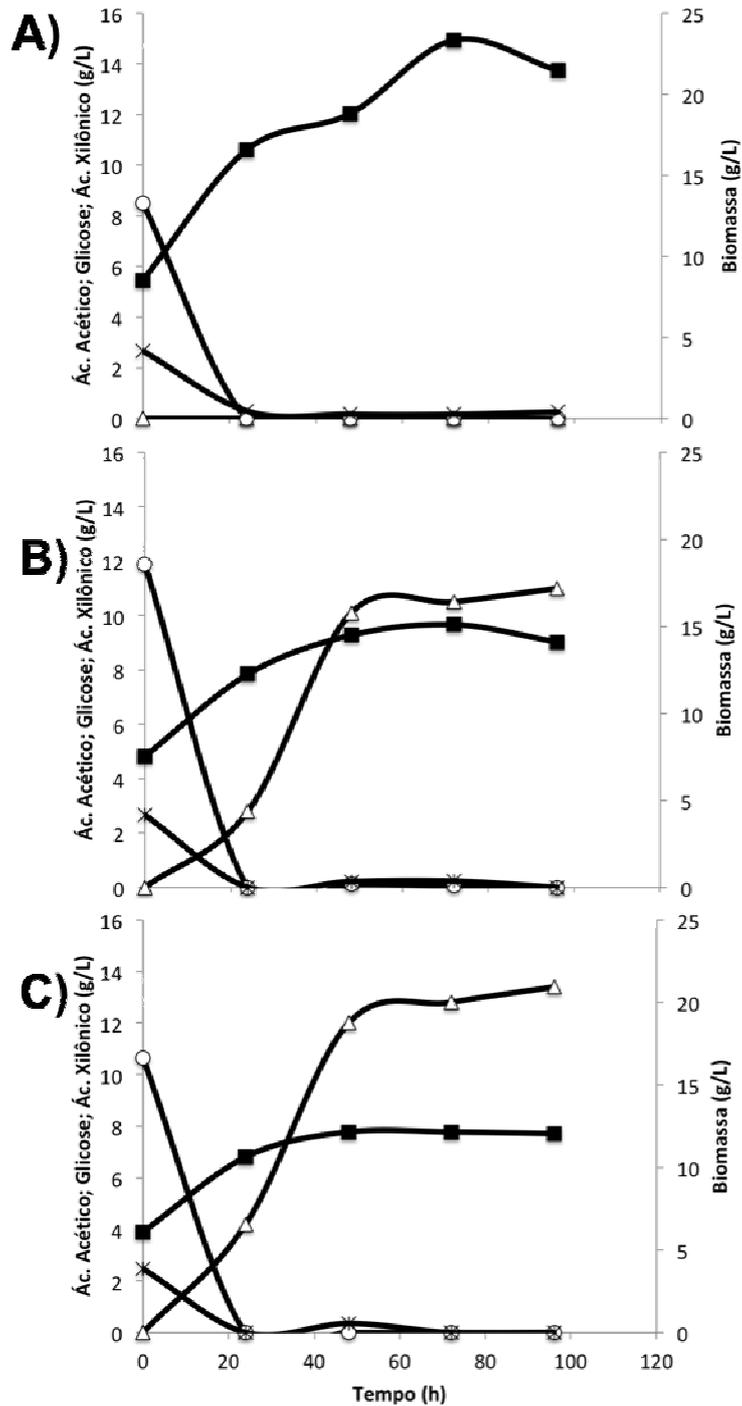


Figura 19: Biomassa (■), consumo de glicose (○), ácido acético (x) e produção de ácido xilônico (Δ) por linhagens recombinantes de *K. phaffii* controle (A), P2BS6 (B) e P1HL2 (C). As linhagens P2BS6, P1HL2 e o controle foram cultivados em bagaço de cana-de-açúcar 20% suplementado com xilose para concentração final de 40 g/L e glicose para a concentração final de 12 g/L.

Tabela 12: Consumo de xilose, rendimento e produtividade das linhagens P2BS6 e P1HL2 da fermentação em frasco utilizando bagaço de cana-de-açúcar 20%.

Linhagens	Xilose inicial (g/L)	Ácido Xilônico produzido (g/L)	Xilose final (g/L)	Rendimento (g _{ax} /g _x)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
C-	26,742	0	26,742	0	0
BS	27,604	11 ± 0,57	16,604	0,40 ± 0,013	0,008 ± 0
HL	27,066	13,4 ± 1,98	13,666	0,50 ± 0,074	0,011 ± 0,0027

5.8 Caracterização das linhagens produtoras de ácido xilônico em biorreator com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Como a produção de ácido xilônico é favorecida em condições controladas, decidiu-se avaliar a capacidade de produção de ácido xilônico pelas linhagens em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar no biorreator. Foi utilizada apenas a linhagem P1HL2, correspondente ao gene *xyIB-hl*, que se mostrou ao longo desse trabalho a melhor produtora de ácido xilônico. A linhagem foi cultivada, no biorreator em duplicata, utilizando bagaço de cana-de-açúcar nas mesmas condições descritas para o experimento anterior. A cinética de fermentação foi acompanhada em intervalos regulares de tempo. A biomassa, o consumo de glicose e de ácido acético, e a produção de ácido xilônico foram medidos (Figura 20; A e B). O consumo de xilose foi estimado de forma indireta e representado na tabela 13 junto com o rendimento e produtividade da linhagem e da sua duplicata.

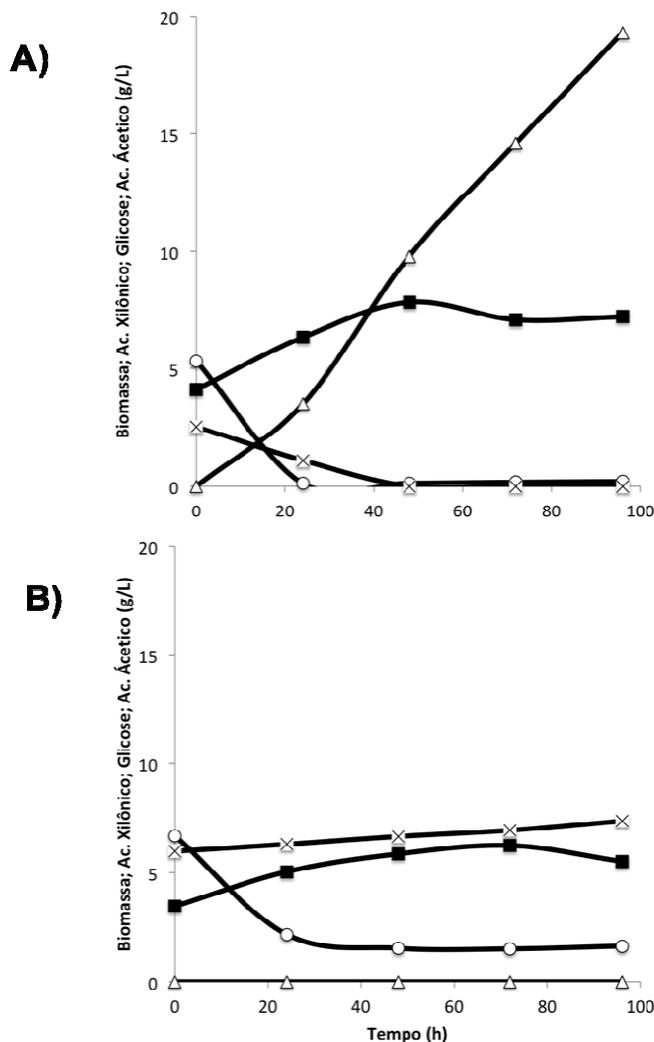


Figura 20: Biomassa (■), consumo de glicose (●), ácido acético (▲) e produção de ácido xilônico (×) pela linhagem recombinante de *K. phaffii* P1HL2 (A) e a sua duplicata (B). A linhagem P1HL2 e a sua duplicata foram cultivados em bagaço de cana-de-açúcar 20% suplementado com xilose para concentração final de 40 g/L e glicose para a concentração final de 12 g/L.

Tabela 13: Consumo de xilose, rendimento e a produtividade da linhagem P1HL2 e a sua duplicata da fermentação em biorreator utilizando bagaço de cana-de-açúcar 20%.

Linhagem	Xilose inicial (g/L)	Ácido produzido (g/L)	Xilônico (g/L)	Xilose final (g/L)	Rendimento (g_{ax}/g_x)	Produtividade ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
HL1	28,184	19,3		8,884	0,68	0,028
HL2	36,582	0		36,582	0	0

Esse experimento foi realizado duas vezes, pois na primeira tentativa as leveduras tiveram um comportamento de crescimento similar ao demonstrado em todas as outras fermentações, porém quando foi analisada a produção de ácido xilônico não houve a produção do mesmo (dados não

mostrados). Na segunda tentativa apenas uma das duplicatas (HL1) foi capaz de produzir o ácido xilônico, enquanto que a outra (HL2) mostrou um perfil igual ao da primeira tentativa (Figura 20). O clone HL1 teve uma produção de 19,3 g/L de ácido xilônico, um rendimento de 0,68 g/g e uma produtividade de 0,028 g.L⁻¹.h⁻¹ (Figura 20 e tabela 13). Houve aumento de todos os parâmetros quando comparado a produção em frasco (13,4 g/L, 0,5 g/g e 0,011 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente) para essa mesma linhagem. Esse aumento corresponde as expectativas pois, como foi dito no tópico anterior, no biorreator é possível fazer um maior controle do pH e aeração ao longo de todo o experimento e assim melhorar a produção de ácido xilônico.

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foram identificadas três novas xilose desidrogenases, sendo duas de bactérias: *xyIB-hl*, proveniente da bactéria *Halomonas lutea* e *xyIB-bs* proveniente da bactéria *Brevundimonas subvibrioides*, e uma de fungo: *xyIB-FM*, proveniente do fungo filamentoso *Fomitiporia mediterranea*. Previamente, foram descritos somente a produção de ácido xilônico utilizando microrganismo geneticamente modificado com os genes *xyIB* de *Caulobacter crescentus* (STEPHENS et al., 2007) e o gene *XYD1* proveniente de *Trichoderma reesei* (BERGHÄLL et al., 2007). Com isso, passaram-se a ser conhecidos cinco genes para xilose desidrogenase, os quais permitiram a produção de ácido xilônico em microrganismos geneticamente modificados, sendo que mais da metade deles (3) foi descoberta nesse trabalho.

Pela primeira vez, a levedura *Komagataella phaffii* foi utilizada para a produção de ácido xilônico. Os microrganismos descrito na literatura foram as bactérias *E. coli* (LIU et al., 2012) e *K. pneumoniae* (WANG et al., 2016) e as leveduras *S. cerevisiae* (TOIVARI et al., 2010);(TOIVARI et al., 2012a), *K. lactis* (NYGÅRD et al., 2011), *C. glycerinogenes* (JI et al., 2017b) e *P. kudriazevii* (TOIVARI et al., 2013). Nesse trabalho foi provado que a levedura *K. phaffii*, modificada geneticamente, consegue produzir ácido xilônico, a partir de xilose, e com isso aumenta-se o número de microrganismo disponíveis para a produção de ácido xilônico.

Apesar de ser a primeira vez que a *K. phaffii* foi usada para a produção de ácido xilônico, existem na literatura trabalhos que mostram a produção de ácidos orgânicos nessa levedura. Uma linhagem de *K. phaffii* expressando o gene *LDHb* e o transportador PAS foi capaz de produzir ácido láctico a partir de glicerol alcançando um rendimento de 0,7 g/g e produção máxima de 22 g/L de ácido láctico (DE LIMA et al., 2016). Se considerarmos o rendimento das linhagens P1HL2 e P2BS6 (0,98 g/g e 0,94 g/g) podemos ver que a levedura mostra grande potencial para a produção de ácidos orgânicos e em especial para o ácido xilônico. Além disso, a produção de aproximadamente 40 g/L de ácido xilônico indica que a levedura tem boa capacidade de tolerar

altas concentrações de ácido, conforme previamente indicado (DE LIMA et al., 2016).

No experimento de fermentação em biorreator a linhagem P1BS6 alcançou um rendimento de 0,94 g/g enquanto que a linhagem P2HL1 alcançou um rendimento de 0,98 g/g (Figura 21). Esses rendimentos podem ser comparados com os da literatura: *S. cerevisiae* 0,80 g/g (TOIVARI et al., 2012a); *P. kudriavzevii* 1.00 g/g (TOIVARI et al., 2013); *K. lactis* 0,6 g/g (NYGÅRD et al., 2011), *E. coli* 0,98 g/g (LIU et al., 2012) e *C. glycerinogenes* 0,76 g/g (JI et al., 2017a). As duas linhagens conseguiram um rendimento melhor do que o obtido nas leveduras *S. cerevisiae*, *C. glycerinogenes* e *K. lactis* e a linhagem P1HL2 obteve um rendimento igual ao o obtido pela bactéria *E. coli*.

Apesar de a produtividade das duas linhagens ser baixa ($0,028 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (Figura 21) se comparada com as relatadas na literatura ($1.4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para a *P. kudriavzevii*) é preciso ressaltar que o meio de cultura utilizados nos experimentos foi o FM22, que é um meio de cultura mineral mínimo enquanto que o meio de cultura utilizado para a *P. kudriavzevii*, o microrganismo com melhor desempenho da literatura, foi o YPD suplementado com xilose (TOIVARI et al., 2013). O meio de cultura YPD é um meio de cultura rico e muito mais caro se comparado com o meio FM22, isso torna o seu uso na indústria, para a produção em larga escala do ácido xilônico limitante.

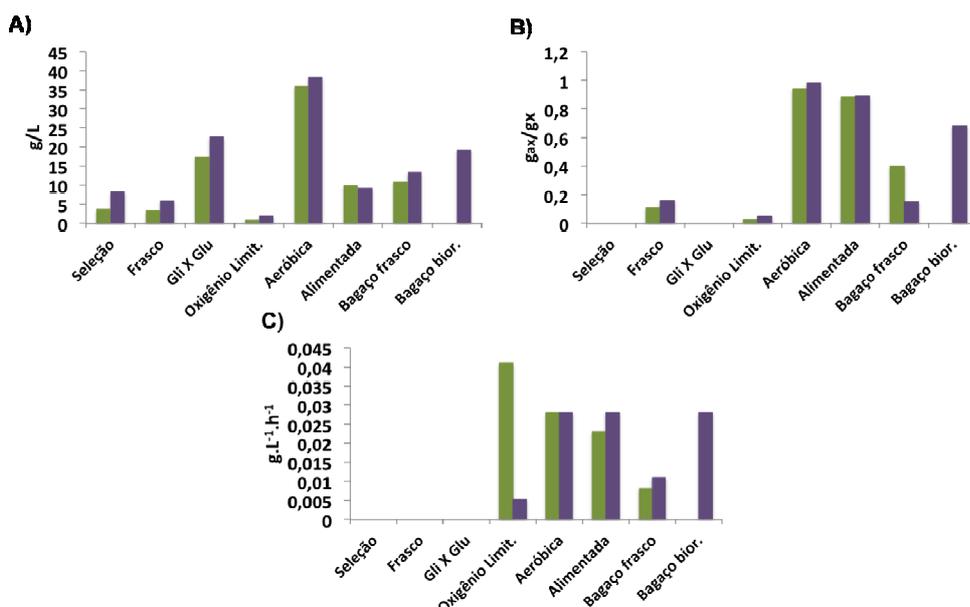


Figura 21: Gráfico resumindo os dados de produção de ácido xilônico (A); rendimento (B) e produtividade (C) alcançados pelas linhagens: P2BS6, contendo o gene *xyIB-bs* (barras verdes) e P1HL2, contendo o gene *xyIB-hl* (barras roxas) nos experimentos realizados ao longo desse trabalho.

É preciso ressaltar que as leveduras *S. cerevisiae*, *K. lactis* e a bactéria *E. coli* sofreram mais modificações que só a introdução dos genes de XDH para alcançarem maiores valores de rendimento e produtividade (0,8 g/g e 0,36 g.L⁻¹.h⁻¹ para a *S. cerevisiae*; 0,6 g/g e 0,16 g.L⁻¹.h⁻¹ para *K. lactis* e 1 g/g e 1,09 g.L⁻¹.h⁻¹ para *E. coli*). No caso de *S. cerevisiae* foi também introduzido o gene a enzima xilolactanase e deletados genes da via oxo-redutiva natural da levedura além do gene *GRE3* (TOIVARI et al., 2012a); na *K. lactis* foi deletado o gene de xilose redutase (NYGÅRD et al., 2011) e em *E. coli* foram interrompidos os genes de xilose isomerase e xiluloquinase, naturais da bactéria além da introdução do gene de xilolactanase (LIU et al., 2012). Esses estudos dão ideias de possíveis metodologias que podem ser aplicadas para melhorar a produtividade e rendimento de ácido xilônico nas linhagens obtidas nesse trabalho. Outras possibilidades, incluem: avaliar diferentes meios de cultura, por exemplo, emprego de meios ricos; engenharia das linhagens recombinantes com aumento do número de cópias dos genes (algo ainda não analisado nesse trabalho); expressão de transportadores de xilose.; expressão de uma lactanase em conjunto com a

XDH. Empregando essa estratégia, Toivari et al conseguiu aumentar a produção de ácido xilônico em linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* (TOIVARI et al., 2012a).

Além da comprovação de que os novos genes que codificam para XDH, propostos no começo desse trabalho, possuíam atividade e podem ser usados para a produção de ácido xilônico a partir de xilose, também foram feitos experimentos para ver a capacidade de produção do ácido utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. As duas linhagens, P2BS6 e P1HL2 foram capazes de produzir ácido xilônico utilizando o hidrolisado. Empregando a bactéria *Gluconobacter oxydans*, produtora natural de ácido xilônico, e hidrolisado de palha de milho como substrato, foi possível produzir ácido xilônico a um rendimento de 0,95 g/g (ZHU et al., 2015). A bactéria *K. pneumoniae*, produtora natural de ácido xilônico, também foi usada para a produção de ácido xilônico em hidrolisado de bambu. Nesse experimento foi obtido um rendimento de 0,87 g/g (WANG et al., 2016). O rendimento da linhagem P1HL2, em biorreator utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar foi de 0,68 g/g. Essas diferenças nos rendimentos obtidos na literatura em comparação com os reportados nesse trabalho podem ser explicadas pelo fato de que ambos os microrganismos são produtores naturais de ácido xilônico e diferenças na composição dos hidrolisados e pré-tratamentos utilizados levando assim a uma diferença na concentração de compostos inibidores.

Se olharmos o rendimento e a produtividade das linhagens em frasco utilizando bagaço de cana-de-açúcar (Tabela 12) eles foram mais baixos para ambas as linhagens quando comparadas com os experimentos em biorreator (Tabela 10), Isso pode ser explicado pois o hidrolisado contém inibidores tais como ácido acético e furfural que não estão presentes no meio FM22, e que podem atrapalhar a produção e crescimento da levedura. Outra diferença, que também interfere na produção do ácido e, portanto, contribui para essa baixa no rendimento e produtividade é o fato desse experimento ter sido realizado em frascos. Experimentos em frasco são mais difíceis de se controlar o pH e oxigenação ao longo de toda a fermentação e já foi demonstrado em experimentos anteriores (Figuras 14A e 17) que o pH tem

grande importância para a produção de ácido xilônico (TOIVARI et al., 2012a).

A levedura *K. phaffii* possui a capacidade de usar tanto glicose quanto o glicerol como fontes de carbono (MATTANOVICH et al., 2009). Foi observado uma diferença na produção de ácido xilônico, na linhagem P1HL2, quando se usava glicose ou glicerol como co-substratos na fermentação (12,3 g/L e 22,8 g/L, respectivamente). Uma possível explicação para esse ocorrido pode ser a regeneração de cofatores quando empregando glicose e glicerol, o qual em última análise afetaria a atividade da enzima secretada. Buscou-se confirmar essa hipótese pela caracterização da atividade enzimática total e preferência de cofatores das enzimas XDH-HL e XDH-BS em extratos celulares.

Foram feitas diversas tentativas de medir a atividade enzimática das XDH-BS e XDH-HL utilizando o lisado obtido das linhagens, porém, em nenhum desses ensaios, foi possível detectar a atividade da enzima (dados não mostrados). No trabalho do grupo (SUZUKI; ONISHI, 1973) foi feita caracterização de uma XDH NADP⁺, proveniente de uma *Pichia quercuum*, mas que os ensaios eram difíceis pois essas espécies de levedura possuem uma xilose redutase dependente de NADPH acoplada é isso complicava os ensaios, pois os ensaios enzimáticos para detectar atividade XDH são realizados de forma indireta com a detecção da formação do NAD(P)H. Para a realização dos ensaios enzimáticos a enzima XDH precisa estar purificada se não corre-se o risco de interferência pela ação da NADPH xilose redutase. Esse trabalho possivelmente explica o porque das tentativas de medir a atividade enzimática, utilizando o lisado celular, terem falhado. Após essas tentativas foram realizados experimentos de purificação, mas não foram obtidas enzimas, tanto do gene *xyIB-bs* quanto do *xyIB-hl*, que estivessem completamente purificadas e os ensaios para detecção de atividade enzimática continuaram falhando.

7 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, 5 novos genes que codificam para xilose desidrogenase foram identificados (*xyIB-ap*, *xyIB-bs*, *xyIB-bx*, *xyIB-cs*, *xyIB-FM* e *xyIB-hl*) e a expressão de 3 deles (*xyIB-bs*, *xyIB-FM* e *xyIB-hl*), em *K. phaffii*, possibilitou a geração de linhagens capazes de produzir ácido xilônico.

As linhagens expressando os genes *xyIB-bs* e *xyIB-hl* foram as melhores produtoras de ácido. Em biorreator as linhagens P1HL2 e P2BS6 chegaram a uma produção de ácido xilônico de 38,4 g/L e 36,2 g/L, respectivamente, partindo do meio de cultura FM22 suplementado com 40 g/L de xilose e 10 g/L de glicerol.

Pela primeira vez, a levedura *K. phaffii* foi utilizada para a produção de ácido xilônico. Isso faz com que o trabalho desenvolvido seja inédito e confirme o potencial dessa levedura para produção de ácidos orgânicos em altas concentrações.

8 TRABALHOS PUBLICADOS

Os resultados gerados nessa tese permitiram a publicação dos seguintes documentos.

8.1 Pedido de patente

Número do processo: BR 10 2018 001359 9

Natureza da patente: Patente de invenção (PI)

Título da invenção: KOMAGATAELLA PHAFFII RECOMBINANTE
PRODUTORA DE ÁCIDO XILÔNICO E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE
ÁCIDO XILÔNICO A PARTIR DE XILOSE

Resumo: A presente invenção descreve um novo e inventivo método de produção de ácido xilônico a partir de xilose utilizando microorganismos recombinantes. A invenção ainda provê moléculas de ácido nucléico e outros elementos, método de produção de microorganismos recombinantes, assim como os microorganismos que incorporem tais elementos, demonstrando sua efetividade na síntese de ácido xilônico e ilustrando uma das diversas possibilidades de aplicação

8.2 Capítulo de livro

Título do livro: Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Applications

Capítulo: Chapter 2. Biotechnological application of non-conventional yeasts for xylose valorization

Editora: Springer Books

Manuscrito em preparação

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIM (2012) ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. <http://www.abiquim.org.br/home/associacao-brasileira-da-industria-quimica>

Acesso em: 15 março 2012.

UNICA (2018) BRAZILIAN SUGARCANE INDUSTRI ASSOCIATION

<http://www.unicadata.com.br/index.php?idioma=2>

Acesso em: 20 de dezembro de 2018

AGGER, J.; VIKSØ-NIELSEN, A.; MEYER, A. S. Enzymatic xylose release from pretreated corn bran arabinoxylan: differential effects of deacetylation and deferuloylation on insoluble and soluble substrate fractions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6141–6148, 26 maio 2010.

ALMEIDA JR, FAVARO LC.; QUIRINO BF. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels** 5: 48. 2012.

ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Microbial production of specialty organic acids from renewable and waste materials. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 497–513, 2 out. 2015.

ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 367–370, 1 mar. 2013.

ARAÚJO, D. et al. Co-production of chitin-glucan complex and xylitol by *Komagataella pastoris* using glucose and xylose mixtures as carbon source. **Carbohydrate Polymers**, v. 166, p. 24–30, 15 jun. 2017.

ASSUNÇÃO, F. C. R.; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (BRAZIL) (EDS.). **Química verde no Brasil, 2010-2030**. Ed. rev. e atualizada ed. Brasília, DF: CGEE, 2010.

BABAU, M. et al. Towards a Microbial Production of Fatty Acids as Precursors of Biokerosene from Glucose and Xylose. **Oil & Gas Science and Technology – Revue d'IFP Energies nouvelles**, v. 68, n. 5, p. 899–911, set. 2013.

BALLESTEROS, I. et al. Ethanol Production From Steam-Explosion Pretreated Wheat Straw. In: MCMILLAN, J. D. et al. (Eds.). **Twenty-Seventh Symposium**

on **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. ABAB Symposium. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 496–508.

BERGENSTRÄHLE, M. et al. Simulation studies of the insolubility of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 14, p. 2060–2066, 23 set. 2010.

BERGHÄLL, S. et al. Identification in the mould *Hypocrea jecorina* of a gene encoding an NADP(+): d-xylose dehydrogenase. **FEMS microbiology letters**, v. 277, n. 2, p. 249–253, dez. 2007.

CELIŃSKA, E.; GRAJEK, W. Biotechnological production of 2,3-butanediol Current state and prospects. **Biotechnology Advances**, Biotechnology for the Sustainability of Human Society. v. 27, n. 6, p. 715–725, 1 nov. 2009.

CHEN, W.-H. et al. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2916–2924, 1 fev. 2011.

CHEN, Y.; NIELSEN, J. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, Food biotechnology • Plant biotechnology. v. 37, n. Supplement C, p. 165–172, 1 fev. 2016.

CHENG, H. et al. Genetically engineered *Pichia pastoris* yeast for conversion of glucose to xylitol by a single-fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3539–3552, 1 abr. 2014.

CREGG, J. et al. Classical Genetic Manipulation. In: HIGGINS, D.; CREGG, J. (Eds.). **Pichia Protocols**. Methods in Molecular Biology™. [s.l.] Humana Press, 1998. p. 17–26.

CREGG, J. M. et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23–52, set. 2000.

DE LEDERKREMER, R. M.; MARINO, C. ACIDS AND OTHER PRODUCTS OF OXIDATION OF SUGARS**This chapter and the following chapter by Varela constitute an integrated overview of the products formed by oxidation of carbohydrates and the reactions involved. The subject of this contribution is structured along lines similar to the article by Theander in the 1980 second edition of “The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry,” edited by W. Pigman and D. Horton. It includes key early references but deals for the most part with work published after 1980. The original article by Theander1 remains a key resource for additional detail on earlier developments. In: **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. [s.l.] Academic Press, 2003. v. 58p. 199–306.

DE LIMA, P. B. A. et al. Novel homologous lactate transporter improves L-lactic acid production from glycerol in recombinant strains of *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 158, 15 set. 2016.

ERICKSON, B.; NELSON; WINTERS, P. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 2, p. 176–185, 2012.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. **Lipids**, v. 18, n. 9, p. 623–629, 1983.

FAKAS, S. et al. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 4, p. 573–580, 1 abr. 2009.

GAO, D. et al. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 315–321, 1 abr. 2013a.

GAO, L. et al. Engineered fungal polyketide biosynthesis in *Pichia pastoris*: a potential excellent host for polyketide production. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 77, 8 set. 2013b.

GARCÍA-CUBERO, M. T. et al. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1608–1613, 1 fev. 2009.

GOVERNO, A. T. et al. Electro-oxidation of d-xylose on platinum and gold electrodes in alkaline medium. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 9, p. 1535–1545, 15 abr. 2004.

HE, Y. et al. Expression and characterization of a *Talaromyces marneffeii* active phospholipase B expressed in a *Pichia pastoris* expression system. **Emerging Microbes & Infections**, v. 5, n. 11, p. e120, 23 nov. 2016.

HU, C. et al. Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 25, 24 ago. 2011.

Jl, H. et al. A synthetic hybrid promoter for D-xylonate production at low pH in the tolerant yeast *Candida glycerinogenes*. **Bioengineered**, p. 1–7, 4 maio 2017a.

Jl, H. et al. A synthetic hybrid promoter for D-xylonate production at low pH in the tolerant yeast *Candida glycerinogenes*. **Bioengineered**, v. 8, n. 6, p. 700–706, 2 nov. 2017b.

KIM, D. et al. Maleic acid treatment of biologically detoxified corn stover liquor. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 437–445, 1 set. 2016.

KIM, D. Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 309, fev. 2018.

KIM, D.; WOO, H. M. Deciphering bacterial xylose metabolism and metabolic engineering of industrial microorganisms for use as efficient microbial cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 22, p. 9471–9480, 1 nov. 2018.

KIM, S.-J. et al. Enhanced production of 2,3-butanediol from xylose by combinatorial engineering of xylose metabolic pathway and cofactor regeneration in pyruvate decarboxylase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, SI on Advances in Industrial Bioprocesses and Products- Genetic and Metabolic Engineering Interventions. v. 245, p. 1551–1557, 1 dez. 2017.

KIM, T. H.; TAYLOR, F.; HICKS, K. B. Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5694–5702, 1 set. 2008.

KUMDAM, H.; NARAYANA MURTHY, S.; GUMMADI, S. N. Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 23, 9 maio 2013.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. [s.l.] Elsevier, 2011.

KURTZMAN, C. 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, n. Pt 2, p. 973–976, mar. 2005.

LI, B.-Z. et al. Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1285–1292, 1 fev. 2010a.

LI, C. et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives. v. 101, n. 13, p. 4900–4906, 1 jul. 2010b.

LI, P. et al. Construction of efficient xylose utilizing *Pichia pastoris* for industrial enzyme production. **Microbial Cell Factories**, v. 14, p. 22, 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. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249–270, 1 mar. 2005.
- MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, International Conference on Enzyme Technology “RELATENZ 2005”. v. 40, n. 3, p. 426–432, 5 fev. 2007.
- 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, 1 ago. 2009.
- MATTANOVICH, D. et al. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, p. 29, 2 jun. 2009.
- MEHTIÖ, T. et al. Production and applications of carbohydrate-derived sugar acids as generic biobased chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 904–916, 2 set. 2016.
- MONDALA, A. et al. Enhanced microbial oil production by activated sludge microorganisms via co-fermentation of glucose and xylose. **AIChE Journal**, v. 59, n. 11, p. 4036–4044, 2013.
- 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.
- RAMACHANDRAN, S. et al. Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 185, 185–195, 195, 15 jun. 2006.
- SINGH, O. V.; KUMAR, R. Biotechnological production of gluconic acid: future implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 4, p. 713–722, 1 jun. 2007.
- SIRIPONG, W. et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of isobutanol and isobutyl acetate. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1, 8 jan. 2018.
- STEPHENS, C. et al. Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 5, p. 2181–2185, mar. 2007.
- SUNDARAMOORTHY, B.; GUMMADI, S. N. Screening of new yeast *Pichia manchurica* for arabitol production. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 256–266, 2019.

SUZUKI, T.; ONISHI, H. Oxidation and reduction of D-xylose by cell-free extract of *Pichia quercuum*. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 850–852, maio 1973.

TOIVARI, M. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of D-xylose to D-xylonate. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 4, p. 427–436, jul. 2012a.

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. 2012b.

UM, J. et al. Metabolic engineering of *Enterobacter aerogenes* for 2,3-butanediol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 245, n. Pt B, p. 1567–1574, dez. 2017.

VALDEHUESA, K. N. G. et al. Everyone loves an underdog: metabolic engineering of the xylose oxidative pathway in recombinant microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 12 jul. 2018.

VERAS, H. C. T.; PARACHIN, N. S.; ALMEIDA, J. R. M. Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 153, 13 set. 2017.

WANG, C. et al. Production of xylonic acid by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 23, p. 10055–10063, 1 dez. 2016.

ZHU, J. et al. Integrated Production of Xylonic Acid and Bioethanol from Acid-Catalyzed Steam-Exploded Corn Stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 5, p. 1370–1381, jul. 2015.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)

10 ANEXOS

10.1 Sequência de DNA dos genes:

xyIB-ap

ATGGTTAACGCTGGTAACAGAACTGGTTTCAGATTGACTATCTCCTACT
TGTTCCGGTGCTGACACTATGGCTATCGACGCTATCTACCCATCCTTGAAGGGT
AAGACTGTTTTGATCACTGGTGGTGGTTCCGGTATTGGTGAGGCTTTGACTA
GAGCTTTCATTGACCAGGGTGCTAAGGTTGGTTTCTTGGACTACGACCAACA
AGCTTCCCAGGCTTTGATTGCTGACATCAACTCTCCAAACTTGCACCTCGAG
TACTGTGACTTGAGAGACATCGACGCCTTGCAGGCTTCTGTTAGAGCTGTTT
CTGCTCAGTTGGGTGCTATCAGAGTTTTGGTTAACAACGCTGCTAGAGATGA
CAGACACTCCTTGGCTTCCGTTACTTCTGAATACTTCGACGAGAGAATCGCT
ACAAACTTGAAGCACCAGTTGTTTCGCTGCTCAAGCTGTTGCTCCACAAATGG
CTGAAGCTGGTGGTGGATCTATCATCAACATGGGTTCCACATCCTGGTTGAT
TGGTCAAGGTGGTATGCCATGTTACTACTGCTAAGTCCGCTGTTCCAGGGT
TTGACTAGAGGTTTGGCTAGAGATTTGGGTCCAGACAACATCAGAGTTAACT
CCGTTATCCCAGGTTGGATCATGACTCAGAGACAGGTTGACATGTGGTTGAC
TGAAGAGTCCGAGAAAGAATTGATGCAGAGACAGTGTGTTAAGAGAAAGTTG
GTTCCAGAGGACATTGCTAGATTCGTTTTGTTTCATGGCTTCCGACGAAGCTG
GTGCTTGTCTAACCAGTCTTACATCGTTGACGGTGGTTGGGTTGTCTGACTC
TAGAATTAATTAATGGAGCACAAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTG
C

xyIB-bs

ATGTCCGGTGCTGTTTACCCATCTTTGAAGGGTAGATTGGTTGTTGTT
ACTGGTGGTGGTCCGGTATTGGTGCTGCTTTGACTGAAGGTTTCGCTAGAC
AAGGTGCTAGAGTTATCTTCTTGGACAGAGCTGAAGCTGAGTCCAGAGAATT

GGCTGAAAGATTGGCTGACTGTTCCCCAGGTCCAGTTTTTCAGATCTTGTGAC
TTGTTGGACTTGGGTGCCTTGCAGACTGCTTTGGCTGGTATTATGGCTGAGC
ACGGTCCAATCGACGTTTTTGTGAACAACGCTGCTAACGACGACAGACACA
CTTTGGCTGAAGTTACTCCAGCTTACTGGGACGACAGAATCGGTGTTAACTT
GAGACACTTGTACTTCGCTGCTCAGGCTGTTGCTCCAGGTATGAGAGCTAGA
GGTAGAGGTGTTATCTTGAACCTGGGTTCCATCTCCTGGCACTTGGGTTTGC
CAGATTTGTCCATCTACGAGACTGCTAAGGCTGGTATCGAGGGTATGACTAG
AGCTTTGGCTAGAGAATTGGGTACTGACGGTGTTAGAGTTGCTTGTATCGTT
CCAGGTAACGTTAGAACTCCAAGACAGATGAAGTGGTACACTCCAGAAGGT
GAGGCTGAAATCGTTGCTGCTCAATGTTTGAAGGGAAGAATCGAGCCACAA
GACGTTGCTGCTTTGGCTTTGTTCTTGGCTTCTGACGACGCTAGATTCATCA
CTGGTCACGAGTACTTCGTTGACGCTGGTTGGAGAGTCGACTCTAGAATTAA
TTAATGGAGCACAAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGC

xyIB-bx

ATGTACTIONGTTGTCCTACCCAGAGCAAGTTGACTACCCAATGTCCTAC
GCTATCTACCCATCTTTGTCCGGTAAGACTGTTGTTATCACTGGTGGTGGTT
CCGGTATTGGTGCTGCTATGGTTGAAGCTTTCGCTAGACAAGGTGCTAGAG
TTTTCTTCTTGGACGTTGCTGAGGACGACTCCTTGGCCTTGCAACAATCTTT
GTCTGATGCTCCACACCCACCTTTGTTGAGAAGATGTGACTTGAGATCCGTT
GACGCTATCCACTCTGCTTTCGCTGGTATCGTTGAAATCGCTGGTCCAATCG
AGGTTTTGGTTAACAACGCTGGTAACGACGACAGACACGAGGTTGATGCTA
TACTCCAGCTTACTGGGACGAGAGAATGGCTGTTAACTTGAGACACCAGTT
TTTCTGTGCTCAGGCTGCTGCTGCTGGTATGAGAAAGATTGGTAGAGGTGT
TATCTTGAACCTGGGTTCCGTTTCCTGGCACTTGGCTTTGCCAACTTGGCT
ATCTACATGTCCGCTAAGGCTGGTATCGAGGGTTTACTAGAGGTTTGGCT
AGAGATTTGGGTGCTGCTGGAATCAGAGTTAACTGTATCATCCCAGGTGCT
GTTAGAACTCCAAGACAGATGCAATTGTGGCAATCTCCAGAATCCGAGGCT
AAGTTGGTTGCTTCCCAGTGTTTGAAGATTGAGAATCGAGCCAGAGCACGTT

GCTAGAATGGCTTTGTTCTTGGCTTCTGACGACGCTTCCAGATGTTCTGGTA
GAGACTACTTCGTTGACGCTGGTTGGTACGGTGAAGTCGACTCTAGAATTA
ATTAATGGAGCACAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGC

xyIB-cc

ATGTCCTCTGCTATCTACCCATCCTTGAAGGGTAAGAGAGTTGTTATCA
CTGGAGGTGGTTCCGGTATTGGTGCTGGTTTGACTGCTGGTTTTGCTAGACA
AGGTGCTGAGGTTATCTTCTTGGACATTGCTGATGAGGACTCCAGAGCTTTG
GAAGCTGAATTGGCTGGTTCTCCAATCCCACCAGTTTACAAGAGATGTGACT
TGATGAACTTGGAGGCTATCAAGGCTGTTTTCGCTGAGATTGGTGACGTTGA
CGTTTTGGTTAACAACGCTGGTAACGACGACAGACACAAGTTGGCTGATGTT
ACTGGTGCTTACTGGGACGAGAGAATCAACGTTAACTTGAGACACATGTTGT
TCTGTACTCAGGCTGTTGCTCCAGGTATGAAGAAACGTGGTGGTGGTGCTG
TTATCAACTTCGGTTCTATTTCTGGCACTTGGGTTTGGAGGACTTGGTCTTG
TACGAGACTGCTAAGGCTGGTATCGAGGGTATGACTAGAGCTTTGGCTAGAG
AATTGGGTCCAGACGACATCAGAGTTACTTGTGTTGTTCCAGGTAACGTTAA
GACTAAGAGACAAGAGAAGTGGTACACTCCAGAGGGTGAGGCTCAAATCGT
TGCTGCTCAATGTTTGAAGGGTAGAATCGTTCCAGAGAACGTTGCTGCTTTG
GTTTTGTTCTTGGCTTCTGACGACGCTTCCTTGTGTACTGGTCACGAATACT
GGATTGACGCTGGTTGGAGAGTCGACTCTAGAATTAATTAATGGAGCACAAG
ACTGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGC

xyIB-cs

ATGTCCTCTGCTATCTACCCATCCTTGAAGGGTAAGAGAGTTGTTATC
ACTGGAGGTGGTTCCGGTATTGGTGCTGGTTTGGTTGCTGGTTTCGTTAGA
CAAGGTGCTGAGGTTATCTTCTTGGACATCGTTGACGCTGACTCCCAAGCTT
TGGTTGCTGAATTGTCTAAGGACGCTGTTATCGCTCCAGTTTACAAGAGATG

TGACTTGATGGACATCGACGCTTTGAAGGCTACTTTCGCTGAGATTGGTGAC
GTTGACGTTTTGGTTAACAAACGCTGGTAACGACGACAGACACTCTTTGGCTG
ATTTGACTCCAGCTTACTGGGACAACAGAATCGGTGTTAACTTGAGACACAT
GGTTTTCGCTGCTCAGGCTGTTGCTGGTGGTATGAAGAAACGTGGTGGTGG
TGCTATCATCAACTTCGGTTCTATTTCCCTGGCACTTGGGTTTTGGAGGACTTG
GTCTTGTACGAGACTGCTAAGGCTGGTATCGAGGGTATGACTAGAGCTTTG
GCTAGAGAATTGGGTCCAGACGACATCAGAGTTACTTGTGTTGTTCCAGGT
AACGTTAAGACTAAGAGACAAGAGAAGTGGTACACTCCAGAAGGTGAGGCT
GAAATCGTTAAGGCTCAGTGTTTGAAGGGTAGAATCTTGCCAGACCACGTT
GCTTCATTGGTTTTGTTCTTGGCTTCTGACGACGCTTCCTTGTGTACTGGTC
ACGAATACTGGATTGACGCTGGTTGGAGAGTCGACTCTAGAATTAATTAATG
GAGCACAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGC

xyIB-hI

ATGACTCACCCATCTGCTAGATACCCATCCTTGGAGCAGAGAGTTGT
TTTCATCACTGGTGGTGGTTCCGGTATTGGTGCTGCTTTGACTAGAGCTTTC
CACAGACAAGGTGCTAGAGTTGTTTTTGTGACATTGCTAAAGAGGCTTCCA
AGGCTTTGGTTGAAGAGTTGGAATTGGAGACTGGTAGAGCACCATGTTTCG
AGTTCTGTGACATCAGAGATGTTGAGGCCTTGCAGTCCACTATCGTTAGAGT
TGGTGAGACTTTGGGTCCAATCAGAGTTTTGATCAACAACGCTGCTAACGAC
GACAGACACGATTGGAGAGATGTTGACGTTGCTTACTGGGACGAGAGAATG
TCCTTGAACCTGAGACCAATGTTCTTCACTATCCAGGCTGTTGCTGAGCAGA
TGAGAGAAGCTGGTGGTGGATCTATCATCAACTTCGGTTCCATCTCCGTTAG
ATTGGCTTTGGGTGATATGGCTGCTTACGTTTCTGCTAAGGCTGCTGTTAC
GGTTTACTAGATCTTTGGCTAGAGACTTGGGTCCACACGGTATCAGAGTTA
ACACTTTGGTTCCAGGTTCCGTTATGACTGAGAGACAGTTGGAGAAGTGGA
TTGGTCCAGAAGATGAGGCTAACATTCAGGCTCACCAGTGTTTGAAGGTTA
GATTGGAGGCTGAGCACATTGCTCCAGCTGCTTTGTTTTTGGCTGCTGACG
ACTCTGCTCAGATTTCCGCTCAAGAAATTCAGTTGATGGTGGTTGGGGTGT

CGACTCTAGAATTAATTAATGGAGCACAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCG
CTCACTGC

xyIB-FM

ATGTCTGCTGCTAAGCCATTCGTCTTGCCTGGGGTATTATTGGTGCT
GGTGGTATCTCCTCCAGATTCGTTGAGGATTTGGTCTTGCACCCAGAGGGT
AGAGGTAATACTGATGTTGCTCATGCTGTTGCTGCTGTTGGTTCCAGATCTT
TGGATAAGGCTCAAGAGTTCATCCAAAAGTACTGTCCAGAGGGTGGTTTCG
CTCAAAGGCTGGTTTGACTTCCACTAAGTCCGTTGCTAGAGGTTCCCTACGC
TGAAGTTTACTCCGATCCAAACGTTGACATCATCTACGTTGGTACTCCACAC
TCCTGTCACTTCGAGGATGCTAAGAACGCTTTGGATGCTGGTAAGCACGTTT
TGTTGGAGAAGCCAGCTACTTTGAACCAGGCTGAGTTTCGAGGTTTTGTCCA
AGTTGGCTAAGTCCAAGAACTTGTTCTTGATGGAAGCTGTTTGGACTAGATT
CTTCCCATTGACTTTCGCTTTGGAGGACGTTTTGTTCAAGCAAGAGGCTATC
GGTGAGATCAGAAGATTGCAATCCGACTTCTCCATCGACTTCATCGACGTTT
TGGACAACGAGTCCCACAGAATGTTGAACATCAACTTGGCTGGTGGTGGTT
TGTTGGACTTGGGTCCATATCCATTGGTTTGGGCTCTGTTGTTGTTGTACAA
CCACCCACAGAACGGTAGAACTCCACCAACTAACATCAAGGCTTCCATGGA
AAAGTACAAGACTGGTGTGACTTGCACACTAACTGGACTTTGGACTTCCCA
AGAATCGGTAAGACTGGTGTGCTAGAGCTGTTTTGTCCACTTCCATCAACGTTA
ACTCCCCATTGGACGTTGTTACTAGAATCCAGGGTACTAAGGGTGAGATCTT
GTTGCCATGGGCTACTGCTAGACCAGACAGATTCACTATCAGAAGATCCAA
GGTTGGTAGAGGTCCACAAGAGTACACTGAAGAGATCAAGGTTATCCCAAT
CCAGGGTATGGGTTTGAAGTGGGAAGCTGATGCTGTTGCTAGAGACATCAG
AGATGGTAAGATCGAGAACGCTAGAATGCCACACGCTGACACTTTGTTGGA
GTTGGCTATTTTCGACGAGGTTAGAAGACAGGGTGGTTACGTTTTCCAGA
GGGTATGGAAAAGGTTAAGTTGTCCACTGTCGACTCTAGAATTAATTAAGT
GCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGT