



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

Biologia sintética para a produção de etileno glicol em *Komagataella phaffii* a partir de xilose

Clara Vida Galvão Corrêa Carneiro



Brasília
2023

CLARA VIDA GALRÃO CORRÊA CARNEIRO

Biologia sintética para a produção de etileno glicol em *Komagataella phaffii* a partir de xilose

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília – UnB para fim de obtenção do título de doutora.

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

Brasília
2023

Ficha Catalográfica

CLARA VIDA GALRÃO CORRÊA CARNEIRO

Biologia sintética para a produção de Etileno Glicol em *Komagataella phaffii* a partir de Xilose

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília – UnB para fim de obtenção do título de doutora.

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

Brasília, 12 de dezembro de 2023.

Banca Examinadora

Dr. João Ricardo M. de Almeida
Orientador

Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres
Examinador

Dra. Monica Caramez Triches Damaso
Examinador

Dra. Nadielle Tamires Moreira Melo
Examinador

Dra. Viviane Castelo Branco Reis
Examinador

Dedico esta tese ao meu amado avô
Carneiro, que desde menina me incentivou a
ser Doutora.

AGRADECIMENTOS

Iniciei o doutorado 1 ano antes da pandemia de Covid-19, nunca poderia imaginar o que viria pela frente. Foram períodos muito difíceis, e não posso deixar de ser grata por estar viva.

Agradeço imensamente a quem ficou ao meu lado durante todo o período do meu doutoramento. Agradeço aos meus pais por terem me dado apoio e acolhimento, por terem sempre deixado muito claro que eu teria para onde voltar se as coisas não dessem certo. Que sempre torceram por mim e apoiaram cada decisão que tomei. Meu irmão Emanuel, que é e sempre foi meu fiel companheiro e meu melhor amigo. Agradeço ao meu avô Carneiro por ter confiado que eu seria doutora desde pequena. Agradeço à minha avó Rozélia que sempre esteve presente, comemorou e vibrou por cada conquista desde o início dos meus estudos. Minha avó Lizete, que me mostrou meu lado artístico, e esse lado se tornou o refúgio para qual eu pude recorrer quando estive nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu companheiro de vida Luis, que foi fundamental em todos os meus processos para finalizar essa tese. Que sem duvidar de nada se ofereceu para me acompanhar no meu estágio de doutorado sanduíche na Alemanha. Que nos dias que eu achei que não iria conseguir concluir essa tese, ele sempre esteve lá, me lembrando que eu era sim capaz.

Agradeço ao meu orientador, João Ricardo, que me guia no mundo acadêmico desde 2014, e que sempre acreditou no meu potencial. Aos meus colegas do LGBM da Embrapa Agroenergia, cada um de vocês foi crucial para a realização deste trabalho.

Agradeço à Débora, minha mentora, colega de laboratório e amiga, sem você esse doutorado não seria possível.

Agradeço à Luana, a melhor companheira de laboratório que alguém poderia ter.

Agradeço à Letícia, por ter sido parceira em todas as horas.

Agradeço à CAPES e Embrapa pelo suporte financeiro.

E como a Luana sabiamente disse na tese dela, e aqui eu repito: eu agradeço a mim mesma, que tive forças para continuar.

“O pensamento científico é a própria consciência da extensão da nossa ignorância e da natureza dinâmica do conhecimento. É a dúvida, não a certeza que nos faz avançar. [...] Devemos confiar na ciência não por ela oferecer certezas, mas porque não as tem.”
Carlo Rovelli.

RESUMO

O etileno glicol é uma molécula versátil produzida na indústria petroquímica e amplamente utilizada na fabricação de polímeros plásticos (PET), anticongelantes, e fluidos automotivos. Também pode ser utilizado como monômero bloco construtor para a produção de moléculas na indústria química e farmacêutica. Atualmente, a produção de etileno glicol é química ou semibiológica, o que gera impacto negativo no meio ambiente. A produção biotecnológica de etileno glicol pode ocorrer por vias sintéticas através da redução de glicaldeído, utilizando xilose como substrato, açúcar presente em hidrolisados de biomassa de cana de açúcar. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo desenvolver um processo de produção de etileno glicol a partir de xilose, utilizando a levedura *Komagataella phaffii* como plataforma microbiana. Uma via metabólica sintética de produção de etileno glicol baseada nas enzimas xilose desidrogenase (XDH), xilonato desidratase (XD), aldolase (ALDO) e aldose redutase (ALDR) foi construída *in silico* e implementada pela expressão em *K. phaffii* X-33. A funcionalidade da via de produção de etileno glicol foi avaliada *in vivo* através de experimentos de fermentação com linhagens recombinantes de *K. phaffii* em frasco e biorreator. Além de identificar e avaliar a funcionalidade de novas sequências codificantes para enzimas XD, foi analisado o efeito de diferentes combinações de XDH e XD na produção de EG em linhagens recombinantes de *K. phaffii*. Todas as linhagens construídas foram capazes de metabolizar a xilose, em meio definido, com produção máxima de etileno glicol de 1,34 g/L, resultados que mostram a funcionalidade da nova via sintética. Uma nova XD identificada nesse trabalho permitiu produção de EG 30% maior que a linhagem expressando a XD controle. Finalmente, diferentes condições de cultivo foram testadas, e gargalos na via metabólica foram identificados, possibilitando um maior entendimento a respeito do metabolismo de *K. phaffii*. Os resultados gerados nesse trabalho contribuem para o desenvolvimento de um processo de produção de EG por rota biológica a partir de recurso renovável.

Palavras-chave: etileno glicol; xilose; biologia sintética; engenharia metabólica.

ABSTRACT

Ethylene glycol (EG) is a versatile molecule, produced in the petrochemical industry and widely used in the manufacture of plastic polymers (PET), anti-freeze, and automotive fluids. It can also be used as a building block monomer to produce molecules in the chemical and pharmaceutical industries. Currently, ethylene glycol production is chemical or semi-biological, generating a negative impact on the environment. Biotechnological production of ethylene glycol can occur by synthetic routes through the reduction of glycolaldehyde, using xylose as a substrate. In the biorefineries context, which are based on the integration of biomass conversion processes, the production of ethylene glycol is advantageous. Therefore, this work aims to develop a process for ethylene glycol production from xylose, a pentose present in sugarcane biomass hydrolysates using the yeast *Komagataella phaffii* as a platform. To this end, a synthetic metabolic pathway for ethylene glycol production was designed and evaluated by expression in *K. phaffii* X-33. The complete synthetic pathway for ethylene glycol production was constructed in silico and evaluated in vivo by flask and bioreactor fermentation experiments. The synthetic pathway for ethylene glycol production from xylose employed in this work consists of four enzymes: xylose dehydrogenase (XDH), xylonate dehydratase (XD), aldolase (ALDO), and aldose reductase (ALDR). In addition, to identify and evaluate the functionality of new sequences encoding for xylonate dehydratase (XD) enzymes, the effect of different combinations of XDH and XD on EG production, in recombinant strains of *K. phaffii*, was analyzed. All the recombinant strains were able to metabolize xylose, in a defined medium, with maximum EG production of 1.34 g/L, results that show the functionality of the synthetic pathway inserted in the yeast. A new XD identified in this work allowed 30% higher EG production than the strain expressing the control XD. Bottlenecks in the synthetic pathway were identified aiming for a better understanding of *K. phaffii* metabolism. This work results contributed to the development of an EG production process through biotechnological routes with renewable substrates.

Keywords: ethylene glycol; xylose; synthetic biology; metabolic engineering.

PRODUÇÕES TÉCNICO CIENTÍFICAS ASSOCIADAS AO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO DE TESE

I. Parte dos resultados descritos na tese constam em:

a. artigo publicado em revista internacional

CARNEIRO, C. V. G. C. *et al.* Advances in *Komagataella phaffii* engineering for the production of renewable chemicals and proteins, **Fermentation**, v. 8, n. 11, p. 575, 2022. DOI: 10.3390/fermentation8110575.

b. manuscrito submetido

CARNEIRO, C. V. G. C. *et al.* Engineering *Komagataella phaffii* for ethylene glycol production from xylose, out. 2023.

c. depósito de patente

ALMEIDA, J. R. M.; TRICHEZ, D.; BERGMANN, J. C.; CARNEIRO, C. V. G. C. **Microrganismo geneticamente modificado para conversão de pentoses e método de produção de compostos químicos utilizando o mesmo – FUB.** Depositante: Fundação Universidade de Brasília – FUB, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. BR 10 2023 005615 6. Depósito: 15 mar. 2023.

II. Publicações realizadas durante o doutoramento, mas que não foram incluídas na tese

a. artigos publicados em revistas internacionais

TRICHEZ, D. *et al.* Recent progress in the microbial production of xylonic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 1–15, 2022. DOI: 10.1007/s11274-022-03313-5.

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

HERRERA, C. R. J. *et al.* Engineering *Zymomonas mobilis* for the Production of Xylonic Acid from Sugarcane Bagasse Hydrolysate. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1372, 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9071372.

b. capítulos de livro publicados

SERRA, L. *et al.* Microbial production of bio-based chemicals: improvements and challenges. *In*: Chandel, A. K. (ed.). **Lignocellulose bioconversion through white biotechnology**. Nova Jersey: Wiley, 2022. p. 136–176.

BERGMANN, J. C. *et al.* Biotechnological Application of Non-conventional Yeasts for Xylose Valorization. *In*: SIBIRNY, Andriy (ed.). **Non-conventional Yeasts: from basic research to application**. United States: Springer International Publishing, 2019. p. 23–74. DOI: 10.1007/978-3-030-21110-3_2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da biomassa lignocelulósica, mostrando seus principais componentes	25
Figura 2 - Esquema representativo das diferentes vias metabólicas do metabolismo de xilose em microrganismos.....	29
Figura 3 - Metabolismo oxidativo de xilose, construído em células de <i>E. coli</i> para a produção de diferentes compostos de valor industrial	34
Figura 4 - Vias biosintéticas para a produção de etileno glicol (EG) e ácido glicólico (AG) a partir de xilose	40
Figura 5 - Plasmídeo pKLD_XD construído com o gene <i>xyID</i> de <i>C. crescentus</i> que codifica para a enzima XD.....	55
Figura 6 - Cassete de expressão desenhado com os genes codificantes para as enzimas ALDO e ALDR.....	57
Figura 7 - Mapa do plasmídeo pBSK-MOD_1	58
Figura 8 - Esquema representativo do plasmídeo para expressão heteróloga em <i>K. phaffii</i> B3-036.....	62
Figura 9 - Esquema da estratégia de montagem do plasmídeo B3-036 para expressão heteróloga em <i>K. phaffii</i>	76
Figura 10 - Esquema da montagem do plasmídeo pBSK-MOD_1	77
Figura 11 - Esquema da digestão do plasmídeo pBSK-MOD_1 com a enzima de restrição <i>Bam HI</i> , liberando o MOD_1 (4211 pb), e o restante do plasmídeo contendo 2875 pb .	78
Figura 12 - Ligação do MOD 1 no sítio de <i>Bam HI</i> do plasmídeo B3-036.....	79
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% referente às reações de PCR de colônia realizadas após a transforma�o genética das leveduras <i>K. phaffii</i> (P2BS6, P1HL2, AM1, MN9) com pKLD_XDs (XyD, YG, AM, BS, HL)	81
Figura 14 - Esquema representativo das linhagens de <i>K. phaffii</i> construídas com as enzimas XDH e XD	84
Figura 15 - Cromatogramas referentes a análises qualitativas em cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS).....	86

Figura 16 - Esquema das linhagens <i>K. phaffii</i> escolhidas para expressão heteróloga da via completa de produção de EG	88
Figura 17 - Gel de agarose 0.8% referente à reação de PCR realizada após a extração do DNA plasmidial pB3Hyg_MOD_1 das leveduras <i>K. phaffii</i> pGAPZB_XDH_HL+ pKLD_XDs (XyD, YG, AM, BS, HL).....	89
Figura 18 - Esquema das etapas de construção das linhagens heterólogas de <i>K. phaffii</i> expressando a via completa de produção de EG.....	91
Figura 19 - Produção de AG e EG em (A) 24 h e (B) 48 h de fermentação, realizada pelas linhagens recombinantes de <i>K. phaffii</i>	92
Figura 20 - Mapa do plasmídeo pB3Hyg_MOD_1 com destaque nos sítios de restrição para a enzima <i>Pvu II</i>	102
Figura 21 - Plasmídeo pB3Hyg_ALDO após retirada do cassete de expressão do gene <i>FucO</i> , codificante para a enzima ALDR	102
Figura 22 - Produção de ácido glicólico (AG), e etileno glicol (EG) e consumo de glicose, em diferentes condições de cultivo	108
Figura 23 - Conversão de glicolaldeído (10 mM) à ácido glicólico e etileno glicol, em experimento de fermentação com duas condições distintas (A e B aeróbica e C e D microaeróbica).....	111
Figura 24 - Linhagens construídas expressando apenas 3 genes da via de produção de EG	113
Figura 25 - Produção de etileno glicol e ácido glicólico em 24 h de cultivo das linhagens construídas com apenas 3 enzimas da via de EG	114
Figura 26 - Produção de etileno glicol e ácido glicólico em 48 h de cultivo das linhagens construídas com apenas 3 enzimas da via de EG (JA131, JA133).....	116
Figura 27 - Cultivo de linhagens de <i>K. phaffii</i> em meio YP suplementado com 5 g/L de EG como fonte de carbono.....	118
Figura 28 - Perfil fermentativo das linhagens recombinantes e linhagem controle de <i>K. phaffii</i> , em meio YPDX	121
Figura 29 - Experimento de batelada em biorreator de bancada (500 mL), realizado em meio YP suplementado com glicose ou xilose, por 92 h.	129

Figura S 1 - Perfil fermentativo completo e produção de EG e AG, em 120 h de cultivo das linhagens de <i>K. phaffii</i> construídas com as enzimas XDH, XD e ALDO.....	166
Figura S 2 - Concentração de AG em 72 h de cultivo de linhagens de <i>K. phaffii</i>	167
Figura S 3 - Padrão analítico indicando a correlação entre a DO550 nm medida e a concentração (mM) de xilonolactona.....	168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição da composição química (%) de diferentes biomassas lignocelulósicas	23
Tabela 2 - Microrganismos utilizados como <i>chassi</i> e suas principais características.....	33
Tabela 3 - Produção biotecnológica de etileno glicol	41
Tabela 4 - Lista de linhagens microbianas utilizadas neste trabalho.....	49
Tabela 5 - Lista de genes utilizados neste trabalho	49
Tabela 6 - Lista de plasmídeos utilizados e suas principais características	51
Tabela 7 - Lista de enzimas utilizadas para realizar reações de digestão e os respectivos plasmídeos.....	60
Tabela 8 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho	64
Tabela 9 - Parâmetros para reação de PCR de colônia para amplificação do fragmento de 2.2 kb do plasmídeo pKLD_XD	64
Tabela 10 - Parâmetros para reação de PCR de colônia para verificação de integração do plasmídeo pB3Hyg_MOD_1	65
Tabela 11 - Parâmetros para reação de PCR para verificação da integração do plasmídeo pB3Hyg_MOD_1	65
Tabela 12 - Metodologia utilizada para analisar quantitativamente amostras em HPLC e UPLC.....	69
Tabela 13 - Padrões analíticos utilizados para quantificar metabólitos em HPLC e UPLC, com suas respectivas diluições	70
Tabela 14 - Metodologia utilizada para quantificar e detectar cada composto da via metabólica de produção de etileno glicol, em HPLC e UPLC	71
Tabela 15 - Características gerais dos genes utilizados neste trabalho.....	74
Tabela 16 - Lista de clones e linhagens <i>K. phaffii</i> transformadas geneticamente com o plasmídeo pKLD_XD.e confirmadas por PCR de colônia	83
Tabela 17 - Lista de linhagens <i>K. phaffii</i> transformadas geneticamente com a via completa de produção de etileno glicol.....	90

Tabela 18 - Consumo de substrato e produção de metabólitos (g/L) em 48 h de fermentação realizada pelas linhagens recombinantes de <i>K. phaffii</i> expressando a via completa de EG, em meio YPDX. Todas as leveduras expressam XDH, XD, ALDO E ALDR, e se diferenciam pela XD.....	93
Tabela S 1- Valores medidos para curva padrão dos compostos xilose, ácido xilônico e xilonolactona para ensaio colorimétrico de detecção de lactonas em espectro de luz de 550 nm.	168
Tabela S 2 - Valores* médios de leitura de densidade ótica (DO) 550nm dos sobrenadantes de cultivo fermentativo das linhagens <i>K phaffii</i> JA122 e JA128.....	169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácido glicólico
ALDO	Aldolase
ALDR	Aldeído redutase
ALDH	Aldeído desidrogenase
AOX	Proteína álcool oxidase
AOX1	Gene que codifica para álcool oxidase 1
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DNA	Ácido deoxirribonucleico
dNTP	Deoxirribonucleotídeo
EG	Etileno glicol
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>
KDX	2-ceto-3-deoxi-D-xilonato
LB	Luria-Bertani
m/v	Massa por volume
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
DO₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
DO₅₅₀	Densidade óptica a 550 nm
Pb	Pares de base
PCR	Reação de polimerização em cadeia
Rpm	Rotações por minuto
UHPLC	<i>Ultra-high Performance Liquid Chromatography</i>
v/v	Volume por volume
YPD	Meio <i>yeast extract peptone dextrose</i>
YPDS	Meio <i>yeast extract peptone dextrose sorbitol</i>
YPDX	Meio <i>yeast extract peptone dextrose xylose</i>
YPG	Meio <i>yeast extract peptone dextrose glycerol</i>

YPX	Meio <i>yeast extract peptone xylose</i>
XD	Xilonato desidratase
XDH	Xilose desidrogenase
XR	Xilose redutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Biomassa lignocelulósica.....	23
1.2	Metabolismo de xilose em microrganismos	27
1.3	Engenharia metabólica e biologia sintética	31
1.4	<i>Komagataella phaffii</i>.....	36
1.5	Etileno glicol	38
1.5.1	Produção de etileno glicol por rota microbiana.....	39
2	JUSTIFICATIVA.....	44
3	OBJETIVOS.....	46
3.1	Objetivo geral.....	46
3.2	Objetivos específicos.....	46
	CAPÍTULO 1 – Construção de linhagens de <i>K. phaffii</i> produtoras de etileno glicol	47
4	INTRODUÇÃO	48
4.1	Materiais e métodos	48
4.1.1	Linhagens, genes e plasmídeos utilizados	48
4.2	Meios e soluções.....	52
4.3	Genes e plasmídeos	53
4.3.1	Identificação dos genes putativos codificantes para a enzima xilonato desidratase	53
4.3.2	Identificação dos genes codificantes para as enzimas dehidro-deoxi-xilonato aldolase (ALDO) e aldeído redutase (ALDR).....	55
4.4	Transformação bacteriana.....	58
4.5	Extração de DNA plasmidial de bactérias	59
4.6	Eletroforese em gel de agarose.....	59
4.7	Ensaio de restrição de DNA plasmidial	59
4.7.1	Reação de ligação.....	60
4.7.2	Reação de desfosforilação	60
4.8	Construções de plasmídeos.....	60

4.8.1	pKLD sem inserto	60
4.8.2	Construção do plasmídeo pB3Hyg_MOD_1	61
4.8.3	Transformação de leveduras <i>K. phaffii</i>	63
4.8.4	Extração de DNA plasmidial de levedura	63
4.8.5	Reações de polimerase em cadeia (PCR).....	63
4.8.6	Avaliação da funcionalidade das enzimas XDH e XD.....	66
4.8.7	Construção de linhagens <i>K. phaffii</i> contendo a via metabólica completa para produção de etileno glicol	66
4.8.8	Teste de funcionalidade da via metabólica completa de produção de etileno glicol	66
4.8.9	Produção de EG em fracos	67
4.8.10	Preparo de amostras para análise de peso seco	67
4.8.11	Análise de metabólitos em HPLC/UPLC.....	68
4.8.12	Análise de metabólitos em UHPLC-MS/MS.....	72
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1	Identificação de possíveis novas xilonato desidratases	73
5.2	Transformação de <i>K. phaffii</i> com as enzimas da via de produção de EG .	74
5.2.1	Transformação de <i>K. phaffii</i> com o plasmídeo pKLD_XD.....	74
5.2.2	Construção dos vetores para a expressão das enzimas ALDO e ALDR.....	74
5.3	Construção de linhagens expressando XDH e XD	80
5.4	Validação da funcionalidade das possíveis novas XD.....	85
5.5	Transformação de linhagens de <i>K. phaffii</i> com a via completa de produção de EG	87
5.6	Verificação da funcionalidade da via metabólica de produção de etileno glicol	92
6	CONCLUSÃO	96
	CAPÍTULO 2 – Metabolismo de <i>K. phaffii</i>: fatores que influenciam a produção de EG.....	97
7	INTRODUÇÃO	98
8	MATERIAIS E MÉTODOS	100

8.1	Avaliação da produção de EG pelas linhagens transformadas em diferentes condições de cultivo	100
8.2	Efeito de diferentes concentrações de xilose e glicose na produção de EG e AG	100
8.3	Glicaldeído como substrato na produção de EG e AG: enzimas aldeído redutases e aldeído desidrogenases nativas de <i>K. phaffii</i>	101
8.4	Comparação entre enzimas aldeído redutases nativas e heterólogas em linhagens de <i>K. phaffii</i>	101
8.5	Metabolismo dos produtos da via metabólica sintética: EG e AG como substrato para fermentação	103
8.6	Cultivo em frascos para análise quantitativa de metabólitos produzidos por linhagens de <i>K. phaffii</i>	103
8.7	Otimização da análise qualitativa e quantitativa de ácido xilônico e xilose em HPLC e LC-MS	104
8.8	Ensaio colorimétrico para detecção de lactonas	105
8.9	Efeito do uso de ácido xilônico como única fonte de carbono no metabolismo de <i>K. phaffii</i>	105
8.10	Efeito de glicose e glicerol na produção de EG em biorreatores de bancada	106
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
9.1	Efeito de diferentes concentrações de glicose na produção de EG por <i>K. phaffii</i>	107
9.2	Presença de enzimas aldeído desidrogenase e aldeído redutase nativas em <i>K. phaffii</i>	110
9.3	Enzimas aldeído redutase nativas e heterólogas em linhagens de <i>K. phaffii</i>	112
9.4	Conversão de EG e AG por <i>K. phaffii</i>	117
9.5	Análises metabólicas para quantificação de compostos intermediários da via de produção de EG	119
9.6	Identificação e quantificação de xilonolactona	124

9.7	Ácido xilônico como substrato fermentativo para a produção de EG em linhagem transformada de <i>K. phaffii</i>	125
9.8	Avaliação da produção de etileno glicol e ácido glicólico utilizando xilose como substrato e glicerol ou glicose como fonte de carbono, em biorreator.	127
10	CONCLUSÃO	131
11	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	132
	REFERÊNCIAS	134
	ANEXO A - Sequências de dna codificantes para os genes utilizados ..	148
	ANEXO B - Produção de EG e AG em linhagens com diferentes genes codificantes para a Enzima XDH	166
	ANEXO C - Cultivo de linhagens de <i>K. phaffii</i> em meio contendo AG como substrato	167
	ANEXO D - Parâmetros para realização de ensaio colorimétrico para detecção de lactonas	168

1 INTRODUÇÃO

A produção de combustíveis e compostos químicos a partir de fontes renováveis é cada vez mais urgente. Diversos fatores econômicos e ambientais estão atrelados a eles. Como a necessidade de redução de impactos ambientais, diminuição da dependência do petróleo pelas indústrias químicas e refinarias, e consequente diminuição de emissão de gases do efeito estufa (Valdivia *et al.*, 2016). O interesse científico e econômico neste campo é crescente. Energia limpa e acessível, infraestrutura, indústria e inovação, ação contra a mudança global do clima, são alguns dos objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) da ONU para 2030 (Nações Unidas Brasil, 2023). Esses objetivos estão diretamente ligados com o mercado global de bioprodutos, incluindo compostos químicos, bioenergia e biocombustíveis (De Jong *et al.*, 2020).

Tendo em vista que, eventualmente, todo o CO₂ retirado do solo será depositado na atmosfera, o que causa aumento da toxicidade do ar (Carus, Raschka, 2018; Francois, Alkim, Morin, 2020), buscam-se soluções mais eficazes para a implementação de uma economia circular, a qual contribui para o aumento da produtividade no uso dos recursos naturais e a diminuição das perdas ecológicas nos processos de produção de compostos químicos (Carus, Raschka, 2018).

Dentro do contexto de bioeconomia, existem fontes de carbono renováveis que auxiliam no processo de ciclagem de carbono, tais como i) carbono derivado de biomassas lignocelulósicas (resíduos florestais, agrícolas, etc); ii) reciclagem de carbono derivado de lixo urbano (materiais plásticos e outros produtos químicos orgânicos já existentes) e iii) reutilização do CO₂ que já está disponível (subterrâneo ou atmosférico) (Carus, Raschka, 2018). Dentre elas, a biomassa lignocelulósica é considerada a matéria prima energética mais abundante disponível no planeta (Francois, Alkim, Morin, 2020).

O uso de biomassas lignocelulósicas para a produção de compostos químicos e combustíveis tem atraído atenção há mais de 100 anos. Tal uso vem sendo encorajado pela iniciativa de reutilização e aproveitamento de resíduos, proposto pelo modelo de bioeconomia do século 21. Como o conceito de bioeconomia não gira apenas em torno da prosperidade econômica, mas também da sobrevivência ecológica, o uso de matérias primas renováveis e abundantes para a produção de químicos e energia, é cada vez mais

atrativo. Além de ser a maior fonte de matéria prima disponível na natureza, a utilização de biomassas lignocelulósicas não interfere na cadeia econômica das indústrias alimentícias. As biomassas são, em sua maioria, bagaços e palhas vegetais, ou seja, “resíduos” urbano e industrial (Bergmann *et al.*, 2019; Hassan, Williams, Jaiswal, 2018).

1.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica vegetal pode ser proveniente de diversas fontes: i) madeira macia; ii) madeira dura; iii) rejeitos agroindustriais e iv) gramíneas. Ela é composta por cadeias poliméricas interconectadas de celulose e hemicelulose e por lignina e ainda em menor quantidade por proteínas, lipídeos, açúcares solúveis e minerais. A composição e percentual desses componentes podem variar, inclusive dentro da mesma espécie, de acordo com a idade da planta e condições de cultivo e colheita (Tabela 1) (Bergmann *et al.*, 2019; Bhatia *et al.*, 2019; Chundawat *et al.*, 2011; Phyllis2, 2021; Hassan, Williams, Jaiswal, 2018).

Tabela 1 - Descrição da composição química (%) de diferentes biomassas lignocelulósicas

Biomassa	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Ref
Bagaço de cana	41.11	26.40	24.31	Huang, Chiueh, Lo (2016)
Bamboo	46.50	18.80	25.70	Chen, W. <i>et al.</i> (2017)
Palha de arroz	38.14	31.12	26.35	Huang, Chiueh, Lo (2016)
Grãos de café	33.10	30.03	24.52	Huang, Chiueh, Lo (2016)
Palha de milho	43.97	28.94	21.82	Huang, Chiueh, Lo (2016)
Casca de amêndoas	27.00	30.00	36.00	Álvarez <i>et al.</i> (2018)
Centeio	42.83	27.86	6.51	Raud <i>et al.</i> (2016)
Eucalipto	44.90	28.90	26.20	Muranaka <i>et al.</i> (2017)
Carvalho	43.20	21.90	35.40	Yu, J. <i>et al.</i> (2017)
Palha de cevada	35.40	28.70	13.10	Liu, X. <i>et al.</i> (2017)

Fonte: Adaptada HASSAN, WILLIAMS, JAISWAL (2018).

A celulose é o polímero mais abundante presente na natureza, composto por moléculas de glicose, unidas por ligações glicosídicas. β -(1-4) (Figura 1). Essas cadeias lineares são unidas por ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals, formando estruturas cristalinas complexas, que juntos conferem estabilidade e forma para a parede celular das plantas. Essas estruturas são cobertas por cadeias poliméricas de hemicelulose e lignina, o que dificulta a degradação da celulose (Hassan, Williams, Jaiswal, 2018; Zhao *et al.*, 2020).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por monômeros de pentoses (C5; D-xilose, L-arabinose), e hexoses (C6; D-glicose, D-manose e D-galactose) (Figura 1). A cadeia polimérica principal da hemicelulose pode ser formada por monômeros de xilose ou galactose, dependendo da matéria prima estudada. As cadeias laterais são compostas por outros açúcares (como glicose e manose) e por ligações com ácidos e outras moléculas (Bergmann *et al.*, 2019).

As ligações em cadeias laterais da hemicelulose impedem a formação de regiões cristalinas, o que facilita a sua decomposição em monômeros de açúcares. A composição da hemicelulose pode variar de acordo com o tecido celular, a espécie da planta, e os diferentes graus de polimerização das cadeias laterais. A D-xilose é um dos açúcares mais presentes na hemicelulose, podendo chegar a compor cerca de 18 a 30% da cadeia polimérica, em biomassas lignocelulósicas (Bergmann *et al.*, 2019; Bhatia *et al.*, 2019; Chundawat *et al.*, 2011; Francois, Alkim, Morin, 2020; Hassan, Williams, Jaiswal, 2018).

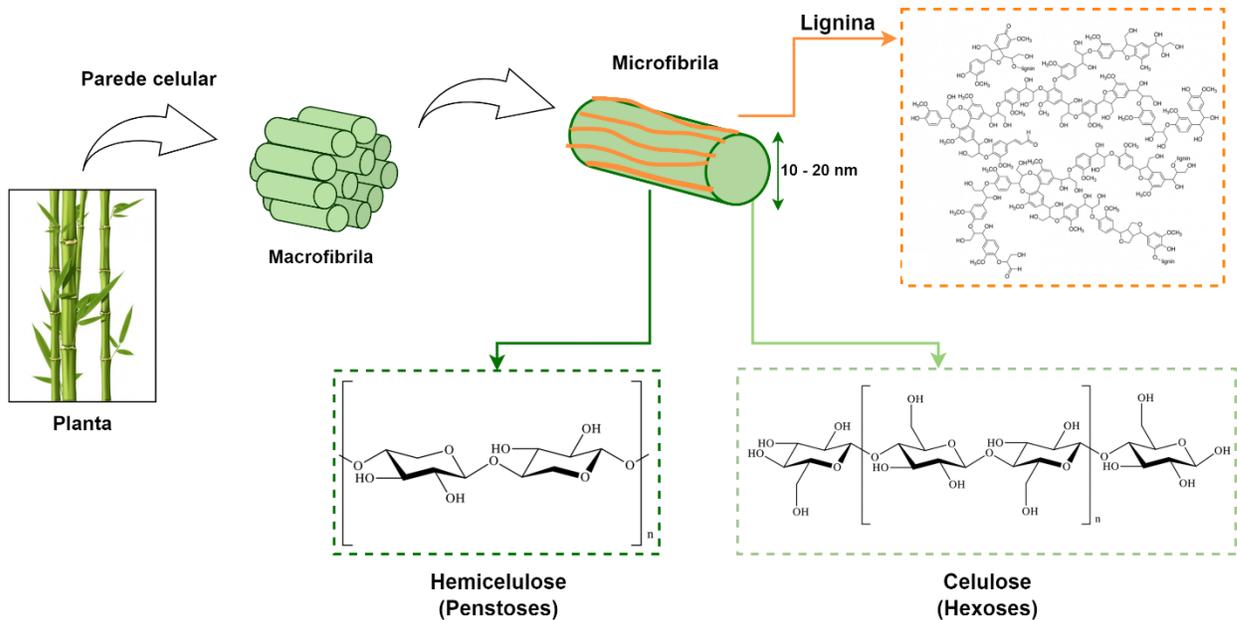


Figura 1 - Estrutura da biomassa lignocelulósica, mostrando seus principais componentes: i. caixa pontilhada verde claro - celulose (polímero C6, composto por monômeros de glicose), ii. caixa pontilhada verde escuro - hemicelulose (polímero composto por monômeros C5: xilose, arabinose e C6: glicose, manose e galactose) e iii. caixa pontilhada alaranjada - lignina (molécula composta por unidades de fenilpropanóides).

Fonte: Adaptada BRETHAUER, STUDER (2015).

A lignina é uma macromolécula complexa composta por unidades de fenilpropanóides, sendo as 3 unidades principais na lignina chamadas de *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e sirigil (S) (Figura 1). A lignina tem função estrutural na lignocelulose, conferindo estabilidade e integridade à celulose e à hemicelulose, além de atuar na resistência microbiana da planta. Como ocorre com a hemicelulose, a composição da lignina também pode variar de acordo com a fonte de biomassa utilizada, mudando a concentração de cada unidade monomérica e o nível de hidroxilação e metilação (Bergmann *et al.*, 2019; Hassan, Williams, Jaiswal, 2018).

Para que os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica possam ser convertidos ao produto desejado durante o processo fermentativo industrial, existem duas etapas importantes a serem seguidas: i) pré-tratamento da biomassa; e ii) hidrólise enzimática (Brethauer, Studer, 2015). Após esses processos, a lignocelulose é fracionada e os monômeros de açúcares ficam disponíveis para serem posteriormente convertidos em metabólitos de interesse (Hassan, Williams, Jaiswal, 2018).

A etapa de pré-tratamento é responsável por reduzir a recalcitrância da biomassa, fracionando a parede celular vegetal, e facilitando o acesso das enzimas hidrolíticas aos polímeros de açúcares (Brethauer, Studer, 2015). Existem diferentes métodos de pré-tratamento, que podem ser divididos em: biológicos, (podendo ser realizado por fungos, bactérias e archeas), e não-biológicos (físico, químico e físico-químico) (Hassan, Williams, Jaiswal, 2018).

Cada pré-tratamento se adequa a um tipo específico de biomassa e atua de um modo diferente para diminuir a recalcitrância (afrouxar, pois na verdade não seria quebrar) a estrutura da lignocelulose, podendo variar também de acordo com os produtos desejados (pentoses, hexoses, lignina) (Chundawat *et al.*, 2011; Hassan, Williams, Jaiswal, 2018). Os exemplos mais utilizados na indústria são: o pré-tratamento ácido, que fraciona principalmente a hemicelulose, liberando as pentoses e hexoses ali presentes (Hassan, Williams, Jaiswal, 2018). O tratamento alcalino, tem como alvo as ligações éster da lignina, possibilitando a remoção parcial dessa molécula (Brethauer; Studer, 2015). A explosão a vapor, que atua removendo partes solúveis da hemicelulose e lignina (Zhuang *et al.*, 2016). Além desses, algumas metodologias de pré-tratamentos mais comumente utilizadas são: fracionamento por líquidos iônicos, extrusão e oxidação (Hassan, Williams, Jaiswal, 2018; Jönsson, Martín, 2016).

Durante o pré-tratamento, moléculas que inibem o metabolismo microbiano podem ser liberadas ou formadas pela degradação da lignocelulose (Almeida *et al.*, 2007). Os principais inibidores descritos na literatura são: hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, formados a partir da degradação de hexoses e pentoses, respectivamente; ácido acético (liberado da desconstrução da hemicelulose); e compostos fenólicos (originados através da decomposição da lignina). A concentração e a classe de inibidores formados dependem do tipo de pré-tratamento e da biomassa utilizada (Brethauer, Studer, 2015; Jönsson, Martín, 2016). Informações mais detalhadas sobre os tipos de pré-tratamento e suas principais características podem ser acessadas em (Vu *et al.*, 2020).

A hidrólise da biomassa é o processo realizado para a liberação dos monômeros de açúcares presentes na celulose e hemicelulose, e pode ser tanto química, quanto enzimática. A hidrólise química geralmente é realizada com soluções de ácido sulfúrico ou ácido clorídrico, em condições de altas temperaturas (180°C – 220°C). Na hidrólise

química, é possível se obter a separação dos açúcares finais (xilose e glicose), realizando a hidrólise em duas etapas: i) primeiro com uma fase de aquecimento onde a xilose começa a ser liberada; ii) segundo uma fase ácida, onde é iniciada a liberação da glicose. Com isso, é possível separar os açúcares na fração final do hidrolisado (Świątek *et al.*, 2020).

No processo de hidrólise enzimática, três classes de enzimas são utilizadas: celulasas, hemicelulasas e enzimas acessórias. Cada enzima atua em uma fração diferente da biomassa pré-tratada. (Brethauer, Studer, 2015). As celulasas utilizadas na degradação da celulose são: endoglucanases (atuam quebrando as ligações glicosídicas internas β -1-4 da cadeia polimérica), exoglucanases (liberam pequenas cadeias de oligossacarídeos nas extremidades do polímero) e β -glucosidases (cliva a celulobiose, liberando monômeros de glicose) (Brethauer, Studer, 2015; Maitan-Alfenas, Visser, Guimarães, 2015).

O processo de digestão da hemicelulose rica em xilana ocorre com um grupo diferente de enzimas, chamadas endo- β -1,4-xilanases, que clivam ligações internas da xilana de forma aleatória, liberando fragmentos de xilo-oligossacarídeos. Sinergicamente, enzimas acessórias (β -xilosidase, feruloil esterases, α -L-arabinofuranosidase) atuam quebrando esses fragmentos de oligossacarídeos em monômeros de pentoses (Maitan-Alfenas, Visser, Guimarães, 2015). Para uma revisão mais detalhada a respeito de hidrólise enzimática e suas características, ver (Østby *et al.*, 2020).

1.2 Metabolismo de xilose em microrganismos

Hidrolisados lignocelulósicos contêm uma mistura de açúcares C6 e C5 com concentrações bem variáveis. A glicose e a xilose são os açúcares mais abundantes na biomassa lignocelulósica e por consequência, na natureza. A glicose é uma hexose facilmente metabolizada pela maioria dos microrganismos dos diferentes reinos, e por isso pode ser empregada em vários bioprocessos para produção de compostos químicos de interesse industrial. Dentre eles os mais comuns são etanol, ácido láctico, butanol e sorbitol (De Jong *et al.*, 2020; Francois, Alkim, Morin, 2020; Yu, T. *et al.*, 2019).

Microrganismos de diferentes grupos são capazes de metabolizar xilose, porém, empregando vias metabólicas distintas (Figura 2). De modo geral, em fungos filamentosos e leveduras, a pentose é assimilada por uma via oxidorreductiva, na qual a D-xilose é reduzida a D-xilitol, pela enzima xilose redutase (XR), e o xilitol por sua vez é oxidado a D-xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), então, a enzima xiluloquinase (XK) fosforila a D-xilulose em D-xilulose-5-fosfato, e a partir daí, a D-xilulose-5-fosfato entra no metabolismo central de carbono da célula, por intermédio da via da pentose fosfato (PPP). (Lee, 1998; Schneider *et al.*, 1989).

Em bactérias, como *E. coli* e *Corynebacterium lactococcus*, o metabolismo de xilose ocorre em apenas duas etapas, primeiro a D-xilose é isomerizada por uma xilose isomerase (XI) a D-xilulose, que por sua vez é fosforilada pela XK a xilulose-5-fosfato, entrando assim, no metabolismo central de carbono pela PPP (Figura 2) (Jeffries, 1983; Rosenfeld, Stevis, HO, 1984; Schellenberg *et al.*, 1984). Adicionalmente, a xilulose-5P pode ser convertida a acetilfosfato (acetil-P) e gliceraldeído-3P (G3P) por uma enzima fosfoquetolase (Zhao *et al.*, 2020).

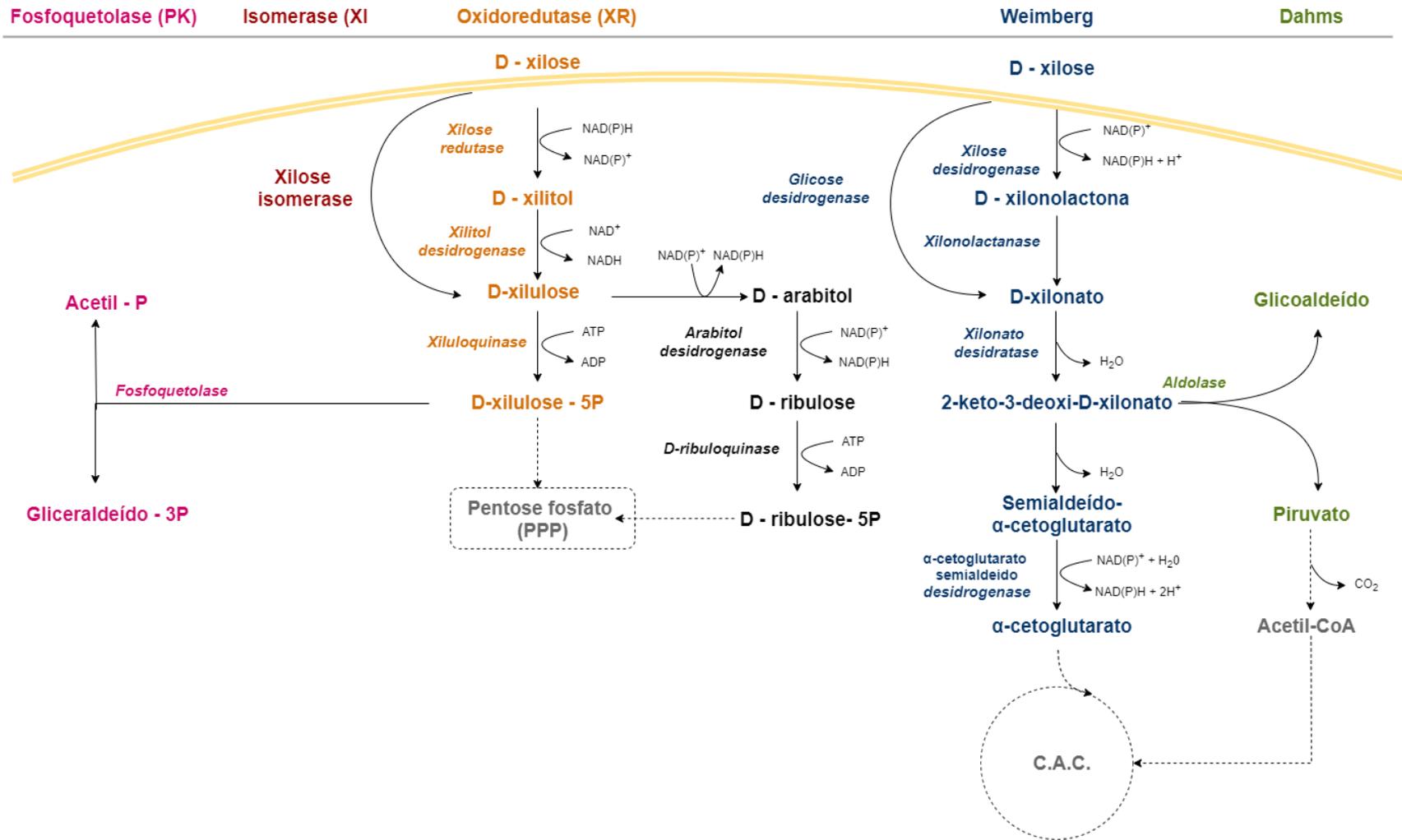


Figura 2 - Esquema representativo das diferentes vias metabólicas do metabolismo de xilose em microrganismos. C.A.C.: Ciclo do ácido cítrico.

Fonte: Adaptada ZHAO *et al.* (2020).

O metabolismo de xilose em eucariotos e procariotos é geralmente diferenciado pela presença da via oxidorrredutiva no primeiro e pela via da isomerase no segundo. Existem algumas exceções a essa regra. Um exemplo é a presença da enzima xilose isomerase (XI) em espécies do fungo *Piromyces sp.* (Harhangi *et al.*, 2003).

Em archeas, e com a exceção de algumas bactérias, como *C. crescentus*, o metabolismo de xilose se dá pela via não fosforilativa (NP) de Weimberg, que cataboliza a D-xilose em α -ketoglutarato ou piruvato e glicaldeído (Figura 3) (Weimberg, 1961). Essa via de cinco etapas consiste na oxidação da D-xilose a D-xilonolactona, pela enzima xilose desidrogenase (XDH), que em seguida é convertida a D-xilonato por uma lactanase. Esse intermediário é desidratado pela enzima xilonato desidratase (XD) e convertido em 2-keto-3-deoxi-D-xilonato (KDX), que por sua vez, é desidratado e convertido em semialdeído- α -cetoglutarato pela enzima 2-keto-deoxi-D-xilonato desidratase. Finalmente, esse último metabólito é convertido a α -cetoglutarato e entra no ciclo do ácido cítrico (CAC) por intermédio da enzima α -cetoglutarato semialdeído desidrogenase (Figura 2) (Francois, Alkim, Morin, 2020; Weimberg, 1961).

Uma alternativa à via de Weimberg é a via de Dahms na qual o intermediário KDX é clivado por uma KDX aldolase, e convertido a piruvato e glicaldeído. Subsequentemente, os dois metabólitos seguem para o metabolismo central de carbono da célula (Figura 3) (Favaro, Jansen, Van Zyl, 2019; Jagtap, Rao, 2018; Dahms, 1974). A via não fosforilativa (NP) de Weimberg foi primariamente descoberta na bactéria *Pseudomonas fragi* e, em seguida, encontrada em outras linhagens de bactérias aquáticas do gênero *Caulobacter* (Stephens *et al.*, 2007). Em bactérias, essa via é modulada pela ativação de operons regulados pelo gene *xyl*, os quais são induzidos pela presença de xilose (Stephens *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2020).

A via não fosforilativa (NP) em archeas é, até os dias de hoje, pouco estudada. Diversas reações metabólicas ainda são pouco conhecidas, bem como interações enzimáticas e seus respectivos cofatores. Existem raros exemplos na literatura a respeito de microrganismos que possuem as vias de Weimberg e Dahms coexistindo. (Nunn *et al.*, 2010), por exemplo, demonstrou que a arquea hipertermófila *Sulfobolus acidocaldarius* cataboliza D-xilose através das duas vias simultaneamente, com uma taxa de 50% para cada (Francois, Alkim, Morin, 2020; Nunn *et al.*, 2010).

Como foi descrito acima, existem diversas rotas metabólicas naturais para a absorção de xilose em diferentes espécies de microrganismos, nas quais a pentose pode ser totalmente metabolizada, e formar metabólitos secundários que podem ser úteis; tanto para o funcionamento da célula, quanto aproveitados para o uso biotecnológico.

1.3 Engenharia metabólica e biologia sintética

As duas últimas décadas têm sido marcadas por revoluções significativas na forma como a biologia é estudada, passando a ser não só uma ciência descritiva, mas uma ciência de *design*. Tais mudanças, juntamente com os avanços na área de ciências genômicas e engenharia genética, contribuíram para a criação da área de conhecimento denominada “biologia sintética” (Carbonell, Radivojevic, García Martín, 2019; Chen, Y. *et al.*, 2020).

A biologia sintética utiliza técnicas de engenharias genética, metabólica e computacional, bem como ferramentas de biologia molecular, com a finalidade de desenhar, modificar e criar organismos para que exerçam funções específicas. Essas funções são diversas e podem variar desde a produção de novos compostos para a melhoria da saúde humana, a bioprodutos e biocombustíveis (McCarty, Ledesma-Amaro, 2019).

Através de sistemas avançados de modificações celulares (como CRISPR/Cas, DNA *assembly*, e análises integrativas “ômicas”), é possível construir e modular novas vias metabólicas e circuitos biológicos, de maneiras mais rápidas e eficazes. Além de possibilitar a identificação e otimização de processos e gargalos existentes na produção biotecnológica de compostos de valor industrial (McCarty, Ledesma-Amaro, 2019).

Com as recentes descobertas no campo da biologia sintética, tornou-se possível a aplicação dessas metodologias para a otimização do uso de xilose como fonte de carbono em bioprocessos microbianos. Dentre os principais alvos biotecnológicos estão, i) o metabolismo de xilose e o transporte da pentose para o citoplasma. Tendo em vista que em muitos microrganismos a xilose só começa a ser consumida quando a glicose acaba, ou diminui drasticamente no meio de cultura, fazendo com que a presença desse açúcar, interfira na ativação do metabolismo de xilose (Hou *et al.*, 2017); ii) otimização

do catabolismo de xilose, tanto nativo (se o microrganismo em questão possuir a via de conversão de xilose), quanto heterólogo; iii) inibir ou superexpressar enzimas para a produção de químicos de interesse a partir da xilose (Hou *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2020).

A combinação entre biologia sintética e engenharia metabólica, possibilita a construção de microrganismos robustos que funcionem como “hospedeiros” ou *chassis*. Estes são capazes de expressar novos *designs* de rotas metabólicas e circuitos genéticos, através de vetores com especificações moleculares pré-definidas de regulações metabólicas (Chen, Y. *et al.*, 2020). Atualmente, existem diversos artigos publicados, indicando diferentes microrganismos caracterizados como bons *chassis* (Tabela 2).

Nesse contexto, algumas características específicas são necessárias para que o microrganismo seja um bom *chassi*: i) o “estilo de vida”, que é caracterizado pelo baixo custo do cultivo celular, crescimento em substratos diferentes e a variação no metabolismo fermentativo (aeróbico e anaeróbico); ii) envelope celular robusto, para que a célula seja capaz de suportar mudanças físico-químicas (tolerar baixos pHs, inibidores); iii) possuir uma rede de fluxos metabólicos bem caracterizada (para prover cofatores e energia no processo de produção dos metabólitos); e por fim iv) fácil manipulação genética (protocolos e ferramentas de manipulação genética bem estabelecidos) e características genômicas e bioquímicas bem conhecidas (Gasser, Mattanovich, 2018).

A construção de bons *chassis*, pode seguir duas vias principais: *top down* e *bottom up*. Quando a abordagem é *top down*, o objetivo é estudar o funcionamento da arquitetura genômica da célula, e otimizar seu funcionamento. Para tal, a estratégia utilizada é a de redução do tamanho do DNA genômico, eliminando genes que sejam menos essenciais para o funcionamento do microrganismo (Chi *et al.*, 2019a). Abordagens *bottom up* focam na construção de vias metabólicas completas, ou até de cromossomos inteiros, que possam expressar características metabólicas desejadas para determinadas finalidades, como a produção de bioenergia e biomateriais (Ausländer, S.; Ausländer, D.; Fussenegger, 2017; Chi *et al.*, 2019b).

Tabela 2 - Microrganismos utilizados como *chassi* e suas principais características

Microrganismo	Característica de interesse	Ref
<i>Komagataella phaffii</i>	Produção de proteínas heterólogas em larga escala	Fischer, Glieder (2019)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ferramentas para manipulação genética, eucarioto modelo em biotecnologia/biologia	Heider, Wendisch (2015)
<i>Pseudomonas putida</i>	tolerância à estresse, ferramentas de engenharia metabólica	Martínez-García, De Lorenz (2017)
<i>Bacillus subtilis</i>	Sistema de secreção eficiente, muito utilizada para manipulação genética	Chi <i>et al.</i> (2019a)
<i>Escherichia coli</i>	Bom hospedeiro para DNA recombinante, grande disponibilidade de ferramentas biotecnológicas. Procarioto Modelo em biotecnologia/biologia	Lee, Kim (2015)
<i>Lactobacillus sp</i>	Plataforma para a produção de bioativos probióticos	Goh, Barrangou (2019)
<i>Corynebacterium sp</i>	Produção de aminoácidos em larga escala	Heider, Wendisch (2015)
<i>Streptomyces sp.</i>	Metabolismo secundário diverso, produção biotecnológica de antibióticos	Komatsu <i>et al.</i> (2010)

Fonte: Adaptada CHI *et al.* (2019b).

A inserção e otimização do metabolismo de xilose em diferentes microrganismos tem sido aplicada na produção de diversos compostos químicos. Valdehuesa *et al.*, (2018) resumem/apresentam os caminhos que a biologia sintética pode abrir, no que diz respeito a inovações biotecnológicas. Por exemplo, são elencados diversos microrganismos que foram geneticamente modificados contendo as vias de Weimberg e Dahms, para produzir biomoléculas caracterizadas como blocos construtores, bem como, 1,4-butanodiol, ácido 3,4-dihidroxi-butírico, 1,2,4-butanotriol, ácido glicólico e etileno glicol (Figura 3) (Valdehuesa *et al.*, 2018).

Dentro do contexto de biologia sintética, a bactéria *E. coli* é um dos microrganismos mais empregados como *chassi* microbiano, por possuir um genoma conhecido e ferramentas moleculares muito bem estabelecidas (Chi *et al.*, 2019b). Em seu trabalho, (Wang, X. *et al.*, 2018a), inseriram a via metabólica de produção de 1,2,4-

butanotriol a partir de xilose, na linhagem de *E. coli* BL21. Após otimizações, a linhagem recombinante de *E. coli* foi capaz de produzir 5 g/L e 3,4 g/L de 1,2,4-butanotriol a partir de meio sintético contendo xilose e hidrolisado de espiga de milho, respectivamente (Wang, X. *et al.*, 2018a).

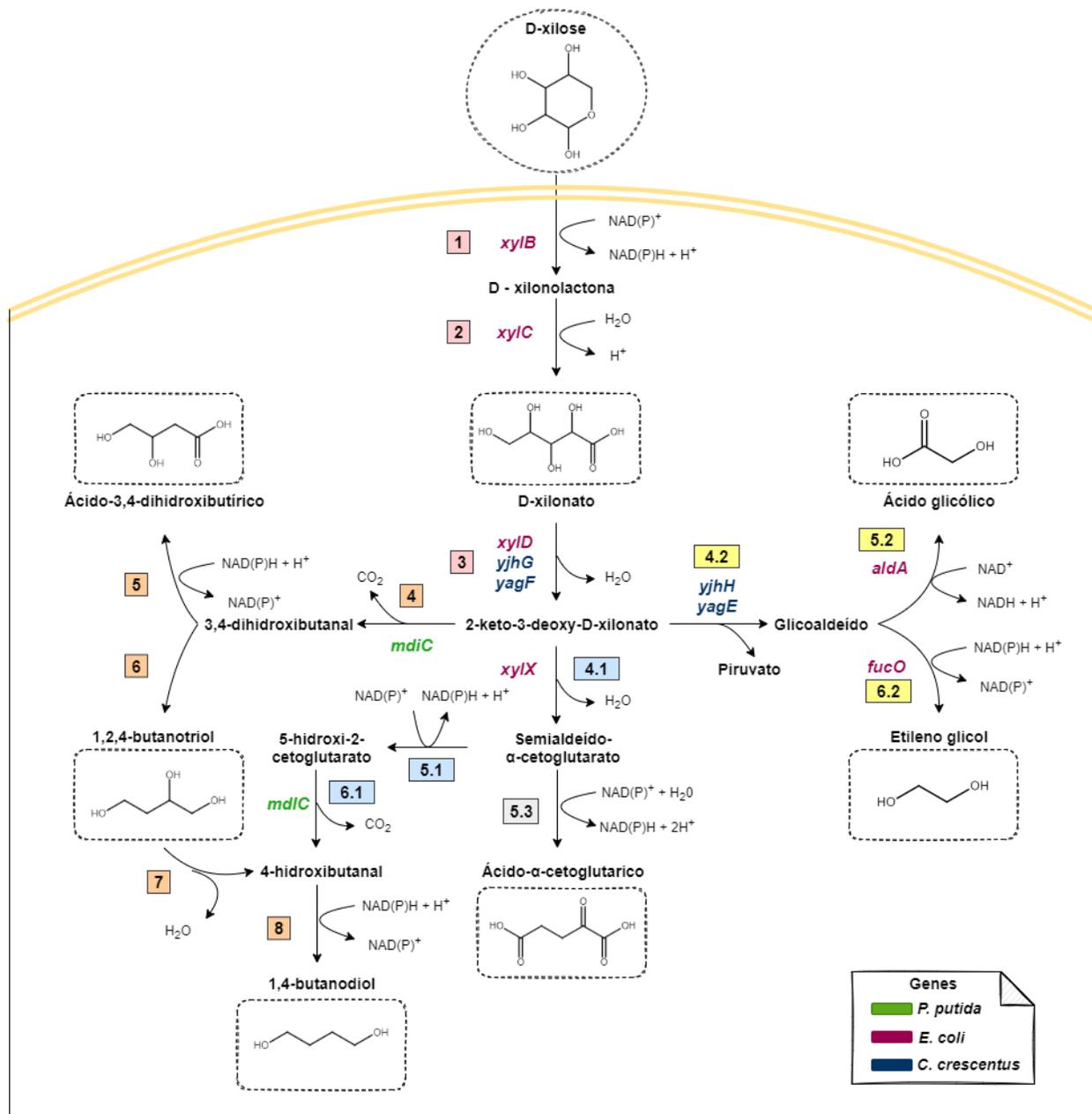


Figura 3 - Metabolismo oxidativo de xilose, construído em células de *E. coli* para a produção de diferentes compostos de valor industrial. Os nomes dos genes estão elencados ao lado das reações em 3 cores diferentes, os microrganismos de origem estão dispostos na legenda contida na figura, as reações que não possuem um gene específico são realizadas por diversas enzimas promíscuas, nativas de *E. coli*. Enzimas: 1. Xilose desidrogenase; 2. Lactanase; 3. Xilonato desidratase; 4. 2-ceto-descarboxilase; 5. Aldeído desidrogenase; 6. Aldeído redutase; 7. Diol desidratase; 8. Aldeído redutase; 4.1 2-ceto-3-deoxi-desidratase; 5.1 aldeído redutase; 6.1. 2-ceto-descarboxilase; 4.2. 2-ceto-3-deoxi-D-

aldolase; 5.2. aldeído desidrogenase; 6.2. aldeído redutase; 5.3. α -cetoglutarato semialdeído desidrogenase.

Fonte: Adaptada VALDEHUESA *et al.* (2018).

Dentre as leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais estudado e utilizado como plataforma para engenharia metabólica e biologia sintética (Liu, Zhang, Nielsen, 2019). Diversas revisões e artigos experimentais corroboram com a hegemonia do uso de *S. cerevisiae* como hospedeira para múltiplas técnicas moleculares, visto que, essa levedura possui o genoma amplamente conhecido, e é utilizada em processos biotecnológicos industriais, como na fabricação de pães, bioetanol e bebidas fermentadas (Baptista *et al.*, 2021; Kwak, Jin, 2017; Lee *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2020). Entretanto, *S. cerevisiae* apresenta um crescimento demasiadamente limitado em xilose, como única fonte de carbono. Com isso, esforços têm sido feitos em prol da utilização eficiente de xilose por *S. cerevisiae* (Zhao *et al.*, 2020).

O estudo de biodiversidade e fisiologia microbiana possibilitou a identificação de novas espécies e linhagens com potenciais e características únicas e importantes para a biotecnologia. O constante avanço na área de ciências genômicas possibilitou a descoberta de novas ferramentas genéticas para analisar e editar genomas completos (CRISPR/Cas e DNA-assembly) (Goh, Barrangou, 2019), novas abordagens de engenharia metabólica (análises ômicas integradas) (Chi *et al.*, 2019b), e a integração de modelos matemáticos (bases de dados, *machine learning*) (Carbonell, Radivojevic, García Martín, 2019; Nielsen, 2017). A junção do estudo da biodiversidade microbiana, e dos avanços tecnológicos na área genômica, possibilitou a exploração de uma gama de organismos que não *S. cerevisiae* e *E. coli*. (Lee, Kim, 2015). Com isso, outros microrganismos estão sendo investigados para a produção de biocombustíveis e biomateriais (Sun *et al.*, 2021). Um exemplo é a levedura metilotrófica *Komagataella phaffii*, como será demonstrado a seguir, essa levedura possui diversas características que a tornam um bom *chassi* para a biologia sintética e para sua utilização na produção de compostos químicos de valor industrial (Zahrl *et al.*, 2017).

1.4 *Komagataella phaffii*

Komagataella phaffii (previamente conhecida como *Pichia pastoris*) é um dos microrganismos com maior potencial biotecnológico no campo da produção de proteínas recombinantes (Zahrl *et al.*, 2017). Além de ser uma excelente plataforma para a produção de proteínas heterólogas, *K. phaffii* tem a capacidade de atingir altas concentrações de biomassa celular, com baixos requerimentos nutricionais, realiza modificações pós traducionais complexas, possui um sistema de secreção de proteínas eficiente e genoma bem conhecido, além da habilidade de crescer em meios de cultura com pH mais ácidos (Gasser, Mattanovich, 2018; Rebnegger *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2018). Essas características permitem a utilização desta levedura como plataforma microbiana para a engenharia metabólica e biologia sintética visando produzir compostos químicos de interesse industrial (Carneiro *et al.*, 2022; Gasser, Mattanovich, 2018).

Dentro do contexto de biorrefinarias, no qual ocorre o processo de valorização sustentável da biomassa lignocelulósica, para a produção de combustíveis e químicos, a produção de compostos bloco-construtores se torna viável e cada vez mais desejável. Compostos bloco-construtores são compostos dos quais se pode obter diversas moléculas de interesse industrial (químicos e polímeros), como, por exemplo, o etileno glicol, ácido xilônico, ácido 3,4-dihidroxi-butírico, ácido glicólico, dentre outros (De Jong *et al.*, 2020). Esses compostos têm aplicação majoritária como polímeros plásticos, todavia, a gama de produtos que podem ser gerados através de compostos bloco construtores é tão grande, que esses produtos seriam capazes de substituir quase todos os químicos produzidos atualmente a partir de petróleo (Carus, Raschka, 2018; De Jong *et al.*, 2020).

Diversos trabalhos relatam avanços na utilização de *K. phaffii* para a produção de compostos para diferentes aplicações industriais tais como β -caroteno, licopeno, ácido metil salicílico, citrina, lovastatina (Gao, Jiang, Lian, 2021). Ainda, *K. phaffii* tem sido empregada com sucesso para produção de compostos químicos bloco construtores, como ácido xilônico, ácido láctico e malonil-CoA (Melo *et al.*, 2018a; Ramos *et al.*, 2021b; Wen *et al.*, 2020). Atualmente, mais de 300 processos industriais e mais de 70 produtos comerciais, são patenteados utilizando *K. phaffii* como modelo. O site Pichia Thecnology

form RCT (2022) elenca diversas proteínas que estão sendo utilizadas no mercado, principalmente por indústrias farmacêuticas. Essas proteínas são aprovadas pelo departamento de drogas e alimentos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration (FDA)) para uso humano. Dentre elas estão, Kalbitor®, produzido pela empresa Dyax (Cambridge, MA), uma proteína recombinante que atua no tratamento de angiodermas hereditários; Shanvac™, vacina para a prevenção de hepatite B, produzida pela empresa Shantha/Sanofi (Índia) e Insugen®, insulina humana recombinante, produzido pela Empresa Biocon (Índia), utilizado no tratamento de diabetes.

Em escala laboratorial, as possibilidades de uso de *K. phaffii* como *chassi*, são diversas. Recentemente, a funcionalidade de 4 novas xilose desidrogenases (XDH) foi demonstrada por meio de linhagens modificadas de *K. phaffii* X-33. A produção de ácido xilônico foi testada a partir da xilose em meios sintéticos e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. A melhor linhagem produziu $37,1 \pm 1,9$ e $11,7 \pm 1,6$ g/L de ácido xilônico com rendimentos de $0,96 \pm 0,02$ e $0,40 \pm 0,06$ g/g em meio mineral e em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente (Ramos *et al.*, 2021a).

Também na área de produção de compostos bloco-construtores, uma linhagem de *K. phaffii* foi desenvolvida para produção heteróloga de lactato (Melo *et al.*, 2018a). A construção de linhagens de *K. phaffii* para produção de ácido láctico envolveu diferentes modificações genéticas. Inicialmente, o gene que codifica para a enzima lactato desidrogenase (LDH) foi clonado para expressão heteróloga na linhagem *K. phaffii* GS115. Posteriormente, o gene codificante da enzima piruvato descarboxilase (PDC) foi silenciado. Essas modificações foram feitas com a finalidade de aumentar a produção de ácido láctico nas linhagens de *K. phaffii* recombinantes. Após otimizações genéticas e de fermentação, a linhagem recombinante foi capaz de produzir lactato com rendimento de 0,65 g/g a partir de glicerol como fonte de carbono (Melo *et al.*, 2018a).

A produção de diversos metabólitos em escala laboratorial, junto com a possibilidade de escalonamento - que já sendo observada, principalmente na produção de proteínas recombinantes para uso farmacêutico - demonstram o potencial dessa levedura no ramo da biologia sintética e produção de compostos bloco-construtores. Mais informações a respeito do metabolismo, taxonomia, otimização de bioprocessos e

avanços tecnológicos utilizando *K. phaffii* como modelo, estão detalhados e revisadas em (Carneiro *et al.*, 2022).

1.5 Etileno glicol

Etileno glicol (EG; 1,2-etanodiol) é um importante composto orgânico de 2 carbonos com diversas aplicações industriais, como a produção de anticongelantes, fluidos hidráulicos, surfactantes e base para cosméticos. Mas o seu maior uso está na produção de polímeros plásticos como as resinas de polietileno tereftalato (PET), poliuretano (PU) e succinato de polietileno (PE) (Zhang *et al.*, 2020). O etileno glicol também pode ser utilizado na forma de monômero, chamado de mono etileno glicol (MEG), um composto viscoso com ação anticongelante. Em 2020, o EG foi considerado um dos compostos bloco construtores mais promissores, que podem ser produzidos a partir de biomassa lignocelulósica (De Jong *et al.*, 2020).

A demanda global de etileno glicol cresceu 4.7% de 2014 a 2020, atingindo uma produção de 22,8 milhões de toneladas. Esse montante foi avaliado em aproximadamente 30,7 bilhões de dólares, com uma projeção de crescimento de 3.3% até 2027, atingindo 38.1 bilhões de dólares neste ano. Essa diminuição na projeção de crescimento se deu pela pandemia do Covid-19, já que houve uma crise mundial na produção de insumos variados (Global Industry Analysts, 2021). O maior mercado global de etileno glicol é dos Estados Unidos, com valores estimados de 8.3 bilhões de dólares em 2020, seguido pela China, que possui uma projeção de crescimento de 5.8% até 2027, quando o montante atingirá 7.8 bilhões de dólares (Global Industry Analysts, 2021).

A produção industrial de etileno glicol ocorre majoritariamente por síntese química através da hidratação do óxido de etileno derivado da indústria petroquímica, um composto tóxico e danoso para a camada de ozônio e, contribuinte para o aumento do efeito estufa, (Cabulong *et al.*, 2017a; Zhang *et al.*, 2020). Segundo o relatório global de energia, emitido pelo IEA Bioenergy, em 2020, se 20% dos produtos plásticos a partir do etileno glicol forem substituídos por bioplásticos, a emissão de gases do efeito estufa diminuiria cerca de 32,5 milhões de toneladas por ano, representando uma redução de 65%. Visto que os materiais produzidos a partir de bioplásticos podem ser reciclados e

reutilizados diversas vezes, esse índice de redução pode ser ainda maior se os bioprodutos forem feitos a partir de biomassa (De Jong *et al.*, 2020).

Uma pequena fração da produção de EG é derivada indiretamente de glicose, através da produção de bioetanol e subsequente conversão química em etileno glicol. A síntese biotecnológica de etileno glicol a partir de fontes renováveis é altamente atraente e atualmente grandes indústrias utilizam esse processo semibiológico para produção de polímeros plásticos renováveis (De Jong *et al.*, 2020). A maior empresa produtora de etileno glicol renovável, é a Glycols Ltda, na Índia. Na qual, a cada 1.7 toneladas de etanol, são produzidas 1 tonelada de etileno glicol. Diversas outras empresas estão em processo de escalonamento, como a Braskem, empresa brasileira que possui uma planta comercial capaz de produzir 200 mil toneladas de polietileno a partir de etanol proveniente de bagaço de cana de açúcar. Segundo a Braskem [2021?] e De Jong *et al.* (2020), a cada 1 tonelada produzida de polietileno, 2.5 toneladas de CO₂ são sequestradas da atmosfera.

1.5.1 Produção de etileno glicol por rota microbiana

Poucos estudos demonstram a implementação de vias metabólicas sintéticas em microrganismos que levam à produção direta de EG a partir de fontes renováveis, uma vez que vias bioquímicas naturais não são conhecidas (Choi *et al.*, 2017; Valdehuesa *et al.*, 2018; Zhang, Liu, Chen, 2017). Existem três vias metabólicas sintéticas que levam à produção de etileno glicol a partir de xilose, a xilulose-1P, ribulose-1P, a via de Dahms, e todas elas possuem o mesmo rendimento teórico máximo de 0,41 g/g (Figura 4) (Tabela 3) (Cam *et al.*, 2016; Salusjärvi *et al.*, 2019). Dentre elas, a rota metabólica mais estudada, é a via de Dahms (Zhang *et al.*, 2020). Essa via consiste nos passos elencados na Figura 4, e é a continuação da via de Weimberg (Figura 2), aonde ocorre a clivagem de KDX em glicolaldeído e piruvato, por uma enzima aldolase (Dahms, 1974).

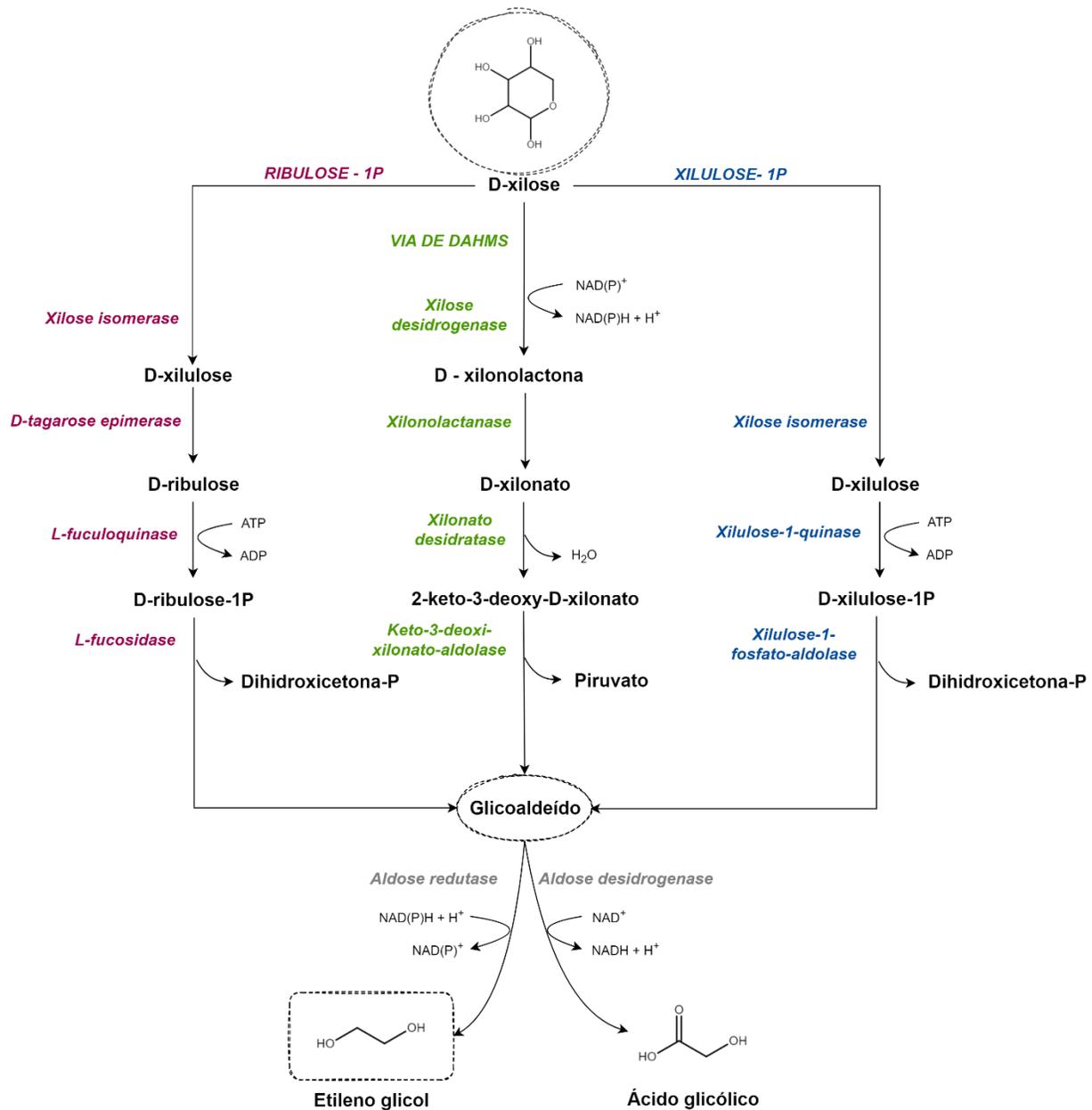


Figura 4 - Vias biosintéticas para a produção de etileno glicol (EG) e ácido glicólico (AG) a partir de xilose. As cores representam as diferentes vias metabólicas e suas respectivas enzimas. Em rosa escuro: via da ribulose-1P; verde: via de Dahms; azul: via da xilulose-1P; cinza: enzimas que são comuns para todas as 3 vias de produção de EG.

Fonte: Adaptada ALKIM *et al.* (2015); PEREIRA *et al.* (2016); DAHMS (1974).

Tabela 3 - Produção biotecnológica de etileno glicol

Microrganismo	EG (g/L)	Y ¹ (g/g)	Y ¹ mol/mol	Processo fermentativo	Substrato	Via metabólica	Ref
Bactérias							
<i>E. coli</i> WL3110	108,2	0,36	0,87	Batelada alimentada (xilose)	Xilose	Dahms	Chae <i>et al.</i> , (2018)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	72,0	0,40	0,97	Batelada alimentada	Xilose	Dahms	Wang, Y. <i>et al.</i> (2018b)
<i>E. coli</i> MG1655	40,0	0,35	0,85	Batelada alimentada	Xilose	Ribulose-1P	Pereira <i>et al.</i> , (2016)
<i>E. coli</i> MG1655	20,0	0,38	0,91	Batelada	Xilose	Xilulose-1P	Alkim <i>et al.</i> (2015)
<i>E. coli</i> W3110(DE3)	11,7	0,29	0,70	Batelada	Xilose	Dahms	Liu <i>et al.</i> , 2013a
<i>E. coli</i> W3110	7,7	0,39	0,95	Batelada	Xilose	Dahms	Cabulong <i>et al.</i> (2017b)
<i>E. cloacae</i> S1	34,1	0,28	0,99	Batelada alimentada	Ácido xilônico	Dahms	Zhang <i>et al.</i> , (2020)
Leveduras							
<i>S. cerevisiae</i> D452-2	0,5	0,01	0,03	Batelada	Xilose	Xilulose-1P	Chomvong <i>et al.</i> (2016)
<i>S. cerevisiae</i> H4099	0,0014	-	-	Batelada	Xilose + Glicose	Dahms	Salusjärvi <i>et al.</i> (2017)
<i>S. cerevisiae</i> H131-A3CS	4,0	-	-	Batelada alimentada contínua (glicose)	Xilose + Glicose	Xilulose-1P	Uranukul <i>et al.</i> (2019)

¹Rendimento

Fonte Adaptada SALUSJÄRVI *et al.* (2019).

A partir da via de Dahms, a produção microbiana de etileno glicol se dá pela ação de uma enzima aldeído redutase (ALDR), que reduz o glicolaldeído a etileno glicol (Figura 4). O glicolaldeído, além de ser reduzido a etileno glicol, pode se oxidado a ácido glicólico por uma enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (Figura 4). Assim, a enzima aldeído

desidrogenase é responsável por desviar o fluxo de carbono da via metabólica de etileno glicol, criando uma rota competitiva (Francois, Alkim, Morin, 2020).

Um dos primeiros estudos mostrando a produção de EG a partir de pentoses em bactérias geneticamente modificadas, via oxidação de xilose para ácido xilônico (via Dahms), foi descrito por (Liu *et al.*, 2013). Em seu trabalho, Liu *et al.* (2013), obteve uma linhagem recombinante de *E. coli* capaz de produzir 11,7 g/L de EG, a partir de 40 g/L de xilose. A melhor produção de EG descrita na literatura, foi reportada por Chae *et al.*, (2018). Em seu trabalho, após vários ajustes de fluxo metabólico, incluindo a via catabólica de xilose nativa junto com a modulação da via de Dahms, uma *E. coli* geneticamente modificada, foi capaz de produzir 108,18 g/L de EG, com produtividade e rendimentos de 2,25 g/L/h e 0,36 g/g, respectivamente (Chae *et al.*, 2018). A Tabela 3 resume os principais resultados obtidos com diferentes organismos produtores de EG.

Recentemente, foi descoberta a produção de natural de etileno glicol a partir de ácido xilônico por bactérias *E. cloacae*, através de um *screening* de microrganismos selvagens capazes de consumir ácido xilônico. Após a super-expressão da via de Dahms, a linhagem *E. cloacae* S1 modificada produziu 34 g/L e 13 g/L de etileno glicol e ácido glicólico, respectivamente, utilizando ácido xilônico como substrato, em processo de batelada alimentada. A bactéria foi capaz de converter 0,99 mol/mol de ácido xilônico a etileno glicol em 46 h de fermentação (Zhang *et al.*, 2020).

Em leveduras, até o presente momento, a produção de etileno glicol só foi avaliada em *S. cerevisiae* (Salusjärvi *et al.*, 2019) (Tabela 3). No caso de maior sucesso, as enzimas da via xilulose-1P (D-tagarose epimerase (*PcDTE*) de *P. cichorii*, L-fuculoquinase (*FucK*), L-fuculose-1P-aldolase (*FucA*) e L-1,2-propanodiol oxidorredutase (*FucO*) de *E. coli*) foram inseridas em *S. cerevisiae*, para produção de etileno glicol a partir de xilose. Após diversas otimizações de gargalos da via, uma linhagem recombinante capaz de produzir 4 g/L de etileno glicol foi obtida, indicando a maior produção de etileno glicol em leveduras até o momento (Uranukul *et al.*, 2019). Em um trabalho diferente, a via da xilulose-1P em também foi inserida em *S. cerevisiae*, porém, a linhagem recombinante foi capaz de produzir 0,5 g/L de etileno glicol a partir de xilose (Tabela 3) (Chomvong *et al.*, 2016). Também, através da via da xilulose-1P uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* foi capaz de produzir mais de 150 g/L de ácido

glicólico, mas a produção de etileno glicol foi de apenas 0,0014 g/L (Tabela 3) (Salusjärvi *et al.*, 2017).

Um dos principais gargalos na via de Dahms ocorre na conversão de ácido xilônico a KDX pela enzima xilonato desidratase (XD) (Figura 4). O gene que codifica para a enzima XD (*XylD*) foi originalmente isolado de *C. crescentus* (Stephens *et al.*, 2007) e, até o presente momento, existem poucas xilonato desidratases caracterizadas na literatura. A partir das sequências gênicas conhecidas de XD, os trabalhos publicados reportaram baixa atividade enzimática em leveduras e bactérias recombinantes (Chae *et al.*, 2018; Salusjärvi *et al.*, 2017) quando comparada à atividade da enzima xilose desidrogenase (XDH) nos mesmos microrganismos (Toivari *et al.*, 2012).

Neste contexto, esse trabalho tem como objetivo obter linhagens da levedura *K. phaffii* capazes de produzir etileno glicol a partir de xilose presente em hidrolisados de biomassa de cana de açúcar. A via metabólica sintética construída neste trabalho tem como modelo a via de Dahms (Figura 4). Essa rota metabólica tem como intermediário o ácido xilônico e, por isso, a levedura *K. phaffii* se torna um *chassi* ideal para essa produção. Para melhorar a eficiência da via sintética de produção de EG, novas sequências codificantes para enzimas xilonato desidratase (XD) serão identificadas e avaliadas pela primeira vez em linhagens recombinantes de *K. phaffii*.

2 JUSTIFICATIVA

Cada vez mais recursos têm sido empenhados para gerar cidades mais sustentáveis, com economias circulares, passando pela utilização de resíduos para a geração de produtos de interesse industrial (Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE, 2021). O número de trabalhos voltados para o aproveitamento tecnológico dos coprodutos e resíduos agroindustriais vem crescendo nos últimos anos, principalmente aqueles mais voltados para a obtenção de bioetanol ou etanol de segunda geração, sendo o Brasil, um dos maiores produtores mundiais de bioetanol a partir de biomassa de cana de açúcar (De Jong *et al.*, 2020).

No último ano, a produção interna de compostos químicos de uso industrial aumentou cerca de 0,46%, e a demanda por esses produtos subiu 12,1%. Vale destacar, que a maioria dos produtos químicos utilizados no Brasil, são importados e representam 47% da demanda do mercado nacional. Essa demanda aumentou 19,1% e a exportação de produtos químicos brasileiros diminuiu 8,4% no primeiro trimestre de 2021. Considerando as flutuações do dólar, o valor das importações de produtos de commodities, como a nafta petroquímica que é utilizada na produção de diversos insumos, como PET, p-xileno e combustíveis, cresceu 170,8% no último ano (Associação Brasileira da Indústria Química - ABIQUIM, 2021).

Neste contexto, é importante destacar a necessidade de trabalhos de pesquisa que foquem na obtenção de intermediários de síntese, principalmente para fármaco-químicos, além de compostos que possam agregar valor à cadeia de produção de biocombustíveis, como o etileno glicol (De Jong *et al.*, 2020).

Desta forma, o aproveitamento da xilose presente na fração hemicelulósica, remanescente da produção de etanol de segunda geração, da biomassa de cana e de outros resíduos agroindustriais, oferece uma excelente oportunidade para o maior desenvolvimento de biorrefinarias no Brasil e maior competitividade no mercado químico mundial.

Portanto, a relevância do presente trabalho vem da exploração do potencial da construção de vias sintéticas, capazes de fornecer rotas alternativas para a produção de diferentes compostos, amplamente utilizados, a partir de fontes de carbono renováveis.

Sendo este um primeiro passo em direção à produção por rota microbiana de EG em *K. phaffii*, e a possibilidade de agregar valor às cadeias produtivas já existentes de forma mais econômica e sustentável.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Obter, por biologia sintética, linhagens da levedura *K. phaffii* capazes de produzir etileno glicol (EG) a partir de xilose.

3.2 Objetivos específicos

- a) identificar novos genes codificantes para a enzima xilonato desidratase;
- b) construir uma linhagem modificada geneticamente de *K. phaffii* capaz de produzir etileno glicol pela expressão das enzimas da via metabólica sintética;
- c) caracterizar as linhagens de levedura obtidas através de ensaios fermentativos em meio sintético;
- d) identificar etapas limitantes para produção de EG nas leveduras recombinantes construídas;
- e) otimizar linhagens recombinantes de *K. phaffii* para aumento da produção de EG.

CAPÍTULO 1 – Construção de linhagens de *K. phaffii* produtoras de etileno glicol

4 INTRODUÇÃO

A parte inicial deste capítulo descreve o processo de seleção das enzimas utilizadas para a construção da nova via sintética de produção de EG. Além disso, apresenta o detalhamento das características genotípicas das linhagens utilizadas para a construção desta via. A montagem dos plasmídeos e protocolos moleculares para a engenharia metabólica da levedura *K. phaffii* X-33 também se encontram aqui descritos.

A segunda parte deste capítulo detalha a construção molecular da via de produção de EG em leveduras *K. phaffii*, utilizando os plasmídeos construídos. As linhagens recombinantes capazes de produzir EG são caracterizadas e com isso, a funcionalidade da nova via sintética de produção de EG é confirmada. Essa confirmação possibilitou um depósito de patente (BR 10 2023 005615 6) em uma parceria Embrapa Agroenergia e Universidade de Brasília.

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Linhagens, genes e plasmídeos utilizados

Linhagem de levedura: *Komagataella phaffii* X-33 Wild Type (Invitrogen). A linhagem de *K. phaffii* X-33 expressando os genes *XylB*- BS, HL, AM e MN, que codificam para isoenzimas xilose desidrogenase (XDH) gerou respectivamente as linhagens p2BS6, p1HL2, AM1 e MN9 (Tabela 4) (BR102018001359-9), (Ramos *et al.*, 2021b).

Linhagem bacteriana: *Escherichia coli* TOP10 (*E. coli* TOP 10) (Tabela 4).

Todas as linhagens são mantidas em ultra freezer a -80°.

Tabela 4 - Lista de linhagens microbianas utilizadas neste trabalho

(Continua)

Linhagens	Genótipo principal	Fenótipo principal	Referência
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)		
	ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1		Thermo Fisher
	araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK	-	Scientific (2006a)
	rpsL (StrR) endA1 nupG λ		

Tabela 4 - Lista de linhagens microbianas utilizadas neste trabalho

(Conclusão)

Linhagens	Genótipo principal	Fenótipo principal	Referência
<i>K. phaffii</i> X-33	Prototrófica	-	Thermo Fisher Scientific (2006b)
<i>K. phaffii</i> P2BS6	pGAPZB(XDH)_ <i>xyIB-AM</i>	Zeo ^R , XDH	Ramos <i>et al.</i> (2021b)
<i>K. phaffii</i> P1HL2	pGAPZB(XDH)_ <i>xyIB-BS</i>	Zeo ^R , XDH	Ramos <i>et al.</i> (2021b)
<i>K. phaffii</i> AM1	pGAPZB(XDH)_ <i>xyIB-HL</i>	Zeo ^R , XDH	Ramos <i>et al.</i> (2021b)
<i>K. phaffii</i> MN9	pGAPZB(XDH)_ <i>xyIB-MN</i>	Zeo ^R , XDH	Ramos <i>et al.</i> (2021b)

Fonte: Elaboração própria (2022).

Todos os genes utilizados neste trabalho, bem como suas principais características estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 - Lista de genes utilizados neste trabalho

Gene	Microrganismo de origem	Enzima	Enzimas para clonagem
<i>xyIB-AM</i>	<i>Azospirillum amazonense</i>	XDH	EcoRI e XbaI
<i>xyIB-MN</i>	<i>Massilia niastensis</i>	XDH	EcoRI e XbaI
<i>xyIB-BS</i>	<i>Brevundimonas subvibrioides</i>	XDH	EcoRI e XbaI
<i>xyIB-HL</i>	<i>Halomonas lutea</i>	XDH	EcoRI e XbaI
<i>XylD-am</i>	<i>Azospirillum amazonense</i>	XD	BamHI e NotI
<i>XylD-bs</i>	<i>Brevundimonas subvibrioides</i>	XD	BamHI e NotI
<i>XylD-hl</i>	<i>Halomonas lutea</i>	XD	BamHI e NotI
<i>YjhG</i>	<i>E. coli</i>	XD	BamHI e NotI
<i>XylD</i>	<i>C. crescentus</i>	XD	BamHI e NotI
<i>YjhH</i>	<i>E. coli</i>	ALDO	XhoI e SacI
<i>FucO</i>	<i>E. coli</i>	ALDR	XhoI e SacI

Fonte: Elaboração própria (2022).

Todos os plasmídeos, e suas principais características, usados neste trabalho estão elencados na Tabela 6.

Tabela 6 - Lista de plasmídeos utilizados e suas principais características

(Continua)

Plasmídeos	Expressão	Promotor	Características relevantes	Enzimas utilizadas para linearizar	Referência
pGAPZB	-	GAP	Zeo ^R		Invitrogen (2010)
pGAPZB_xyIB-AM	XDH	GAP	Zeo ^R , derivado do pGAPZB carregando o gene <i>XyIB-AM</i>	<i>Avr II</i>	Ramos <i>et al.</i> (2021b)
pGAPZB_xyIB-BS	XDH	GAP	Zeo ^R , derivado do pGAPZB carregando o gene <i>XyIB-BS</i>	<i>Bsp HI</i>	Ramos <i>et al.</i> (2021b)
pGAPZB_xyIB-HL	XDH	GAP	Zeo ^R , derivado do pGAPZB carregando o gene <i>XyIB-HL</i>	<i>Bsp HI</i>	Ramos <i>et al.</i> (2021b)
pGAPZB_xyIB-MN	XDH	GAP	Zeo ^R , derivado do pGAPZB carregando o gene <i>XyIB-MN</i>	<i>Bsp HI</i>	Ramos <i>et al.</i> (2021b)
pKGFP-Id	-	PGK1	Kan ^R		Betancur <i>et al.</i> (2017)
pKLD	-	PGK1	Gen ^R , derivado do pKGFP-Id sem o gene <i>EGFP</i>	-	Betancur <i>et al.</i> (2017)
pKLD_ <i>XyID-am</i>	XD	PGK1	Gen ^R , derivado do pKLD carregando o gene <i>XyID-am</i>	<i>Sac I</i>	Este trabalho
pKLD_ <i>XyID-bs</i>	XD	PGK1	Gen ^R , derivado do pKLD carregando o gene <i>XyID-bs</i>	<i>Sac I</i>	Este trabalho
pKLD_ <i>XyID-hl</i>	XD	PGK1	Gen ^R , derivado do pKLD carregando o gene <i>XyID-hl</i>	<i>Sac I</i>	Este trabalho

Tabela 6 - Lista de plasmídeos utilizados e suas principais características

(Conclusão)

Plasmídeos	Expressão	Promotor	Características relevantes	Enzimas utilizadas para linearizar	Referência
pKLD_ <i>YhjG</i>	XD	PGK1	Gen ^R , derivado do pLKD carregando o gene <i>YhjG</i>	<i>Sac I</i>	Este trabalho
pKLD_ <i>XylD</i>	XD	PGK1	Gen ^R , derivado do pLKD carregando o gene <i>XylD</i>	<i>Sac I</i>	Este trabalho
pBSK	-	-	Amp ^R , derivado do pBluescript II SK (+)		Agilent Technologies (2008)
pBSK_ <i>YjhH+FucO</i>	ALDO +	TEF2 +	Amp ^R , derivado do pBSK carregando os genes <i>YjhH</i> e <i>FucO</i>	-	Este trabalho
	ALDR	MDH3			
B3-036	-	-	Hyg ^R	-	Prielhofer <i>et al.</i> (2017)
pB3Hyg	-	TEF2 - MDH3	Hyg ^R , derivação do B3036 plasmídeo parcial		Este trabalho
pB3Hyg_ <i>YjhH+FucO</i>	ALDO + ALDR	TEF – MH3	Hyg ^R , derivação do pB3Hyg carregando os genes <i>YjhH</i> e <i>FucO</i>	<i>Bam HI</i>	Este trabalho
pB3Hyg_ <i>YjhH</i>	ALDO	TEF – MH3	Hyg ^R , derivação do pB3Hyg carregando o gene <i>YjhH</i>	<i>Bam HI</i>	Este trabalho

^R Resistência

Fonte: Elaboração própria (2022).

4.2 Meios e soluções

Todos os meios descritos em % consideram (m/v).

LB:

- Peptona bacteriológica 1%
- Extrato de levedura 0,5%
- Cloreto de sódio 1%

LB ágar

- Peptona bacteriológica 1%
- Extrato de levedura 0,5%
- Cloreto de sódio 1%
- Ágar 1,5%

YNB ágar:

- Meio sintético YNB 0,17 %
- Extrato de amônia 0,5 %
- Ágar 2 %

YP:

- Extrato de levedura 1%
- Peptona bacteriológica 2%

YP ágar:

- Extrato de levedura 1%
- Peptona bacteriológica 2%
- Ágar bacteriológico 2%

YPDS ágar:

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

- Sorbitol 18.2 %
- Ágar bacteriológico 2%

Soluções estoque para mistura em meio contendo YP:

- Xilose (20%)
- Glicose (20%)
- Glicerol (20%)

Todos os meios de cultura foram diluídos com água destilada e autoclavados à 121°C por 20 min.

4.3 Genes e plasmídeos

4.3.1 Identificação dos genes putativos codificantes para a enzima xilonato desidratase

Para identificar e sintetizar novos genes codificantes para a enzima XD, foi realizada uma pesquisa bibliográfica. Durante essa pesquisa, foram identificadas duas enzimas XD funcionais, uma em *E. coli* e outra em *C. crescentus*, juntamente com seus respectivos genes *yjhG* (Jiang *et al.*, 2015) e *XyID* (Stephens *et al.*, 2007), que já haviam sido caracterizados anteriormente. O gene escolhido para ser utilizado como molde foi o *XyID*, por já ter sido utilizado para expressão heteróloga em leveduras *S. cerevisiae* (Salusjärvi *et al.*, 2017). Utilizando a sequência de aminoácidos do gene *XyID*, foram feitas buscas nos bancos de dados do NCBI para identificar enzimas análogas (isoenzimas) à XD em diferentes microrganismos. Inicialmente, os alvos para essas buscas foram as bactérias das quais os genes das enzimas xilose desidrogenase (XDH), recentemente relatados por Ramos *et al.* (2021), foram encontrados.

Sequências homólogas foram encontradas nas bactérias: *Azospirillum amazonense* Y2, *Brevundimonas subvibrioides* ATCC 15264 e *Halomonas lutea* DSM 23508 (Tabela 5). A identidade da homologia entre o gene molde *xyID* e as sequências escolhidas foi de 79.9 %, (IlvD/Edd family dehydratase [Nitrospirillum amazonense]) para *Azospirillum amazonense*, 61.38 % (IlvD/Edd family dehydratase [Brevundimonas

subvibrioides]) para *Brevundimonas subvibrioides*, e 64.31 % (IlvD/Edd family dehydratase [Halomonas lutea]) para *Halomonas lutea*.

Com o objetivo de alcançar a expressão heteróloga em *K. phaffii*, foram realizadas otimizações nos cinco genes associados à enzima XD. As otimizações foram feitas através da ferramenta virtual *Integrated DNA Technologies* - IDT (Codon optimization tool: synthetic gene design made easy). As sequências de nucleotídeos originais, otimizadas e sequências de aminoácidos podem ser consultados em anexo (Anexo A).

Após a otimização, foi desenvolvido um cassete de expressão específico para cada um dos 5 genes codificantes para a XD, onde o promotor pPGK1 foi escolhido como regulador da expressão, o terminador foi o AOX1. Além disso, foram adicionados dois sítios de restrição da enzima *Bam* HI na extremidade do promotor e *Not* I no terminador. A síntese gênica foi realizada pela empresa GenOne. Posteriormente, os cassetes de expressão foram clonados no plasmídeo constitutivo pKLD (Tabela 6). No total foram construídos 5 plasmídeos iguais, a única diferença é o gene que codifica para a enzima XD. A Figura 5 é o exemplo do plasmídeo que foi construído com o gene *xyID* de *C. crescentus*.

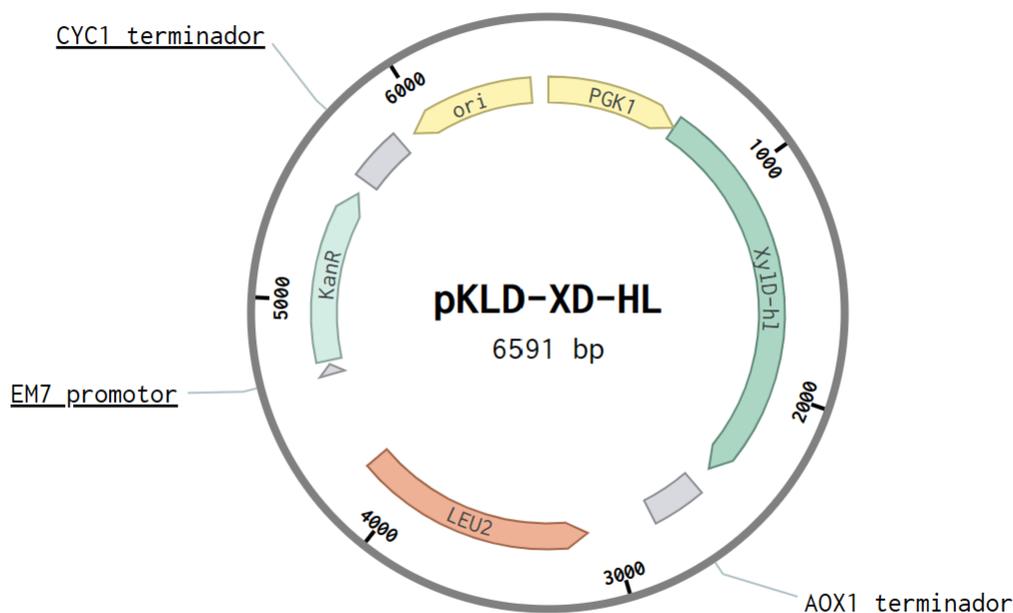


Figura 5 - Plasmídeo pKLD_XD construído com o gene *xyID* de *C. crescentus* que codifica para a enzima XD.

Fonte: Elaboração própria (2022).

4.3.2 Identificação dos genes codificantes para as enzimas dehidro-deoxi-xilonato aldolase (ALDO) e aldeído redutase (ALDR).

Os genes codificantes para dehidro-deoxi-xilonato aldolase (ALDO) e aldeído redutase (ALDR) (*yjhH* (Liu *et al.*, 2013a) e *FucO* (Alkim *et al.*, 2015), respectivamente), foram previamente caracterizados em *E. coli*. Ambas as sequências gênicas foram otimizadas para expressão heteróloga em *K. phaffii* utilizando a ferramenta virtual *Integrated DNA Technologies - IDT* (Codon optimization tool: synthetic gene design made easy), que podem ser consultadas no Anexo A. Após a otimização, um cassete de expressão foi desenhado (Figura 6), no qual os dois genes selecionados, *yjhH* e *FucO*, foram sintetizados *in tandem*, com diferentes promotores e terminadores. O promotor escolhido para regular a expressão do gene *yjhH* foi o pTEF2 e o terminador CYCt. Para o gene *FucO*, o promotor escolhido foi o pMDH3 e terminador TDH3t. Esse cassete de

expressão foi denominado MOD_1, e possui 4211 pares de bases. O MOD_1 foi sintetizado pela empresa GenOne no plasmídeo comercial pBSK (Figura 7).

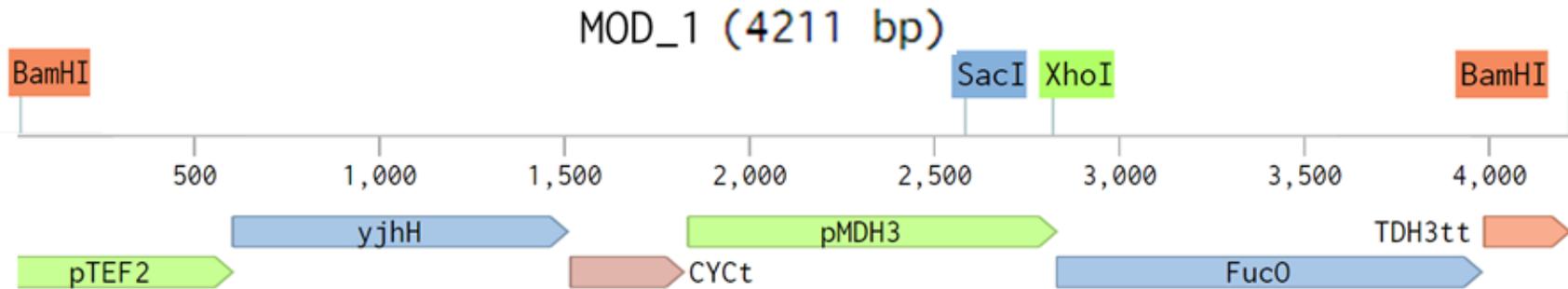


Figura 6 - Cassete de expressão desenhado com os genes codificantes para as enzimas ALDO e ALDR. O Promotor regulador da expressão do gene *yjhH* (ALDO) é o pTEF2, terminador CYCt. A regulação da expressão do gene *FucO* (ALDR) é feita pelo pMDH3, o terminador é o TDH3t. Esse cassete foi denominado MOD_1 e possui 4211 pares de bases (pb), com sítios de restrição BamHI em ambas as extremidades. O pTEF2 possui 603 pb, o gene *yjhH* 906 pb, CYCt 307 pb, o promotor pMDH3 possui 996 pb, o gene *FucO* 1149 e o terminador TDH3t 232 pb. Fonte: Elaboração própria (2022).

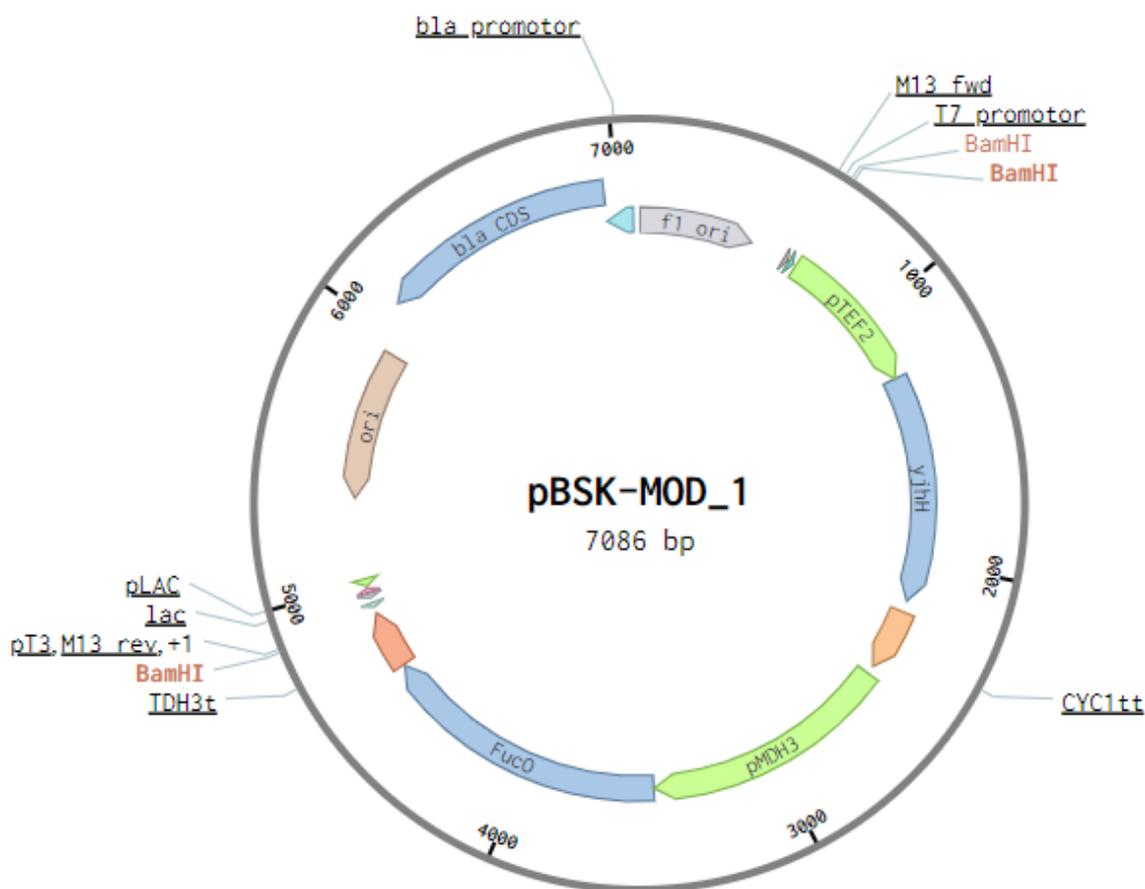


Figura 7 - Mapa do plasmídeo pBSK-MOD_1. Plasmídeo contendo o cassete de expressão MOD_1 com os genes codificantes para ALDO (*yjhH*) e ALDR (*FucO*).
Fonte: Elaboração própria (2022).

4.4 Transformação bacteriana

Todos os plasmídeos empregados nesse trabalho, foram transformados em *E. coli* TOP10. A transformação foi realizada por eletroporação seguindo os protocolos descritos em (Sambrook, Russell, 2001). Resumidamente, em 100 μ l de células *E. coli* competentes foi adicionado 80 ng de plasmídeo. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação estéril e incubada em gelo por 60 segundos. No eletroporador, a voltagem utilizada foi de 1800V. Foi feita a eletroporação e prontamente adicionado 1 mL de meio de cultura LB nas amostras. Estas foram incubadas a 37°C, por 1h, e em

seguida plaqueadas em meio LB ágar contendo 50 µg/mL de kanamicina (pKLD_XDs) ou 100 µg/mL de ampicilina (pBSK_MOD_1). As placas foram incubadas durante à noite em estufa a 37°C.

4.5 Extração de DNA plasmidial de bactérias

Após experimentos de transformação, as células foram transferidas para tubos de fundo cônico de 50 mL contendo 10 mL de meio LB com o antibiótico específico. Os tubos contendo as células foram incubados a 37°C, durante à noite a 200 rpm. Uma alíquota de cada cultura foi utilizada para armazenamento em freezer -80°C (glicerol 30%). O restante das células foi centrifugado (3800 g x 10 min) e utilizado para extração dos plasmídeos com o Kit GeneJET Plasmid Miniprep. O procedimento seguiu as etapas descritas no manual do fabricante. O DNA extraído foi quantificado em Nanodrop.

4.6 Eletroforese em gel de agarose

A fim de identificar e quantificar amostras de DNA, foram feitos experimentos de eletroforese em gel de agarose, 0.8%, corado com brometo de etídeo 62.5 µg/mL. Os géis de agarose contendo as amostras foram analisados em cubas Thermo Scientific, contendo o tampão SB 1x, 90 V e 110 A. As amostras de DNA foram quantificadas com o marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder 0.1 µg/mL (Thermo Scientific). Os géis de agarose resultantes dos experimentos de eletroforese foram analisados e fotografados utilizando o equipamento foto documentador L-Pix Chemi, Loccus Biotecnologia.

4.7 Ensaios de restrição de DNA plasmidial

Os ensaios de restrição de DNA foram feitos de acordo com as enzimas de restrição correspondentes à cada gene ou plasmídeo (Tabela 7). Brevemente, cada reação ocorreu por aproximadamente 2 h, a 37°C, seguindo as especificações indicadas no manual do fabricante (Thermo Scientific), com otimizações, quando necessárias. Após cada reação de digestão, foram feitos experimentos de eletroforese em gel de agarose para confirmação dos fragmentos esperados.

Tabela 7 - Lista de enzimas utilizadas para realizar reações de digestão e os respectivos plasmídeos.

Plasmídeo	Enzima codificante	Enzimas de restrição para clonagem	Enzima de restrição para linearizar
pGAPZB	XDH	EcoRI e XbaI	AvrII ou BspHI
pKLD	XD	BamHI e NotI	Sac I
pB3Hyg	ALDO	XhoI e SacI	BamHI ou XhoI
pB3Hyg	ALDR	XhoI e SacI	BamHI ou XhoI

Fonte: Elaboração própria (2022).

4.7.1 Reação de ligação

Alíquotas contendo fragmentos de DNA a serem ligados foram incubadas em gelo e 1 μ L da enzima de ligação T4 DNA ligase (Thermo Fischer Scientific) foi adicionado. A reação foi incubada por 30 min a 22°C, de acordo com as indicações do fabricante. A reação de ligação foi dialisada (membrana VSWP para microdiálise) por 15 min.

4.7.2 Reação de desfosforilação

A reação de desfosforilação foi realizada de acordo com o manual do fabricante (Thermo Fischer Scientific, 2010), e mantida por 1 h a 37°C. A enzima fosfatase foi inativada por 15 min a 65°C. Em seguida, o DNA foi purificado com o kit da Promega. Os DNAs purificados foram quantificados em Nanodrop. Para a reação foram utilizados 88 μ L do plasmídeo pB3Hyg linearizado e purificado, 1,5 μ L da enzima SAP fosfatase, 10 μ L Tampão SAP 10X, 0,5 μ L água ultrapura estéril.

4.8 Construções de plasmídeos

4.8.1 pKLD sem inserto

Foi realizada a construção do plasmídeo pKLD vazio para uso como controle negativo em experimentos de fermentação. O plasmídeo pKLD contendo o gene codificante para a enzima xilonato desidratase (XD) (Tabela 6) foi digerido com as enzimas de restrição Sall e SacI, conforme as indicações do fabricante. As enzimas de

restrição Sac I e Sal I foram utilizadas neste caso, porque ambas conseguem cortar em partes do plasmídeo que retiram o gene codificante para a XD e preserva os sítios de restrição Bam HI e Not I nas extremidades do gene. Após a digestão, foi feito um experimento de eletroforese em gel de agarose para verificação dos plasmídeos.

Posteriormente, foi feita uma transformação bacteriana para que fosse possível obter um maior número de cópias do novo plasmídeo pKLD_vazio. As bactérias transformadas foram inoculadas em frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio LB + kanamicina 50 ug/mL em shaker (200 rpm – 37°C), com a finalidade de extração plasmidial a partir do protocolo de midiprep da Qiagen. Após a extração plasmidial (midiprep), outra digestão foi realizada, utilizando as mesmas enzimas e parâmetros elencados acima. Após a digestão, foi feito um gel de agarose para verificação dos plasmídeos. O pKLD contendo o gene codificante para a enzima XD foi utilizado como controle neste experimento, para confirmação da construção correta do plasmídeo sem inserto.

4.8.2 Construção do plasmídeo pB3Hyg_MOD_1

Para a expressão das enzimas ALDO e ALDR, o plasmídeo de clonagem pBSK-MOD1 foi digerido com as enzimas XhoI e SacI para liberação do fragmento MOD_1, o qual contém os cassetes de expressão para os genes codificantes para as enzimas ALDO e ALDR. Posteriormente, o fragmento MOD_1 foi clonado no vetor de expressão episomal pB3-036 (Figura 8) (Prielhofer *et al.*, 2017), para *K. phaffii* resultando no plasmídeo pB3Hyg_MOD_1 (Figura 7).

Para tanto, o plasmídeo B3-036 foi digerido com as enzimas de restrição XhoI e SacI, para obtenção do fragmento de DNA desejado, o qual contém a marca de seleção para o antibiótico higromicina e a origem de replicação bacteriana, pUC Ori. A digestão resulta em 3 fragmentos de DNA, um com aproximadamente 4262 pb (fragmento desejado), o segundo com 2310 pb e outro com 1973 pb. Após a recuperação e purificação do fragmento maior de DNA plasmidial, uma *blunting reaction* foi realizada, e posteriormente, uma reação de ligação para a recircularização do plasmídeo B3-036. O plasmídeo circularizado foi clonado em *E. coli* TOP10, posteriormente extraído (midiprep)

e purificado. Em seguida, o vetor B3-036 purificado foi digerido com *Bam* HI e uma reação de ligação foi realizada para clonar o cassete de expressão MOD_1 (4211 pb), obtido por meio da restrição do plasmídeo pBSK com Bam HI. O plasmídeo resultante foi denominado pB3Hyg_MOD_1. O sistema de ligação foi transformado em *E. coli* TOP10 e linhagens selecionadas por resistência ao antibiótico higromicina foram isoladas para avaliação da presença do plasmídeo.

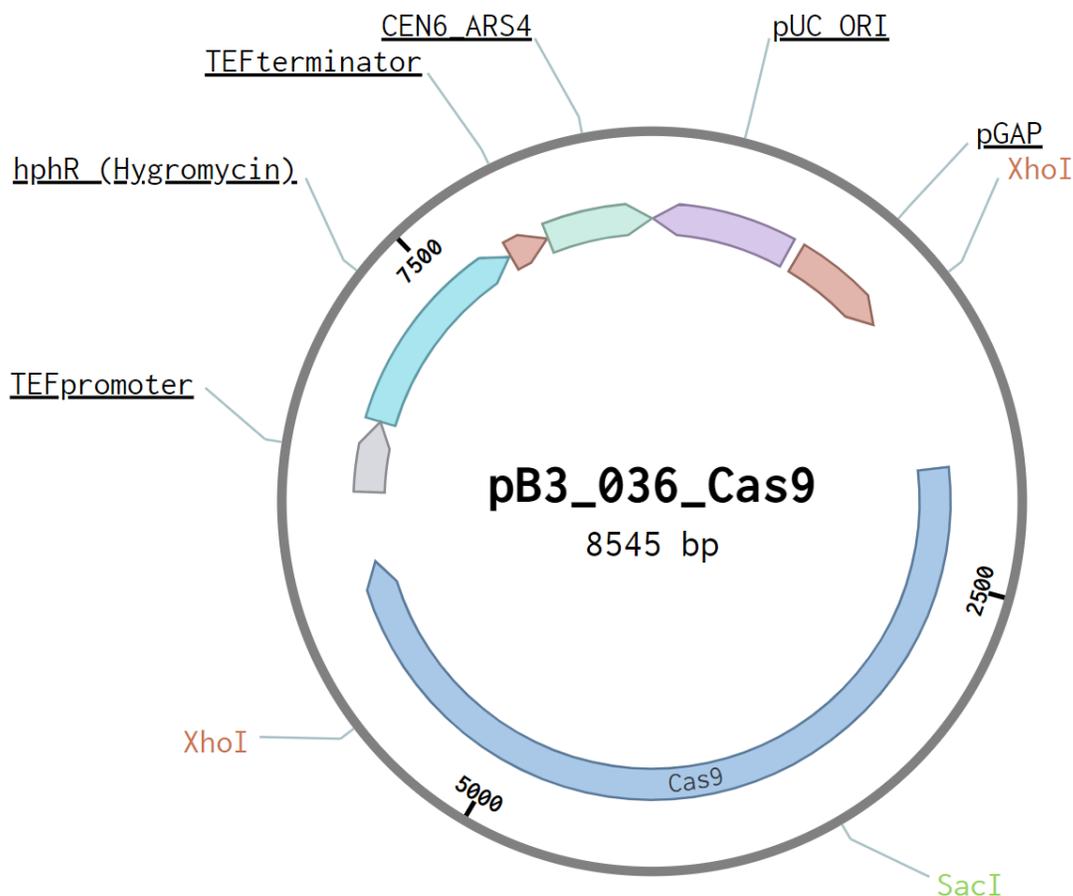


Figura 8 - Esquema representativo do plasmídeo para expressão heteróloga em *K. phaffii* B3-036.
Fonte: Elaboração própria (2022).

4.8.3 Transformação de leveduras *K. phaffii*

As transformações celulares das linhagens de *K. phaffii* foram realizadas de acordo com o protocolo de eletroporação descrito no manual da Invitrogen - Thermo Fisher Scientific (2010), com adaptações. As linhagens a serem transformadas foram crescidas em placas de Petri contendo YPD + antibiótico, e em seguida inoculadas em 35 mL de YPD líquido, em frascos de 125 mL, incubados a 30°C e 200 rpm, por 24 h. Após o período de crescimento, as células foram inoculadas em 100 mL de meio YPD em frascos de 500 mL, o inóculo foi feito para que em 16 h a DO ideal (1,3 – 1,5) para a transformação fosse atingida. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 1500 g por 5 min para dar início ao protocolo de transformação (Invitrogen). Ao final, as células foram plaqueadas em YPD sorbitol + antibiótico.

4.8.4 Extração de DNA plasmidial de levedura

As células foram inoculadas em 10 mL de meio YPD + antibióticos, em tubos de fundo cônico de 50 mL, e incubadas em shaker a 30°C, 200 rpm, *overnight*. O experimento de extração de DNA plasmidial foi realizado seguindo o protocolo Yeast Miniprep Plasmid Rescue (Robzyk, Kassir, 1992).

4.8.5 Reações de polimerase em cadeia (PCR)

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR apresentadas neste trabalho, se encontram na Tabela 8.

Tabela 8 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Nome	Nucleotídeos (5'-3')
pPGK-D7-F	GTTCTCATCCATGAGTGAGTC
pPGK-pKLD-F	CCATCACTGTCACCCGTCAT
Puc Ori (564 B3-036)-F	GATCCGGCAAACAAACCACC
3'AOX (pKLD)-R	GCAAATGGCATTCTGACATCC
Cyct (Modulo)-R	CGTACACGCGTCTGTACAGA
TDH3t (Modulo)-R	ACTACAGCCCGCATTGTTCA

Fonte: Elaboração própria (2023).

Os protocolos utilizados para realizar experimentos de PCR e PCR de colônia se encontram nas Tabelas 9, 10 e 11.

Tabela 9 - Parâmetros para reação de PCR de colônia para amplificação do fragmento de 2.2 kb do plasmídeo pKLD_XD

Reagentes	Volume	Condições
Água milli-Q estéril	34,1 µL	
Tampão 5x	10 µL	
dNTP	1 µL	
MgCl ₂ 25 mM	0,6 µL	1 ciclo de desnaturação: 98°C – 3 min
Primer F (pPGK D7-F)	1 µL	30 ciclos de: 98°C – 30 s; 58°C – 30 s; 72°C – 2:30 min
Primer R (AOX 3'-Rv)	1 µL	1 ciclo de extensão final: 72°C – 7 min; 10°C
DNA	2 µL	
Go Taq Hot Start	0,3 µL	
TOTAL	50 µL	

Fonte: Elaboração própria (2022).

Tabela 10 - Parâmetros para reação de PCR de colônia para verificação de integração do plasmídeo pB3Hyg_MOD_1

Reagentes	Volume	Condições
Água milli-Q estéril	38,3 µL	
Tampão 10x	5 µL	
dNTP	1 µL	
MgCl ₂ 25 mM	1,5 µL	1 ciclo de desnaturação: 94°C – 3 min
Primer F (Puc ORI-F)	1 µL	30 ciclos de: 94°C – 45 s; 57°C – 30 s; 72°C – 2:30 min
Primer R (Cyc -R)	1 µL	1 ciclo de extensão final: 72°C – 10 min; 10°C
DNA	4 µL	
Taq DNA polimerase recombinante	0,2 µL	
TOTAL	50 µL	

Fonte: Elaboração própria (2022).

Tabela 11 - Parâmetros para reação de PCR para verificação da integração do plasmídeo pB3Hyg_MOD_1

Reagentes	Volume	Condições
Água milli-Q estéril	35.2 µL	
Tampão 10x	5 µL	
dNTP	1 µL	
MgCl ₂ 25 mM	1,5 µL	1 ciclo de desnaturação: 94°C – 3 min
Primer F (Puc ORI-F)	1 µL	30 ciclos de: 94°C – 30 s; 56°C – 30 s; 72°C – 2:30 min
Primer R (Cyc -R)	1 µL	1 ciclo de extensão final: 72°C – 7 min; 10°C
DNA	5 µL	
Taq DNA polimerase recombinante	0,3 µL	
TOTAL	50 µL	

Fonte: Elaboração própria (2022).

4.8.6 Avaliação da funcionalidade das enzimas XDH e XD

As linhagens *K. phaffii* expressando XDH + XD e um controle negativo *K. phaffii* X-33 sem modificações foram repicadas em placas de Petri, contendo meio YPD ágar, suplementado com os antibióticos referentes à marca de seleção de cada plasmídeo (pGAPZB: zeocina, pKLD, geneticina) (Tabela 6) e incubadas em estufa (30°C) por 72 h. Após o período de incubação, foi feito o primeiro pré-inóculo em tubos de fundo cônico de 50 mL, contendo 10 mL de meio YPD + antibióticos. Os tubos foram incubados em shaker (30°C – 200 rpm) por 24 h. Em seguida, os pré-inóculos em tubos foram coletados por centrifugação (3800 g – 15 min), os sobrenadantes foram descartados e todo o *pellet* foi transferido para frascos de 125 mL contendo 30 mL de meio YPDX (xilose 40 g/L e glicose 20 g/L). Os frascos foram incubados em shaker (30°C – 200 rpm) por 24 h. Os cultivos celulares foram centrifugados (3800 g – 15 min) e inoculadas em frascos de 250 mL contendo 50 mL de YPDX (xilose 40 g/L e glicose 20 g/L), com DO inicial de aproximadamente 3. Os frascos foram incubados em *shaker* para o ensaio de crescimento (30°C – 200 rpm), que durou 144 h. Alíquotas de 1 mL foram retiradas uma vez a cada 24 h, para análise de metabólitos em HPLC e UPLC, e leitura de Densidade Óptica em Espectrofotômetro.

4.8.7 Construção de linhagens *K. phaffii* contendo a via metabólica completa para produção de etileno glicol

As linhagens *K. phaffii* expressando as enzimas XDH + XD e o controle negativo, expressando a enzima XDH e transformada com o plasmídeo pKLD_vazio, foram inoculadas em pré culturas de 90 mL de meio YPD + antibióticos (zeocina e geneticina), e posteriormente transformadas (4.8.3 Transformação de leveduras *K. phaffii*) com o vetor pB3_Hyg_MOD_1. Essa transformação resultou em 5 diferentes linhagens, expressando os genes codificantes para as enzimas XDH+XD+ALDO+ALDR.

4.8.8 Teste de funcionalidade da via metabólica completa de produção de etileno glicol

Todos os processos fermentativos a seguir foram realizadas seguindo os mesmos passos iniciais de pré-inoculo. As linhagens foram recuperadas do estoque em glicerol (30%) e plaqueadas em placas de Petri contendo YP ágar suplementado com 20 g/L de glicose, e antibióticos, quando necessário (100 µg/mL de zeocina, 200 µg/mL de geneticina e 200 µg/mL de higromicina), as placas foram incubadas em estufa (30°C) para crescimento. Após o crescimento, as células foram retiradas das placas e inoculadas em 5mL de meio YPD + antibióticos, em tubos e fundo cônico (50 mL), por 24 h, em *shaker* (30°C, 200 rpm).

4.8.9 Produção de EG em fracos

Para comparar a produção de EG em linhagem contendo diferentes XDs, as linhagens expressando todos os genes da via sintética de EG, mais 3 controles negativos (i) uma linhagem expressando XDH + pKLD_vazio, ii) expressando XDH + pKLD_vazio + pB3Hyg_vazio, e iii) expressando XDH + ALDO + ALDR + pKLD_vazio), foram inoculadas em frasco aletado de 500 mL contendo 100 mL de meio YP suplementado com 40 g/L de xilose e 20 g/L de glicose + antibióticos (zeocina, geneticina, higromicina). Os frascos foram incubados em shaker a 30°C e 200 rpm. Após 24 h, as células foram baixadas (3.800 g - 15 min), o sobrenadante descartado. O inoculo foi realizado para DO_{600nm} inicial de 10 ou 5 em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio YPDX suplementado com 40 g/L de xilose e 2 g/L de glicose + higromicina.

Os frascos foram incubados em shaker nas mesmas condições anteriores. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em intervalos regulares de tempo para mensurar crescimento celular, consumo de substratos e formação de produtos. O experimento foi realizado em triplicata.

4.8.10 Preparo de amostras para análise de peso seco

Para determinação do peso seco celular, alíquotas de 5 mL do pré inoculo e do último ponto da fermentação (em duplicata) foram centrifugadas (3800 g x 25 min), o sobrenadante foi descartado, e o pellet lavado com 5 mL de água destilada. Após

centrifugação (3800 *g* x 25 min), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso com 1 mL de água destilada e transferido para um tubo de vidro de 10 mL. O tubo vazio foi previamente pesado em balança analítica de precisão. As provetas contendo o *pellet* foram incubadas em estufa (60°C) por 72 h. Após o tempo de secagem, as provetas foram pesadas novamente. O peso seco celular foi calculado com base no valor diferencial.

4.8.11 Análise de metabólitos em HPLC/UPLC

Metabólitos no sobrenadante dos cultivos foram identificados e quantificados em equipamento de Cromatografia Líquida Waters (AcQuity UPLC H Class) equipado com diferentes colunas de acordo com o composto desejado (Tabela 12), seguindo os protocolos descritos em (Costa *et al.*, 2019; Vieira, 2018), com modificações. As amostras coletadas durante os cultivos foram centrifugadas (14.000 *g* x 10 min), e o sobrenadante armazenado em -20°C até o momento da análise. Para análise das amostras, essas foram diluídas em água ultrafiltrada (Milli Q), e analisadas seguindo os parâmetros indicados na Tabela 12. Após a corrida analítica, as concentrações foram calculadas por comparação com a área do pico obtido, através de uma curva-padrão. Os padrões utilizados para fazer a curva para cada corrida estão elencados na Tabela 13 - Padrões analíticos utilizados para quantificar metabólitos em HPLC e UPLC, com suas respectivas diluições.

Tabela 12 - Metodologia utilizada para analisar quantitativamente amostras em HPLC e UPLC.

Detector	Coluna	Temperatura da coluna	Fase móvel	Fluxo da fase móvel	Tempo de Análise
HPLC/RID	Açúcares orgânicos - Aminex HPX 87H	45°C	5mM de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	0,6 mL/min	24 min
	Ácidos carboxílicos - C18 HSS T3		10 mM de Tampão fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄) pH 2		
UPLC/PDA	2,1 x 150 mm, 1,8 µl	30°C	Metanol 100% Acetonitrila 10% Solvente A: água + TFA 0,05%	0,3 mL/min	15 min
HUPLC/ ELSD	BEH Amida	30°C	Solvente B: acetonitrila + TFA 0,05%	0,3 mL/min	-

Fonte: Elaboração própria (2022).

As fases móveis descritas na Tabela 12, foram preparadas em capela de exaustão, filtradas em bomba de vácuo manifold, com membrana em éster celulose (MCE), com 0,22 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro. Após filtradas, foram degaseificadas por 10 min.

Tabela 13 - Padrões analíticos utilizados para quantificar metabólitos em HPLC e UPLC, com suas respectivas diluições

Reagentes	Diluição seriada (g/L)						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Glicose	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1562
Xilose	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125
Xilitol	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1562
Glicerol	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1562	0.0781
Acetato	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1562	0.0781
Etanol	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1562
Etileno glicol	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1562	0.0781
Ácido glicólico	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1562	0.0781
Ácido xilônico	6	3	1.5	0.750	0.375	0.188	0.94

Fonte: Elaboração própria (2022).

Tabela 14 - Metodologia utilizada para quantificar e detectar cada composto da via metabólica de produção de etileno glicol, em HPLC e UPLC

Compostos	Coluna	Detector	Tempo de retenção
Acetato	HPX 87H	HPLC/RID	15.263
Ácido glicólico	HPX 87H	HPLC/RID	12.405
	C18 HSS T3	UPLC/PDA	1.608
Ácido xilônico	C18 HSS T3	UPLC/PDA	1.432
Arabitol	BEH Amida	HUPLC /ELSD	8.208
Etileno glicol	HPX87H	HPLC/RID	16.153
Glicerol	HPX 87H	HPLC/RID	13.360
Glicaldeído	HPX 87H	HPLC/RID	12.193
Glicose	HPX 87H	HPLC/RID	8.952
Xilose	HPX 87H	HPLC/RID	9.600
Xilitol	HPX 87H	HPLC/RID	11.172
	BEH Amida	HUPLC /ELSD	8.448

Fonte: Elaboração própria (2022).

4.8.12 Análise de metabólitos em UHPLC-MS/MS

As análises em UHPLC-MS/MS foram realizadas em um sistema UHPLC Nexera X2 (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna UPLC T3 de absorção (2,1 mm x 100 mm, 1,8 μ m) (Waters Technologies, Milford, EUA) acoplado a uma fonte de ionização de alta resolução MaXis 4G™ Q-TOF MS (Bruker Daltonics, Alemanha) através de uma fonte de ionização eletrospray.

Os parâmetros de execução cromatográfica foram: isocrático de 0,0 a 1,0 min (0% B), gradiente linear de 1,0 a 3,0 min (0 – 5% B), gradiente linear de 3,0 a 10,0 min (5 – 50% B), gradiente linear de 10,0 a 13,0 min (50 – 100% B), isocrático de 13,0 a 15,0 min (100% B) e isocrático de 15,0 a 20,0 min (0% B). Eluente A foi ácido fórmico f/v de 0,1% v/v na água e eluente B foi 0,1% v/v ácido fórmico em metanol. A vazão, a temperatura do forno e o volume de injeção foram de 0,4 mL/min, 40°C e 1 μ L de amostra, respectivamente. As alíquotas dos sobrenadantes da fermentação foram diluídas 30x antes da injeção. Os padrões foram injetados a 30 μ g/mL.

Os dados foram adquiridos no modo íon negativo. Os parâmetros de MS foram: deslocamento da placa final = 500 V, tensão capilar = 4000 V, pressão nebulizadora = 4,0 Barra, fluxo de gás seco = 9,0 L/min, temperatura seca = 200°C, taxa de espectro = 3,00 Hz, intervalo de detecção = m/z 75-1000. O formato de sódio (2 mM) em isopropanol: água (1:1 v/v) foi injetado diretamente através de uma válvula de 6 portas no início de cada corrida cromatográfica para calibração externa. Os parâmetros de MS/MS foram: energia de colisão, 20 – 50v utilizando um programa básico de pisada; tempo de ciclo de aquisição de íons precursores, 3.0 s; faixa de massa, 75-1000 m/z ; taxa de espectro, 3 Hz; armazenamento pré-pulso, 7,0 μ s; funil 1 RF, 300,0 Vpp. UHPLC-MS/MS foram adquiridos com otofControl (Bruker Daltonics) e HyStar versão 3.2 (Shimadzu) e visualizados com DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics).

A ferramenta de extração de íons foi utilizada para pesquisar manualmente os valores m/z de diferentes formas de ionização de alguns produtos de fermentação esperados nos cromatógrafos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação de possíveis novas xilonato desidratases

Para construção da via metabólica sintética de produção de etileno glicol em *K. phaffii*, as quatro enzimas envolvidas na conversão de xilose a EG foram identificadas na literatura (Figura 4). A partir dessa identificação, sequências gênicas heterólogas foram selecionadas para serem utilizadas neste trabalho. A primeira enzima da via, a xilose desidrogenase (XDH), que converte xilose a ácido xilônico, foi previamente caracterizada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana da Embrapa Agroenergia (Ramos *et al.*, 2021b).

A xilonato desidratase (XD), a segunda enzima da via, foi anteriormente caracterizada e mencionada na literatura como um fator limitante na produção de etileno glicol (Salusjärvi *et al.*, 2017). Para fins de comparação, o gene *XylD* de *C. crescentus* (Stephens *et al.*, 2007) e o gene *YjhG* de *E. coli* (Jiang *et al.*, 2015) foram escolhidos como controles positivos neste estudo.

O gene *XylD* foi previamente expresso em levedura (*S. cerevisiae*) (Stephens *et al.*, 2007), portanto, ele foi utilizado como referência para buscar novas sequências homólogas por meio de uma pesquisa no banco de dados do NCBI. Os genes selecionados, os microrganismos de origem e suas características se encontram na Tabela 15.

Tabela 15 - Características gerais dos genes utilizados neste trabalho

(Continua)

Identificação	Gene/Microrganismo de origem	Tamanho do gene (pb)	Descrição	Ref
XyD	<i>XylD</i> , <i>C. crescentus</i>	1776	XD controle	(Stephens <i>et al.</i> , 2007)
YG	<i>YjhG</i> , <i>E. coli</i>	1968	XD controle	(Jiang <i>et al.</i> , 2015)
AM	<i>XylD-am A. amazonense</i>	1779	XD putativo	Esse trabalho

Tabela 15 - Características gerais dos genes utilizados neste trabalho

(Conclusão)

Identificação	Gene/Microrganismo de origem	Tamanho do gene (pb)	Descrição	Ref
BS	<i>XylD-bs B. subvibrioides</i>	1785	XD putativo	Esse trabalho
HL	<i>XylD-hl H. lutea</i>	1803	XD putativo	Esse trabalho
ALDO	<i>YjhH E. coli</i>	906	ALDO	
ALDR	<i>FucO E. coli</i>	1149	ALDR	Esse trabalho

Fonte: Elaboração própria (2022).

5.2 Transformação de *K. phaffii* com as enzimas da via de produção de EG

5.2.1 Transformação de *K. phaffii* com o plasmídeo pKLD_XD

Uma vez identificadas, as sequências de nucleotídeos dos genes codificantes para a enzima XD foram otimizadas para expressão em *K. phaffii* e sintetizadas quimicamente pela empresa GenOne. Os genes foram então clonados no vetor de expressão constitutivo pKLD nos sítios de restrição de Bam HI e NotI sob o controle do promotor pPGK1 e terminador AOX1, com gene de resistência a geneticina (Tabela 6Tabela). O pKLD foi utilizado para a transformação genética de linhagens *K. phaffii*-X33 expressando XDH previamente construídas pela integração do vetor pGAP-XDH. A integração do vetor pKLD-XD foi direcionada ao *locus* do promotor pPGK1 pela digestão do plasmídeo com a enzima Sac I.

5.2.2 Construção dos vetores para a expressão das enzimas ALDO e ALDR

Os genes referentes às enzimas da segunda etapa da via de conversão de xilose em etileno glicol, dihidro-deoxi-xilonato aldolase (ALDO) e aldeído redutase (ALDR), foram sintetizados em módulo (MOD_1). Ambos são oriundos da bactéria *E. coli*; o gene codificante para a enzima ALDO (*yjhH*) foi caracterizado por Liu *et al.*, (2013b) e o gene que expressa a enzima ALDR (*FucO*) foi caracterizado por Alkim *et al.*, (2015) e apresentam as características dispostas na Tabela 15. O MOD_1 foi construído no

plasmídeo comercial pBSK-MOD_1, e cada gene possui um promotor e um terminador específico. O gene *YjhH*, que codifica para a enzima ALDO, sob o controle do promotor pTEF e terminador CYC1 (Tabela 6) e o segundo gene, *FucO*, que codifica para a enzima ALDR, foi sintetizado e clonado sob o controle do promotor pMH3 e do terminador TDH3 (Tabela 6).

Para expressão das enzimas ALDO e ALDR em *K. phaffii*, o MOD_1 foi clonado no plasmídeo episomal B3-036. Para a construção do vetor de expressão os passos seguintes foram realizados: i) digestão do plasmídeo B3-036 com as enzimas de restrição Xho I e Sac I, o que resultou na liberação de 3 fragmentos de DNA. Dois fragmentos com aproximadamente 2000 pb e um fragmento maior com 4262 pb; ii) purificação e circularização do fragmento maior (4262 pb), formando novamente o plasmídeo B3-036, com o gene que confere resistência a higromicina (*hphR*) e a origem de replicação pUC Ori, preservados (Figura 9) ; ii) O plasmídeo circularizado foi digerido com a enzima de restrição Bam HI (Figura 10) e ligado ao cassete de expressão MOD_1, que foi digerido do plasmídeo pBSK também com Bam HI (Figura 11) ; iv) o vetor resultante da ligação foi chamado de pB3Hyg_MOD_1 (Figura 12).

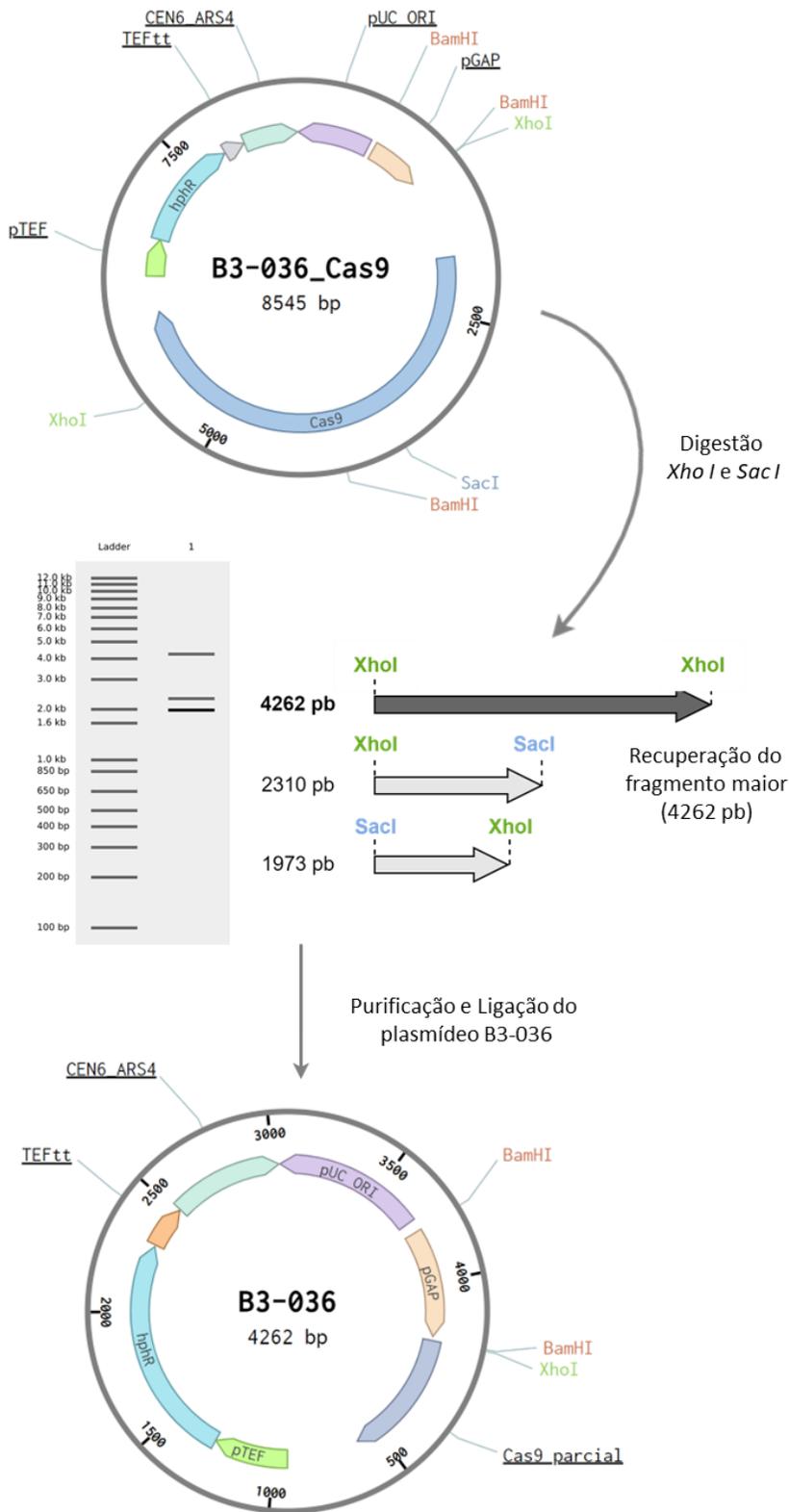


Figura 9 - Esquema da estratégia de montagem do plasmídeo B3-036 para expressão heteróloga em *K. phaffii*.

Digestão do plasmídeo B3-036_Cas9 com as enzimas de restrição *Xho I* e *Sac I*. Liberação de 3 fragmentos, dois menores de 2310 e 1973 pb, e um maior de 4262 pb. Purificação do fragmento maior (4262 pb), purificação e ligação do fragmento recuperado dando origem ao plasmídeo B3-036 sem o gene codificante para Cas9.

Fonte: Elaboração própria (2022).

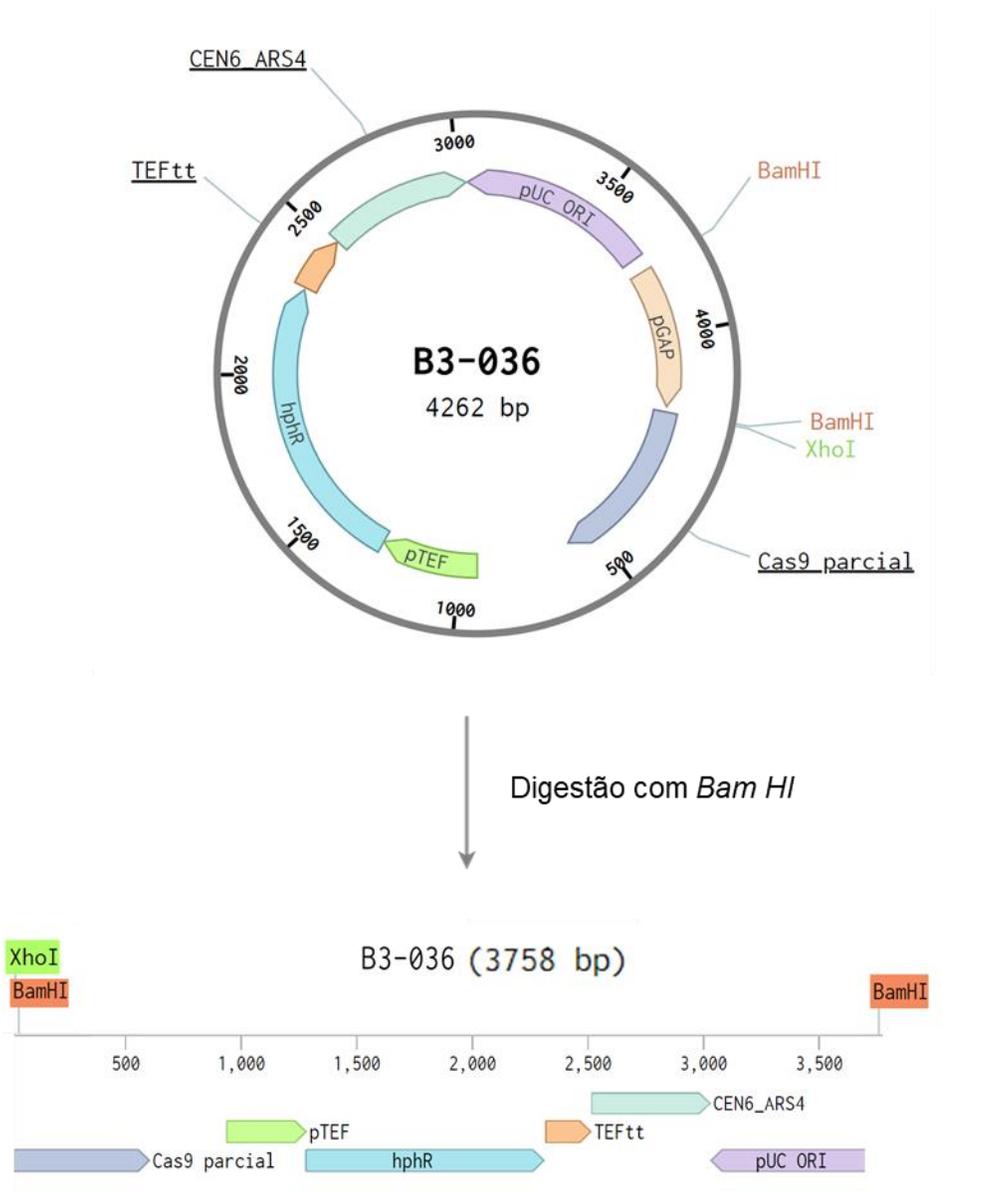


Figura 10 - Esquema da montagem do plasmídeo pBSK-MOD_1. O plasmídeo B3-036 foi digerido com *Bam HI*, liberando fragmento de 504 pb correspondente ao promotor GAP e o restante do plasmídeo (3758 pb). O plasmídeo foi purificado e ligado ao módulo 1, previamente digerido com *Bam HI*.
Fonte: Elaboração própria (2022).

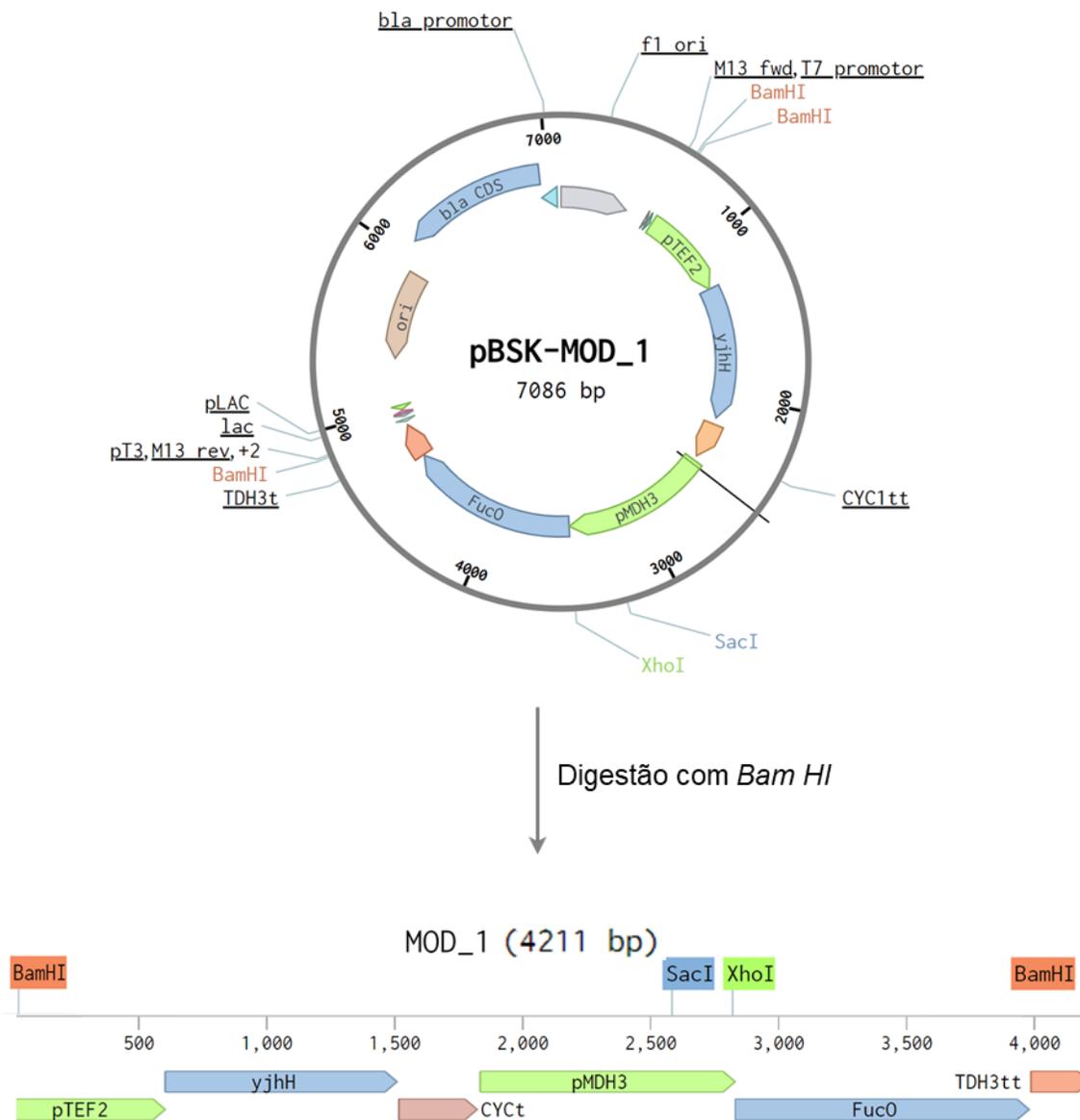


Figura 11 - Esquema da digestão do plasmídeo pBSK-MOD_1 com a enzima de restrição *Bam* HI, liberando o MOD_1 (4211 pb), e o restante do plasmídeo contendo 2875 pb. O MOD_1 foi purificado e ligado ao plasmídeo B3-036, após a digestão com *Bam* HI para retirada do promotor GAP.
 Fonte: Elaboração própria (2022).

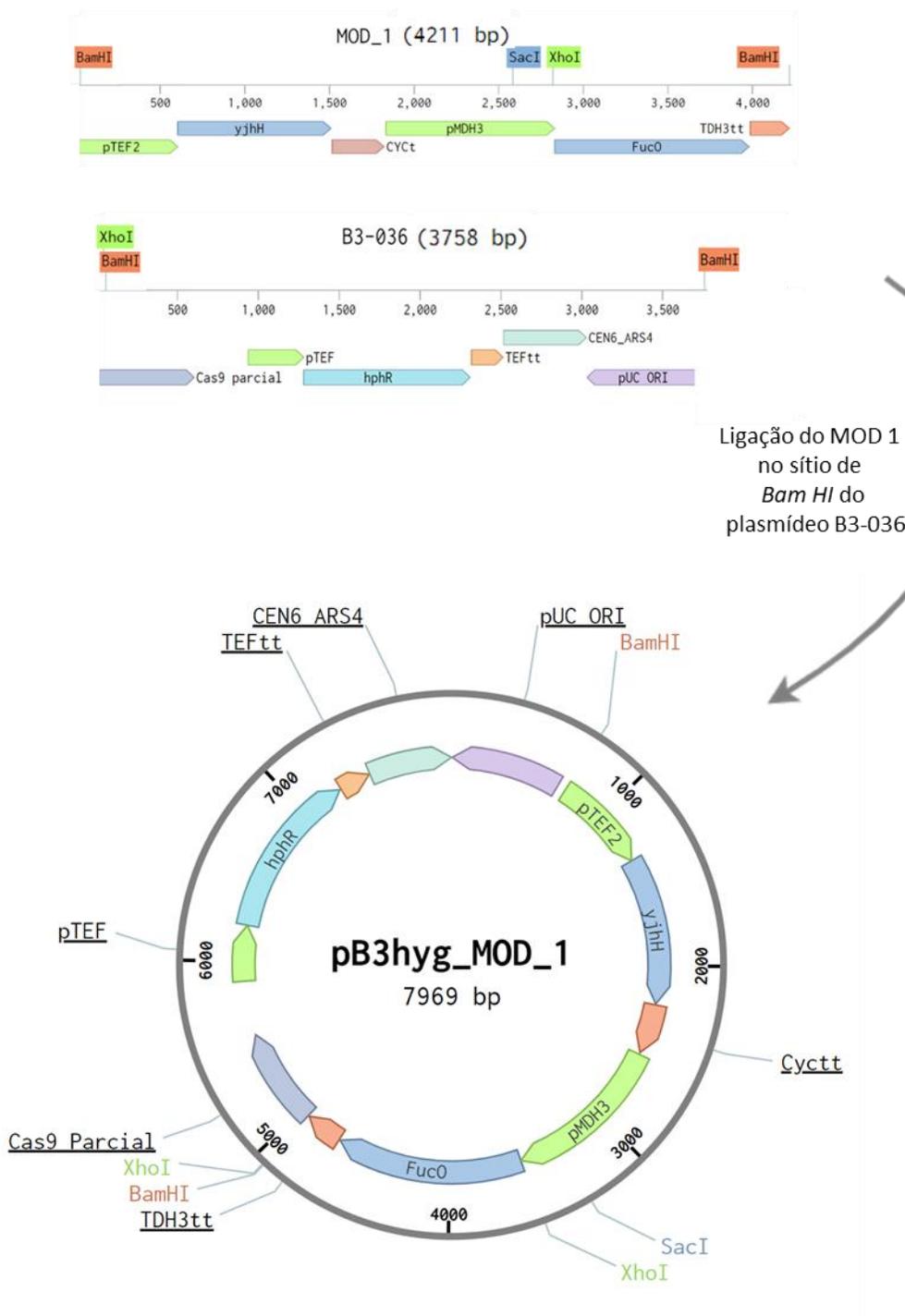


Figura 12 - Ligação do MOD 1 no sítio de *Bam* HI do plasmídeo B3-036. Formando o plasmídeo pB3Hyg_MOD_1 para expressão heteróloga em *K. phaffii*.
Fonte: Elaboração própria (2022).

5.3 Construção de linhagens expressando XDH e XD

As linhagens de *K. phaffii* (P2BS6, P1HL2, AM1, MN9) foram transformadas geneticamente com o plasmídeo integrativo pKLD_XD contendo o cassete de expressão para a enzima xilonato desidratase (XD). Sendo assim, cada uma das quatro linhagens de *K. phaffii*_XDH (P2BS6, P1HL2, AM1, MN9), foi transformada com os cinco plasmídeos contendo o gene codificante para a enzima XD (pKLD_XD: XyD, YG, AM, BS, HL), totalizando 20 linhagens diferentes com combinações enzimáticas XDH+XD distintas.

Para confirmar os clones positivos dessa transformação, foram feitas reações de PCR de colônia com os oligonucleotídeos AOX3(R) e PGK-D7(F), os mesmos anelam especificamente na região final (D7) do promotor pPGK1 e na região AOX3 do terminador AOX. Caso a transformação seja positiva, a PCR resulta na amplificação de um fragmento de aproximadamente 2.2 kb. A Figura 13 é um exemplo do resultado das eletroforeses em gel de agarose feitas após as reações de PCR, e demonstra a amplificação dos fragmentos de tamanho esperado para os clones positivos. O tamanho do gene codificante para as diferentes XDs variam muito pouco: pKLD_XyD (2179 pb), pKLD_YG (2371 pb), pKLD_AM (2182 pb), pKLD_BS (2188 pb), pKLD_HL (2206 pb). Quase todas as linhagens transformadas tiveram os fragmentos gênicos referentes ao plasmídeo pKLD_XD amplificadas corretamente através da PCR de colônia, como pode ser observado na Figura 13. Confirmando, assim, a integração do vetor de expressão contendo o gene da enzima XD nas linhagens de *K. phaffii* P2BS6, P1HL2, AM1, MN9 (linhagens que já possuem a enzima XDH integrada). Além das linhagens transformadas com o vetor contendo o cassete de expressão (pKLD_XD), as linhagens também foram transformadas com o plasmídeo pKLD_vazio (Figura 13), as quais também obtiveram os fragmentos gênicos amplificados corretamente apresentando bandas no tamanho esperado de 393 pb. Como pode ser observado, conforme esperado, o controle negativo (C-) não apresentou banda em nenhum dos experimentos (Figura 13).

No total, foram obtidos 89 clones de linhagens de *K. phaffii* expressando XDH + XD, além de 12 clones transformados com o pKLD sem o inserto, os quais foram usados como controle negativo nos próximos experimentos. A Tabela 16, apresenta um resumo

de todas os 101 clones obtidos após a transformação e confirmação por PCR. Para facilitar o entendimento das construções, o fenótipo das linhagens construídas até o momento, está esquematizado na Figura 14.

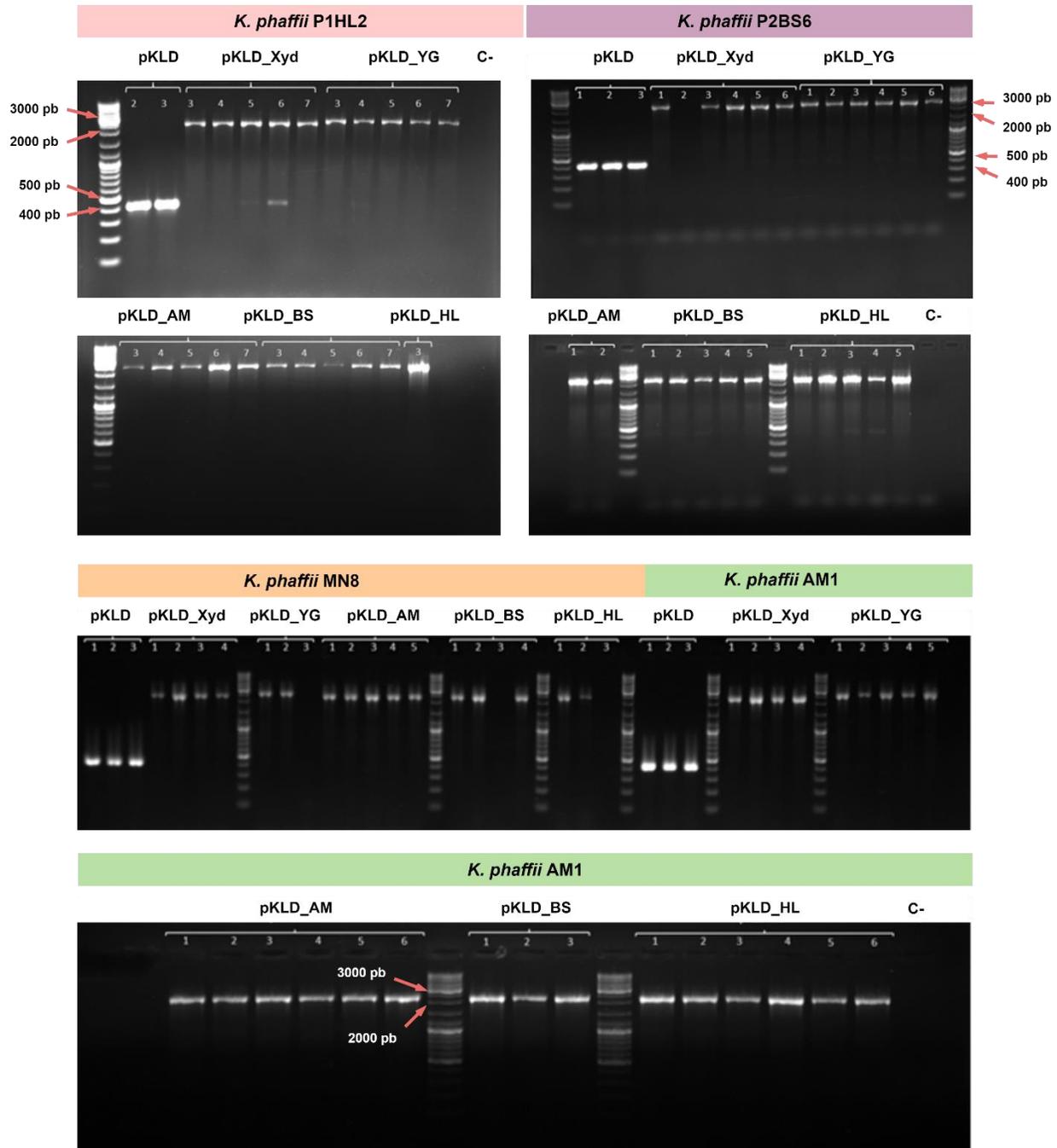


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% referente às reações de PCR de colônia realizadas após a transformação genética das leveduras *K. phaffii* (P2BS6, P1HL2, AM1, MN9) com pKLD_XDs (XyD, YG, AM, BS, HL). Os fragmentos de DNA foram amplificados, com os oligonucleotídeos PGK-D7 e AOX3'. O marcador utilizado foi o GeneRuler Ladder Mix (Thermo Scientific).
Fonte: Elaboração própria (2022).

Tabela 16 - Lista de clones e linhagens *K. phaffii* transformadas geneticamente com o plasmídeo pKLD_XD.e confirmadas por PCR de colônia

(Continua)

Nº de clones confirmados	Genótipo principal	Fenótipo principal
6	pGAPZB_ <i>xyIB-AM</i> + pKLD_ <i>xyID-am</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-AM+XD-AM
3	pGAPZB_ <i>xyIB-AM</i> + pKLD_ <i>xyID-bs</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XD- AM+XD-BS
6	pGAPZB_ <i>xyIB-AM</i> + pKLD_ <i>xyID-hl</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XD-AM+XD-HL
5	pGAPZB_ <i>xyIB-AM</i> + pKLD_ <i>xyID-YhjG</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-AM+XD-YG
4	pGAPZB_ <i>xyIB-AM</i> + pKLD_ <i>xyID-XyID</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-AM+XD-XYD
2	pGAPZB_ <i>xyIB-BS</i> + pKLD_ <i>xyID-am</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-BS+XD-AM
5	pGAPZB_ <i>xyIB-BS</i> + pKLD_ <i>xyID-bs</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-BS+XD-BS
5	pGAPZB_ <i>xyIB-BS</i> + pKLD_ <i>xyID-hl</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-BS+XD-HL
6	pGAPZB_ <i>xyIB-BS</i> + pKLD_ <i>xyID-YhjG</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-BS+XD-YG
5	pGAPZB_ <i>xyIB-BS</i> + pKLD_ <i>xyID-XyID</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-BS+XD-XYD
6	pGAPZB_ <i>xyIB-HL</i> + pKLD_ <i>xyID-am</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-HL+XD-AM
7	pGAPZB_ <i>xyIB-HL</i> + pKLD_ <i>xyID-bs</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-HL+XD-BS
3	pGAPZB_ <i>xyIB-HL</i> + pKLD_ <i>xyID-hl</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-HL+XD-HL
5	pGAPZB_ <i>xyIB-HL</i> + pKLD_ <i>xyID-YhjG</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-HL+XD-YG
5	pGAPZB_ <i>xyIB-HL</i> + pKLD_ <i>xyID-XyID</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-HL+XD-XYD

Tabela 16 - Lista de clones e linhagens *K. phaffii* transformadas geneticamente com o plasmídeo pKLD_XD.e confirmadas por PCR de colônia

(Conclusão)

Nº de clones confirmados	Genótipo principal	Fenótipo principal
5	pGAPZB_ <i>xyIB-MN</i> + pKLD_ <i>xyID-am</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-MN+XD-AM
3	pGAPZB_ <i>xyIB-MN</i> + pKLD_ <i>xyID-bs</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-MN+XD-BS
2	pGAPZB_ <i>xyIB-MN</i> + pKLD_ <i>xyID-hl</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-MN+XD-HL
2	pGAPZB_ <i>xyIB-MN</i> + pKLD_ <i>xyID-YhjG</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-MN+XD-YG
4	pGAPZB_ <i>xyIB-MN</i> + pKLD_ <i>xyID-XyID</i>	Zeo ^R + Gen ^R , XDH-MN+XD-XYD
Controles		
3	pGAPZB_ <i>xyIB-AM</i> + pKLD_ <i>vazio</i>	Zeo ^R XDH-AM
3	pGAPZB_ <i>xyIB-BS</i> + pKLD_ <i>vazio</i>	Zeo ^R XDH-BS
3	pGAPZB_ <i>xyIB-HL</i> + pKLD_ <i>vazio</i>	Zeo ^R XDH-HL
3	pGAPZB_ <i>xyIB-MN</i> + pKLD_ <i>vazio</i>	Zeo ^R XDH-MN

Fonte: Elaboração própria (2022).

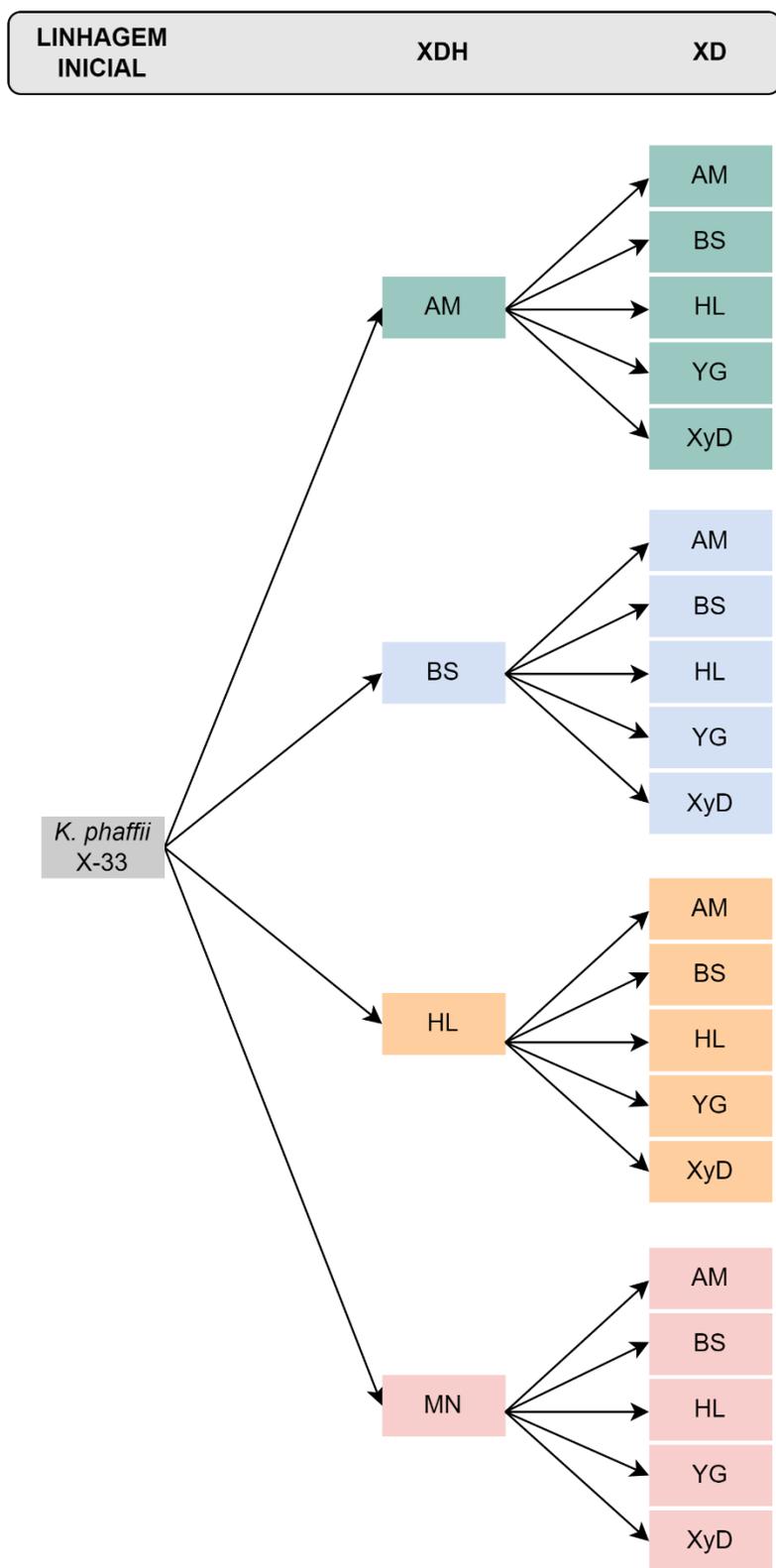


Figura 14 - Esquema representativo das linhagens de *K. phaffii* construídas com as enzimas XDH e XD. Ao todo, 20 linhagens foram construídas, com diferentes combinações enzimáticas.

Fonte: Elaboração própria (2022).

5.4 Validação da funcionalidade das possíveis novas XD

A fim de validar a funcionalidade da primeira etapa da via de produção de etileno glicol, as linhagens de *K. phaffii* expressando as enzimas XDH e XD, confirmados por PCR de colônia, foram avaliadas quanto à capacidade de converter xilose a ácido xilônico (através da expressão da enzima XDH), e posterior desidratação do ácido xilônico a 2-ceto-3-deoxi-D-xilonato (KDX) (realizada pela atividade da enzima XD).

Vale ressaltar que os sobrenadantes escolhidos para as análises em LC-MS foram apenas do cultivo das linhagens controle (*K. phaffii* X-33 sem as enzimas da via e *K. phaffii* expressando apenas a enzima XDH_HL) e a linhagem *K. phaffii* expressando XDH_HL e XD_XyD. Essa escolha foi feita por dois motivos: i) a XDH_HL demonstrou maior atividade catalítica na conversão de xilose a ácido xilônico em estudos prévios. Portanto, a análise qualitativa da presença de ácido xilônico seria mais eficaz; ii) a enzima XD_XyD é uma das xilonato desidratases utilizada como controle neste trabalho, possuindo sua atividade de conversão de ácido xilônico em KDX comprovada em *S. cerevisiae* - o que também poderia proporcionar uma chance maior de detecção de KDX nas análises em LC-MS.

As leveduras foram inoculadas em meio YPDX (40 g/L xilose e 20 g/L de glicose) para avaliação de crescimento e produção de metabólitos. Todas as linhagens foram capazes de crescer no meio de cultura, mas a produção de KDX não pôde ser analisada por meio de UHPLC. O composto intermediário da via de produção de EG, KDX, não possui uma metodologia bem estabelecida para análise em cromatografia líquida. Portanto, para identificar a produção dos metabólitos alvo - xilonato e 2-keto-3-deoxi-xilonato - foram feitas análises em cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS).

Um clone de *K. phaffii* expressando as enzimas XDH_HL e XD_XyD, mais os dois controles negativos (um clone de *K. phaffii* X-33 sem as enzimas da via de EG, e um de *K. phaffii* expressando apenas a enzima XDH_HL) foram analisadas por LC-MS. As análises qualitativas em LC-MS demonstraram a presença de ácido xilônico nos sobrenadantes fermentativos das leveduras transformadas com a primeira enzima da via (XDH) e com as duas primeiras enzimas da via (XDH + XD) (Figura 15). Além do ácido

xilônico, a possível presença do composto intermediário (KDX) também foi detectada, e ocorreu apenas na levedura transformada com as duas enzimas da via (XDH + XD) -, como era esperado, já que a conversão de ácido xilônico a KDX é catalisada pela enzima XD. Nenhum dos dois compostos foi detectado na linhagem controle X-33. Dessa forma, foi possível confirmar a funcionalidade das XDs HL e controle XyD em *K. phaffii*.

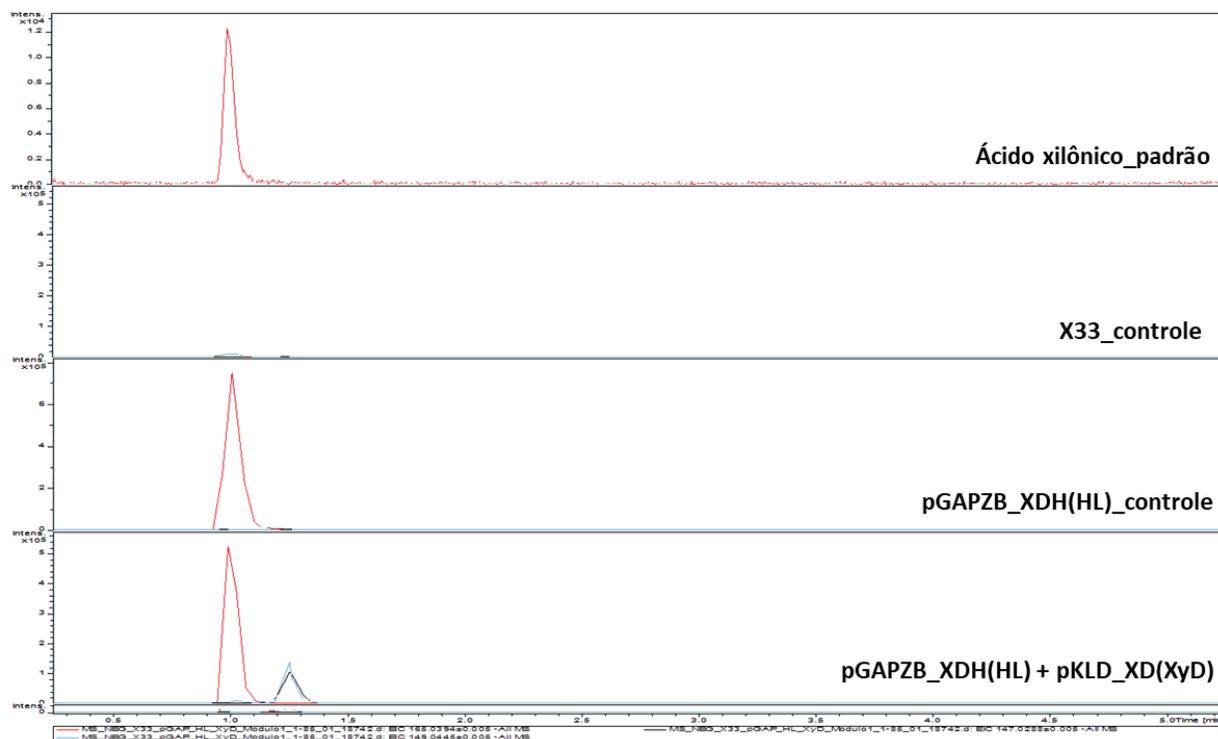


Figura 15 - Cromatogramas referentes a análises qualitativas em cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS), referente às amostras de fermentação das linhagens *K. phaffii* expressando as enzimas XDH_HL e XDH_HL + XD_XYD e a linhagem *K. phaffii* X-33 sem as enzimas da via de EG. Ácido xilônico está representado pela linha vermelha, 2-ceto-3-deoxi-D-xilonato pela linha preta, e xilitol pela linha azul.

Fonte: Elaboração própria (2022).

5.5 Transformação de linhagens de *K. phaffii* com a via completa de produção de EG

Após a comprovação da funcionalidade da enzima XD_HL na análise anterior, inferiu-se que a construção de todas as linhagens com enzimas XD estava correta. Portanto, passou-se à construção da via metabólica completa para a produção de EG. Como foram obtidos 89 clones de 20 diferentes construções de XDH + XD, optou-se por afunilar as linhagens a serem analisadas nas etapas seguintes. Com isso, o módulo de expressão das últimas duas enzimas da via de EG (ALDO e ALDR) foi clonado apenas nas 5 linhagens *K. phaffii* expressando XDH_HL e as diferentes XDs, como demonstrado na Figura 16.

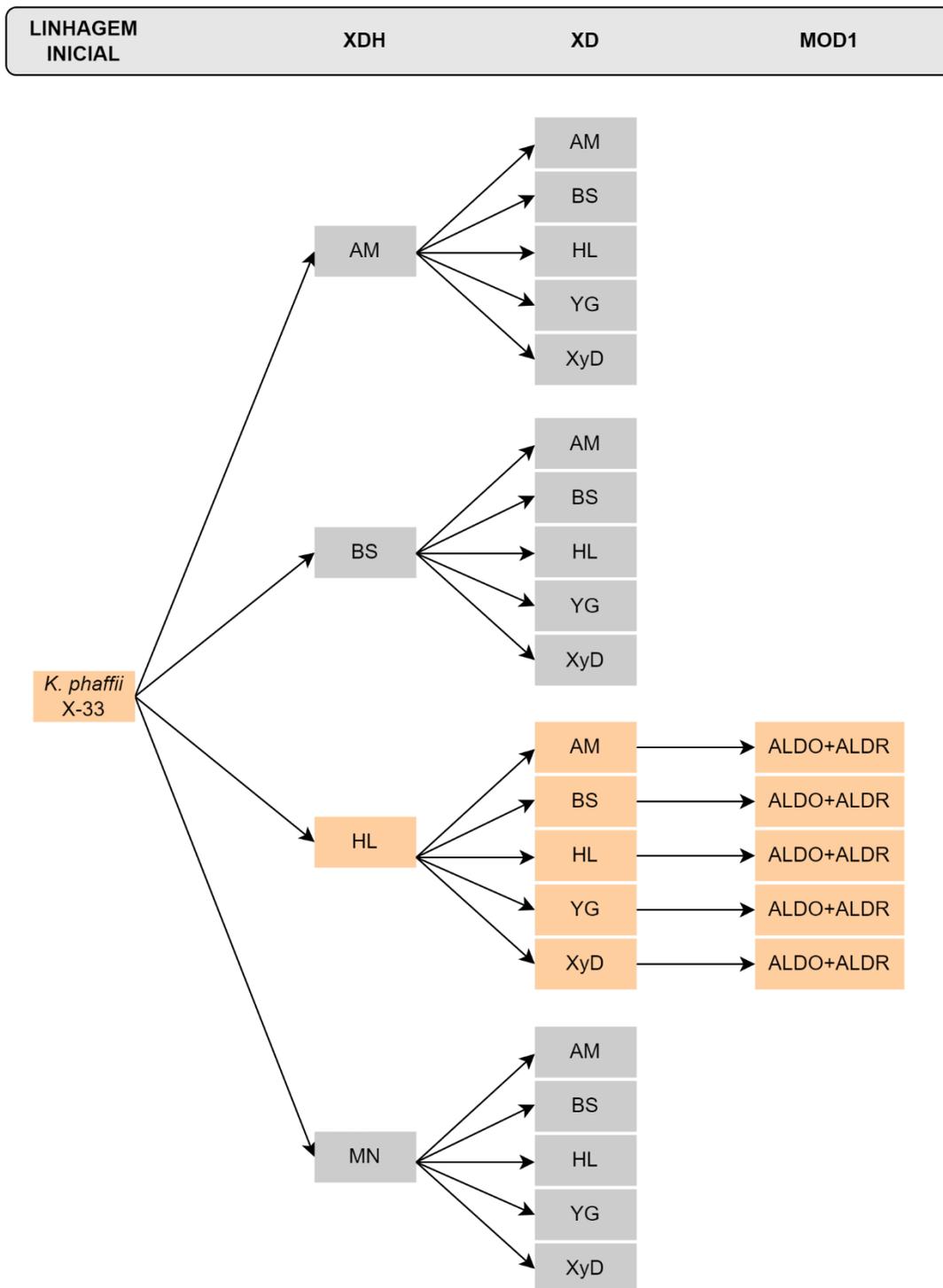


Figura 16 - Esquema das linhagens *K. phaffii* escolhidas para expressão heteróloga da via completa de produção de EG. Destacando apenas *K. phaffii* X-33 + XDH_HL + 5 diferentes XDs + MOD1 (ALDO e ALDR).

Fonte: Elaboração própria (2022).

O plasmídeo pB3Hyg_MOD1 (Figura 12) foi inserido nas linhagens de *K. phaffii* XDH_HL + XDs para expressão das enzimas ALDO e ALDR. Após a transformação, as células foram inoculadas em placas de Petri contendo meio seletivo (YPD + antibióticos). Após o surgimento de colônias, 5 clones para cada transformação foram selecionados e analisados por PCR de colônia para verificação da inserção correta dos plasmídeos nas leveduras.

Não foi possível verificar bandas positivas em experimento de eletroforese em gel de agarose realizado após a PCR de colônia (resultado não mostrado). Como o plasmídeo pB3Hyg_MOD_1 é episossomal, no lugar da PCR de colônia, foi realizada uma extração dos plasmídeos pB3Hyg_MOD_1 da levedura *K. phaffii* recém transformada a fim de verificar se as linhagens continham o plasmídeo com os genes desejados. A partir dos DNAs plasmidiais purificados, foi feita uma reação de PCR com os oligonucleotídeos Puc Ori (564 B3-036) F e Cyt R os quais anelam na origem de replicação (Puc Ori) e no terminador Cyc1 do primeiro gene do módulo 1 (ALDO). O produto esperado da amplificação é de aproximadamente 1933 pb (Figura 17).

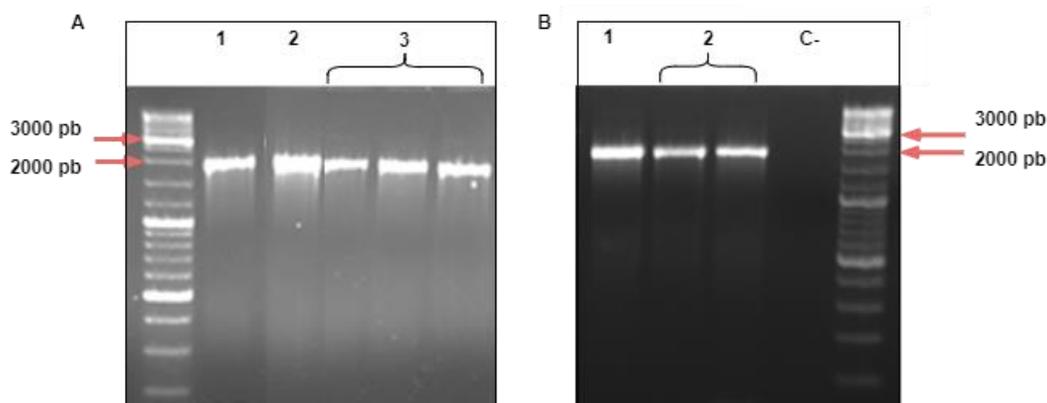


Figura 17 - Gel de agarose 0.8% referente à reação de PCR realizada após a extração do DNA plasmidial pB3Hyg_MOD_1 das leveduras *K. phaffii* pGAPZB_XDH_HL+ pKLD_XDs (XyD, YG, AM, BS, HL); mostrando fragmentos de DNA amplificados, com os oligonucleotídeos Puc Ori (564 B3-036) e Cyt, nos tamanhos esperados de 1933 pb, o marcador utilizado foi GeneRuler Ladder Mix, Thermo Scientific. *K. phaffii* expressando a enzima XDH_HL + A) 1 -pKLD_vazio + pB3Hyg_MOD_1; 2- XD_AM + MOD_1; 3 - XD_BS + MOD_1; B) 1- XD_AM + MOD_1; 2- XD_BS + MOD_1; C- Controle negativo (água)
 Fonte: Elaboração própria (2022).

Foram obtidos clones positivos referentes a todas as linhagens transformadas de *K. phaffii*. Assim, as transformações resultaram em 5 linhagens recombinantes de *K. phaffii* expressando todas as enzimas da via de produção de etileno glicol. Todas as linhagens expressam a enzima XDH_HL, mas contam com diferentes combinações de XD. Para facilitar a nomenclatura, o clone 1 de cada uma das novas linhagens expressando a via completa de EG foram selecionados para continuar os testes experimentais e renomeadas, e estão descritas na Tabela 17. O resultado da combinação de todas as transformações está demonstrado na Tabela 17 e na Figura 18.

Tabela 17 - Lista de linhagens *K. phaffii* transformadas geneticamente com a via completa de produção de etileno glicol

Linhagem	Genótipo principal	Fenótipo principal
JA120	pGAPZB(XDH)_ <i>xyIB-HL</i> +pKLD(XD)_ <i>am</i> + pB3Hyg_MOD1_ <i>yjhH+fucO</i>	Zeo ^R + Gen ^R + Hyg ^R , XDH+XD+ALDO+ALDR
JA121	pGAPZB(XDH)_ <i>xyIB-HL</i> +pKLD(XD)_ <i>bs</i> + pB3Hyg_MOD1_ <i>yjhH+fucO</i>	Zeo ^R + Gen ^R + Hyg ^R , XDH+XD+ALDO+ALDR
JA122	pGAPZB(XDH)_ <i>xyIB-HL</i> +pKLD(XD)_ <i>hl</i> + pB3Hyg_MOD1_ <i>yjhH+fucO</i>	Zeo ^R + Gen ^R + Hyg ^R , XDH+XD+ALDO+ALDR
JA123	pGAPZB(XDH)_ <i>xyIB-HL</i> +pKLD(XD)_ <i>YhjG</i> + pB3Hyg_MOD1_ <i>yjhH+fucO</i>	Zeo ^R + Gen ^R + Hyg ^R , XDH+XD+ALDO+ALDR
JA124	pGAPZB(XDH)_ <i>xyIB-HL</i> +pKLD(XD)_ <i>XyID</i> + pB3Hyg_MOD1_ <i>yjhH+fucO</i>	Zeo ^R + Gen ^R + Hyg ^R , XDH+XD+ALDO+ALDR
Linhagens controle		
JA125	pGAPZB(XDH)_ <i>xyIB-HL</i> +pKLD_ <i>vazio</i> + pB3Hyg_MOD1_ <i>yjhH+fucO</i>	Zeo ^R + Gen ^R + Hyg ^R , XDH+ALDO+ALDR
JA126	pGAPZB(XDH)_ <i>xyIB-HL</i> +pKLD_ <i>vazio</i> + pB3Hyg_ <i>vazio</i>	Zeo ^R + Gen ^R + Hyg ^R , XDH

Fonte: Elaboração própria (2022).

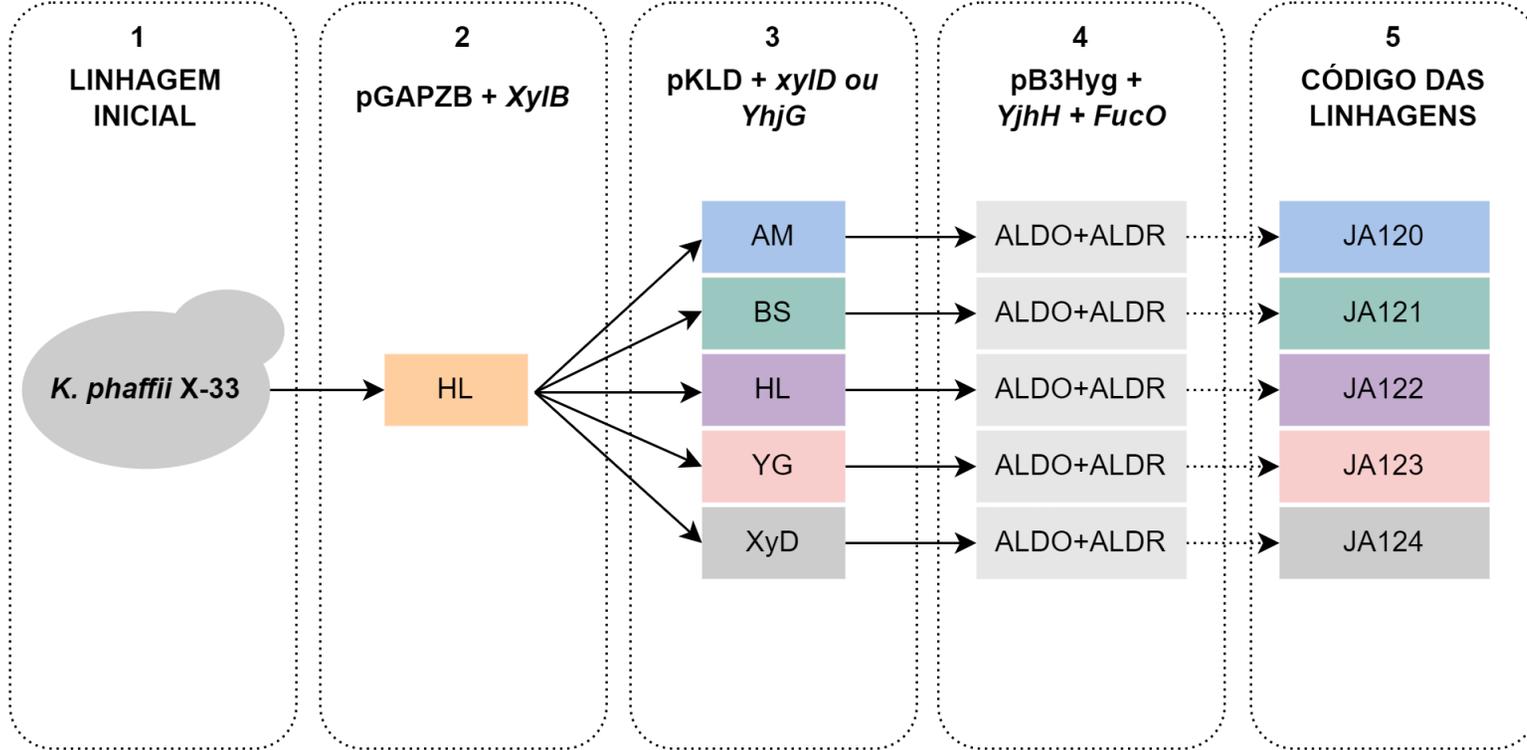


Figura 18 - Esquema das etapas de construção das linhagens heterólogas de *K. phaffii* expressando a via completa de produção de EG.
 1) Linhagem inicial utilizada, *K. phaffii* X-33; 2) clonagem do vetor de expressão pGAPZB carregando o gene *XylB* codificante para a enzima XDH_HL, na linhagem; 3) clonagem do vetor de expressão pKLD carregando os genes codificantes para as enzimas XDs, transformação realizada nas linhagens previamente transformadas com XDH_HL; 3) cada linhagem expressando os genes XDH_HL e as 5 diferentes XDs foram transformadas com o plasmídeo pB3Hyg_MOD1 carregando o cassete de expressão dos genes *YjhH* e *FucO*, codificantes para as enzimas ALDO e ALDR, respectivamente; 5) novas linhagens construídas expressando a via completa de produção de EG.
 Fonte: Elaboração própria (2023).

5.6 Verificação da funcionalidade da via metabólica de produção de etileno glicol

Posteriormente à confirmação da transformação celular de *K. phaffii* com a via completa de produção de EG, as 5 linhagens que se diferenciam pela expressão da enzima XD (JA120, JA121, JA122, JA123 e JA124), além de 2 controles negativos (uma linhagem expressando apenas a enzima XDH_HL e com o plasmídeo pKLD_vazio (*K. phaffii* JA125), e uma linhagem expressando apenas a XDH_HL, com o pKLD e o pB3Hyg vazios (*K. phaffii* JA126) (Tabela 17), foram avaliadas quanto à capacidade de produção de EG. Para tanto, as linhagens foram inoculadas em meio YPD_X (40 g/L xilose 2 g/L de glicose) e amostras foram retiradas em intervalos regulares de tempo. Após 24 h de fermentação, todas as linhagens, exceto os controles negativos, produziram etileno glicol (EG) (Figura 19A). A linhagem JA122 se destacou, produzindo em média 0,79 g/L de EG em 24 horas. Essa produção foi significativamente maior do que a produção de EG da linhagem JA124 que contém uma das XDs controles, a qual produziu cerca de 0,61 g/L.

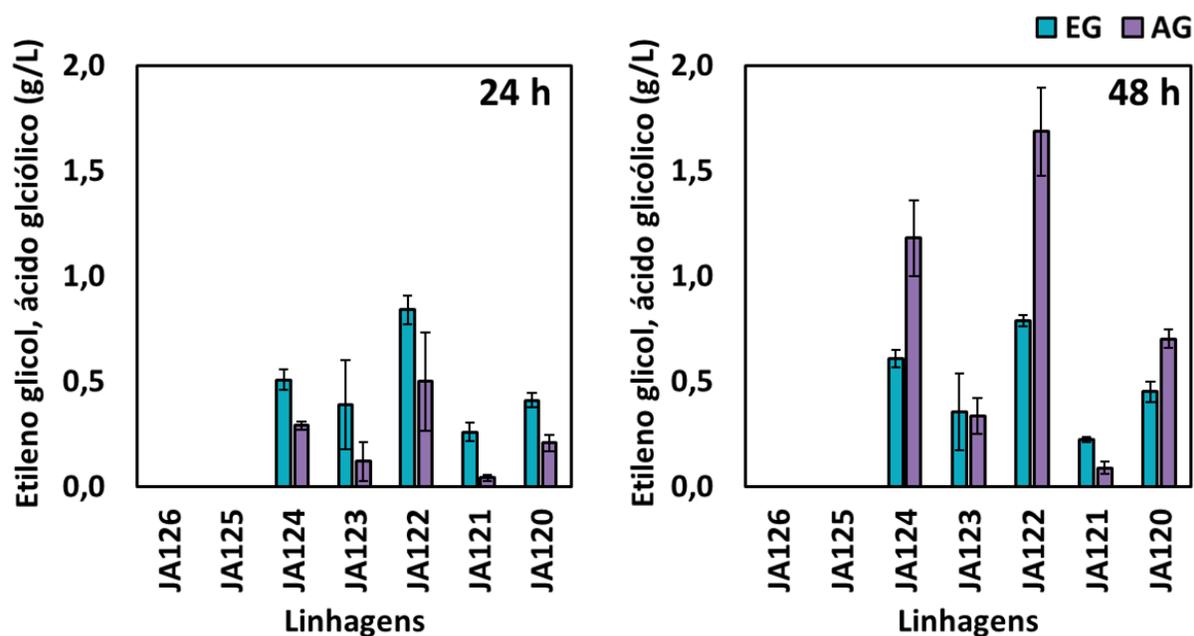


Figura 19 - Produção de AG e EG em (A) 24 h e (B) 48 h de fermentação, realizada pelas linhagens recombinantes de *K. phaffii* (JA120, JA121, JA122, JA123 e JA124), expressando a via completa de produção de EG (Todas as leveduras expressam XDH, XD, ALDO E ALDR, e se diferenciam pela XD expressa), e os controles negativos (JA125 e JA126), em triplicata.

Fonte: Elaboração própria (2022).

Após as 48 h de fermentação (Figura 19B), as linhagens com as XD controle (JA123 e JA124) produziram em média 0,35 e 0,61 g/L de EG, respectivamente, enquanto a maior produção média de EG continuou sendo a da linhagem JA122 (0,79 g/L), que produziu 23% a mais de EG do que a linhagem controle JA124 (0,61 g/L), ao final da fermentação (48 h) (Tabela 18).

Tabela 18 - Consumo de substrato e produção de metabólitos (g/L) em 48 h de fermentação realizada pelas linhagens recombinantes de *K. phaffii* expressando a via completa de EG, em meio YPDX. Todas as leveduras expressam XDH, XD, ALDO E ALDR, e se diferenciam pela XD

Linagem	XD	Xilose inicial	Prod. EG	Prod. AG	Prod. AX ¹	Prod. biomassa
JA125	-	39,87 ± 0,41	n.d.	n.d.	11,08±0,33	8,44 ± 0,30
JA126	-	39,6 ± 0,31	n.d.	n.d.	9,44 ± 1,16	8,60 ± 0,40
JA124	<i>xyID</i>	39,88 ± 0,33	0,61 ± 0,02	1,18 ± 0,09	8,94 ± 0,28	10,01 ± 0,30
JA123	<i>YhjG</i>	40,06 ± 0,17	0,35 ± 0,09	0,34 ± 0,04	10,01 ± 0,38	9,60 ± 0,11
JA120	<i>XylD-am</i>	39,93 ± 0,13	0,45 ± 0,02	0,70 ± 0,02	8,66 ± 0,14	10,06 ± 0,27
JA121	<i>XylD-bs</i>	40,22 ± 0,28	0,23 ± 0,01	0,09 ± 0,01	9,60 ± 0,79	8,85 ± 0,49
JA122	<i>XylD-hl</i>	41,98 ± 0,30	0,79 ± 0,01	1,69 ± 0,11	10,99 ± 0,11	10,19 ± 0,19

n.d. não detectado

¹ valor estimado a partir da subtração do valor bruto de xilose

Fonte: Elaboração própria (2022).

A linhagem que mais produziu EG expressa uma das isoenzimas caracterizadas neste trabalho, a enzima XD_HL. Essa linhagem (JA122) produziu em 48 h de fermentação, 55% e 23% a mais de EG em comparação com as linhagens JA123 e JA124, respectivamente, que expressam as enzimas xilonato desidratases já publicadas na literatura *XylD* e *YhjG*.

Apesar das baixas concentrações de EG, os dados mostram a funcionalidade em *K. phaffii* da via sintética implementada neste trabalho. Até o momento, a produção de EG a partir da via de Dahms só foi avaliada em *E. coli* (Alkim *et al.*, 2015; Cabulong *et al.*, 2017a; Liu *et al.*, 2013b), *S. cerevisiae* (Salusjärvi *et al.*, 2017) e, mais recentemente, em *E. cloacae* (Zhang *et al.*, 2020).

Neste experimento, todas as leveduras expressando as enzimas XD produziram mais EG do que AG em 24 h (Figura 19A). As linhagens JA122 e JA124 também foram as maiores produtoras de AG, produzindo respectivamente 0,50 e 0,29 g/L em 24 h e 1,69 e 1,18 g/L em 48 h. A produção de AG é realizada através de uma enzima aldeído desidrogenase, que converte glicaldeído em AG, criando uma rota competitiva à produção de final de EG. A maioria dos trabalhos publicados relatam o desvio da rota metabólica de EG para AG. (Alkim *et al.*, 2015), deletaram o gene endógeno de *E. coli* que codifica para a enzima aldeído desidrogenase (*aldA*) responsável pela conversão de glicaldeído em ácido glicólico, e super-expressaram genes codificantes para aldeído redutases (*qhD*, *GldA* e *FucO*), que converte glicaldeído em EG. A superexpressão do gene *FucO* resultou na melhor linhagem produtora de EG, que atingiu rendimento molar de 0.94 e acúmulo de 20 g/L de EG.

Todas as linhagens apresentaram acúmulo de ácido xilônico, atingindo a produção máxima de 11 g/L desse composto em 48 h de fermentação. Esses dados corroboram com os resultados encontrados em trabalhos publicados que utilizaram a via de Dahms para a produção de EG, AG ou até butanotriol (BTO) (Bañares *et al.*, 2019; Cabulong *et al.*, 2018; Cabulong *et al.*, 2021). Acredita-se que o acúmulo de ácido xilônico se dá devido à baixa atividade das enzimas xilonato desidratase, ou das enzimas de conversão de glicaldeído (*aldA*, *FucO*, *YjhG*) ao produto desejado (Cabulong *et al.*, 2021). Nesse contexto, (Cabulong *et al.*, 2018), utilizou a via de Dahms para produzir AG em *E. coli*, e testou super-expressar o gene codificante para a enzima xilonato

desidratase (*XyID*) para diminuir o acúmulo de ácido xilônico encontrado no trabalho. A priori, não obteve uma diminuição aparente no acúmulo de ácido xilônico. Contudo, quando a enzima aldeído desidrogenase (*AldA*) foi super-expressa em conjunto com *XyID*, o acúmulo de ácido xilônico caiu pela metade, e a produção de ácido glicólico triplicou.

6 CONCLUSÃO

Os genes que compõem a vida sintética de produção de EG foram identificados, os cassetes de expressão foram desenhados *in silico*, otimizados para expressão em *K. phaffii*, e sintetizados. Com isso, foram identificados três novos genes codificantes para as enzimas xilonato desidratase (XD), os quais demonstraram-se funcionais em *K. phaffii*. A funcionalidade *in vivo* das novas enzimas XDs foi comprovada pela produção dos compostos KDX a partir de ácido xilônico. Sendo assim, este trabalho descreve a caracterização de 3 novas enzimas XDs funcionais e 5 novas linhagens recombinantes de *K. phaffii* produtoras de EG. Além da produção de EG, também foi identificada a produção de ácido glicólico. Novas avaliações a respeito do metabolismo de xilose e produção de EG em *K. phaffii* serão realizadas e discutidas no capítulo seguinte.

**CAPÍTULO 2 – Metabolismo de *K. phaffii*: fatores que influenciam a produção de
EG**

7 INTRODUÇÃO

Existem diversos desafios na construção de microrganismos com uma via metabólica sintética, as quais podem limitar a produção do composto desejado. Essas dificuldades podem estar associadas principalmente a técnicas moleculares, engenharia de bioprocessos e detecção de metabólitos (Carneiro *et al.*, 2022). Por se tratar de uma via sintética, alguns compostos intermediários da via e produção de EG são difíceis de serem identificados por metodologias comuns de cromatografia líquida. Visto que, são compostos químicos menos utilizados em bioprocessos. Desta forma, a dificuldade se encontra tanto na detecção do composto (análise qualitativa) quanto em uma estimativa de concentração (análise quantitativa) desse mesmo metabólito.

Neste trabalho, houve a dificuldade de se encontrar uma metodologia que fosse eficaz para a detecção desses metabólitos que tem características de coeluição quando se encontram juntos no sobrenadante da cultura. Como demonstrado no capítulo anterior, apenas análises qualitativas foram possíveis para que houvesse a identificação de composto intermediário KDX, (seção 5.4 Validação da funcionalidade das possíveis novas XD). Neste capítulo, são descritos experimentos com a finalidade de adaptar e definir metodologias analíticas, com base na literatura, para a identificação qualitativa e quantitativa dos compostos da via sintética implementada.

Além da otimização de protocolos analíticos, torna-se essencial a otimização das condições de cultivo para o sucesso de um bioprocessos. Portanto, nesse capítulo, também foram avaliados fatores que afetam a produção de etileno glicol e outros compostos pela linhagem geneticamente modificada. Foram analisados os efeitos da concentração de glicose como cosubstrato fermentativo; existência de vias nativas de conversão de ácido glicólico, etileno glicol e ácido xilônico através do cultivo de *K. phaffii* em meios contendo tais compostos como fonte de carbono principal; efeito do glicolaldeído e glicose em conjunto em condições de cultivo aeróbicos e microaeróbicos. Por fim, a linhagem foi avaliada em biorreatores de bancada, com controle de aeração, pH e temperatura. Perspectivas para futuras otimizações são discutidas.

Parte dos resultados apresentados nesse capítulo foram desenvolvidos no laboratório do Dr. Thomas Walther, no departamento de bioengenharia de bioprocessos

na Technische Universität Dresden (TUD), na Saxônia, durante o período de doutorado sanduíche.

8 MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 Avaliação da produção de EG pelas linhagens transformadas em diferentes condições de cultivo

Todos os processos fermentativos abaixo foram realizados seguindo os mesmos passos iniciais de pré-inóculo descritos a seguir. As linhagens foram recuperadas do estoque em glicerol (30%) e plaqueadas em placas de Petri contendo YP ágar suplementado com 20 g/L de glicose, e antibióticos, quando necessário (100 µg/mL de zeocina, 200 µg/mL de geneticina e 200 µg/mL de higromicina), as placas foram incubadas em estufa (30°C) para crescimento. Após o crescimento em estufa, colônias isoladas foram retiradas das placas e inoculadas em 10 mL de meio YP suplementado com 20 g/L de glicose e antibióticos, quanto necessário (mesmas concentrações descritas acima), em tubos de fundo cônico de 50 mL. Os tubos foram incubados em *shaker* (30°C, 200 rpm) por 48 h, para aumento de densidade celular. Após o período de 48 h, as células foram transferidas para frascos de 1 L contendo 150 mL de meio YP suplementado com 20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose, e antibióticos. Os frascos foram incubados em estufa por 24 h (30°C, 200 rpm). A partir deste ponto, as formas de cultivo para o inóculo vão divergir de acordo com cada objetivo do experimento e serão descritos nas seções a seguir. As análises de peso seco e biomassa foram realizadas como descrito em Materiais e Métodos do Capítulo 1, bem como os meios para os cultivos.

8.2 Efeito de diferentes concentrações de xilose e glicose na produção de EG e AG

O perfil fermentativo da linhagem transformada com a via completa de produção de EG (JA122) e um controle negativo (linhagem X-33) foi analisado em condições de cultivo com diferentes proporções de concentração de substratos e fonte de carbono (xilose e glicose). A DO_{600nm} inicial foi de 5, e as concentrações de xilose e glicose foram (g/L): 1 (20 e 20); 2 (40 e 20); 3 (40 e 10); e 4 (40 e 2). As linhagens foram inoculadas em frascos de 125 mL contendo 20 mL de meio YP suplementado com as concentrações

de açúcares supracitadas e 200 µg/mL de higromicina. O experimento foi realizado em duplicata biológica por 96 h, em shaker (30°C, 200 rpm).

8.3 Glicoaldeído como substrato na produção de EG e AG: enzimas aldeído redutases e aldeído desidrogenases nativas de *K. phaffii*

O perfil fermentativo da linhagem transformada com a via completa da via de EG (JA122) e um controle negativo (linhagem X-33 sem as enzimas da via) foi comparado em meio contendo YP + 20 g/L de glicose + 10 mM de glicoaldeído. **O cultivo foi realizado de duas maneiras diferentes:** i) aeróbica (20 mL de meio em frascos de 125 mL); ii) microaeróbica (20 mL de meio em frascos de 50 mL). O experimento foi realizado em duplicata técnica por 42 h, em shaker (30°C, 200 rpm).

8.4 Comparação entre enzimas aldeído redutases nativas e heterólogas em linhagens de *K. phaffii*

Primeiramente, foram construídas linhagens de *K. phaffii* contendo os genes codificantes para as enzimas XDH, XD e ALDO, sem o gene heterólogo codificante para a enzima ALDR (*fucO*). Cinco novas linhagens foram construídas, a diferença principal entre elas foi a expressão do gene codificante para a enzima XDH (*xyIB-AM*, *xyIB-BS*, *xyIB-HL*, *xyIB-MN*). Os genes que codificam para a enzima XD utilizados foram *xyID* (controle) e *xyID-hl* e gene que codifica para a enzima ALDO foi o *yjhH*. Todas as construções foram feitas como já explicadas nos materiais e métodos do capítulo 1 dessa tese (Materiais e métodos 0). Para a obtenção do plasmídeo contendo apenas o gene ALDO, do módulo 1, o plasmídeo pB3Hyg_MOD_1 foi digerido com a enzima de restrição *Pvu II* (Figura 20) Essa reação de restrição libera dois fragmentos de DNA, um contendo o cassete de expressão completo para a enzima ALDR com 2617 pb e outro contendo o restante do plasmídeo com 5352 pb. Após a restrição, o fragmento maior do plasmídeo foi purificado e transformado em *E. coli* para multiplicação. O novo plasmídeo foi extraído de *E. coli* e um gel de agarose foi feito para confirmação da construção correta. Após a confirmação, o plasmídeo foi denominado pB3Hyg_ALDO (Figura 21) e transformado em linhagens de *K. phaffii* que já carregavam os plasmídeos pGAP_XDH e pKLD_XD.

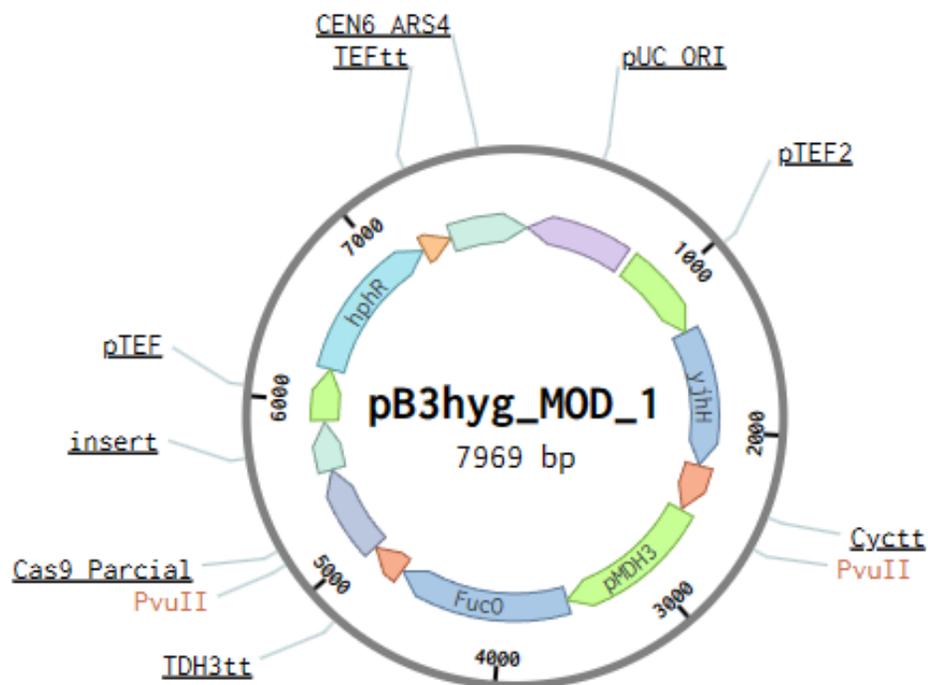


Figura 20 - Mapa do plasmídeo pB3Hyg_MOD_1 com destaque nos sítios de restrição para a enzima *Pvu II*. A enzima *Pvu II* libera o cassete de expressão do gene *FucO*, que expressa a enzima ALDR.
 Fonte: Elaboração própria (2022).

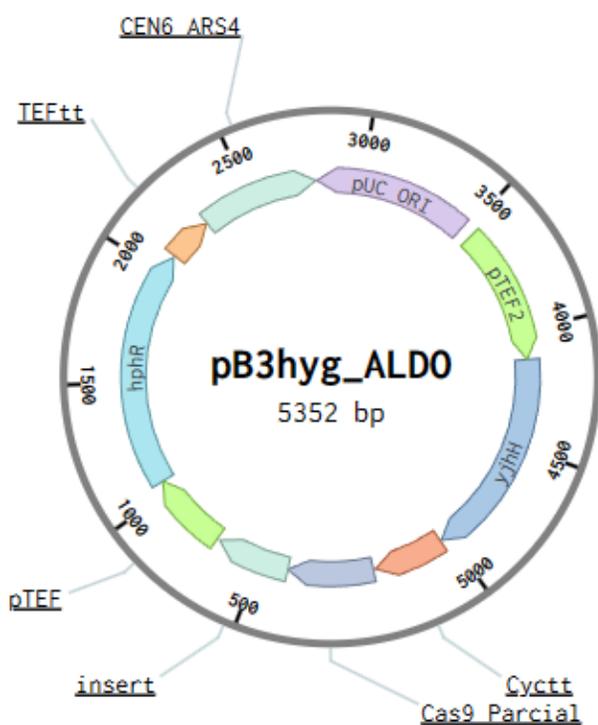


Figura 21 - Plasmídeo pB3Hyg_ALDO após retirada do cassete de expressão do gene *FucO*, codificante para a enzima ALDR.
 Fonte: Elaboração própria (2022).

As novas linhagens construídas com os plasmídeos pGAP_XDH, pKLD_XD e pB3Hyg_ALDO foram avaliadas quanto a sua capacidade de produzir EG a partir de xilose. Os passos iniciais de inóculo foram realizados conforme explicado acima (0). Para o cultivo, as células foram transferidas para frascos de 250 mL de volume, contendo 50 mL de meio YPX (YP + 40 g/L de xilose, 200 µg/mL de higromicina) + 2 g/L de glicose, com DO_{600nm} inicial igualada para aproximadamente 10. O experimento foi realizado em duplicata. As células foram cultivadas por 48 h, alíquotas de 1 mL foram tiradas regularmente para análise de DO_{600nm} e produção de metabólitos em HPLC.

8.5 Metabolismo dos produtos da via metabólica sintética: EG e AG como substrato para fermentação

O perfil fermentativo das linhagens transformadas com a via completa de EG e um controle negativo (linhagem X-33) foi comparado em meio contendo EG ou AG como única fonte de carbono. O inóculo foi feito em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio YP suplementado com 5 g/L de etileno glicol ou 5 g/L de ácido glicólico + antibióticos. O experimento foi realizado em triplicata técnica por 72 h, em shaker (30°C, 200 rpm). Alíquotas de 1 mL foram coletadas regularmente para análise de DO_{600nm} e produção de metabólitos em HPLC.

8.6 Cultivo em frascos para análise quantitativa de metabólitos produzidos por linhagens de *K. phaffii*

Três linhagens de *K. phaffii* foram utilizadas para este cultivo, uma linhagem contendo a via completa de produção de EG e dois controles negativos (*K. phaffii* X-33 e uma linhagem de *K. phaffii* com o plasmídeo pB3Hyg vazio). Inicialmente as células foram inoculadas em tubos de fundo cônico de 50 mL contendo 10 mL de meio YPD suplementado com zeocina, geneticina e higromicina, e incubado em shaker por 48 h a 30°C, 200 rpm. Após o período de crescimento, todo o conteúdo dos tubos foi transferido para um frasco de 500 mL contendo 100 mL de meio YPD suplementado com os mesmos antibióticos listados acima. Em seguida, os frascos foram incubados a 30°C, 200 rpm.

Cerca de 16 h depois, as células foram inoculadas em frascos de 250 mL, com 20 mL de meio YPDX (20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose) com antibióticos para DO_{600nm} inicial de aproximadamente 5. Os frascos foram incubados em shaker a 30°C, 200 rpm por 96 h. Alíquotas de 500 μ L foram retiradas a cada 24 h para leitura avaliar crescimento e análise de metabólitos em HPLC, LC-MS e ensaio colorimétrico. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

8.7 Otimização da análise qualitativa e quantitativa de ácido xilônico e xilose em HPLC e LC-MS

A detecção de ácido xilônico pode ser obtida através de métodos cromatográficos já existentes. Porém, a dificuldade de separar os compostos xilose e ácido xilônico, quando estão disponíveis no mesmo sobrenadante, ainda pode atrapalhar a quantificação correta destes compostos durante o estágio de doutorado sanduíche realizado na Alemanha, alguns cultivos foram feitos para otimizar a análise desses compostos, visto que a necessidade de obter valores mais exatos é de extrema importância para o entendimento do metabolismo das células transformadas de *K. phaffii*.

A identificação qualitativa e quantitativa dos compostos foi realizada em cromatografia líquida de alta performance - HPLC (Ultimate 3000 systems, Dionex, USA), equipado com *autosampler* (Dionex, Sunnyvale, USA) capaz de manter a temperatura das amostras em 6 °C. O HPLC estava acoplado à detector UV/vis (Dionex, Sunnyvale, USA), medindo à 210 nm e um detector RI (ERC RefractoMax 520, Knauer, Alemanha). Além do HPLC, as análises foram em cromatografia líquida (VanquishTM, ThermoFisherTM, USA) acoplada à espectrômetro de massas (Q ExactiveTM Focus orbitrap, ThermoFisherTM, USA). A coluna utilizada em ambos os cromatógrafos para separar os compostos foi RezexTM ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7.8 mm, 8 %, Phenomenex) protegida por uma pré coluna SecurityGuardTM Carbo H⁺ (4 x 3 mm, Phenomenex). Para análise em HPLC uma fase móvel diluída 0.5 mM H₂SO₄ foi utilizada com um fluxo de 0.5 mL.min⁻¹, com a temperatura da coluna ajustada a 80 °C. Para análise qualitativa e quantitativa de metabólitos em LC-MS a fase móvel utilizada foi 0.1% ácido fórmico com um fluxo de 0.4 mL.min⁻¹, sem mudança de gradiente (isocrático). Desta vez, apenas a água utilizada para o preparo de fase móvel foi filtrada,

seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente na seção 2.2 Materiais e métodos. Após a filtragem, o reagente foi adicionado e a fase móvel foi despejada diretamente no recipiente do cromatógrafo, sem degaseificar devido a presença de degaseificador interno nos equipamentos acima descritos.

Os sobrenadantes analisados tiveram as células baixadas em ultracentrífuga (10 min, 13.800 g), filtradas com filtro de 0.2 μm . O sobrenadante resultante foi armazenado em freezer – 20 °C até o momento de ser utilizado em análise.

8.8 Ensaio colorimétrico para detecção de lactonas

O teste colorimétrico para detecção de xilono-1,4-lactona foi baseado em (Dvořák, Kováč, Lorenzo, 2020) com modificações. As amostras a serem analisadas foram diluídas 4 x, com água ultrapura, para que atingissem o gradiente de detecção de concentração (1 – 10 mM). As reações foram realizadas em tubos de 2 mL e as leituras de absorbância (550 nm) foram realizadas em cuvetas de 1 mL, em espectrômetro Thermo Fisher GENESYS 150 UV-Vis (EU-Netzkabel). Curvas padrão foram realizadas para os compostos ácido xilônico, xilonolactona e xilose nas concentrações 1 mM, 5 mM e 10 mM. O meio puro (YP suplementado com glicose e xilose e YP suplementado com glicose, xilose e antibióticos) foi utilizado como referência neste protocolo. As soluções utilizadas foram preparadas no mesmo dia do teste. Brevemente, foi adicionado 200 μL de cada amostra diluída em tubos de 2 mL, logo após, foi adicionado 400 μL de HCl hydroxialamina 2 M, com período de incubação de 2 minutos. Em seguida foi adicionado 260 μL de HCl 3.2 M e 200 μL de FeCl_3 10 %. Depois de todas as soluções serem adicionadas, 900 μL foram transferidos para uma cuveta de 1 mL e a absorbância foi medida e comparada com as curvas padrão.

8.9 Efeito do uso de ácido xilônico como única fonte de carbono no metabolismo de *K. phaffii*

Para avaliar a capacidade da linhagem transformada JA122 de utilizar ácido xilônico como substrato para a produção de EG, um cultivo foi feito em meio YP suplementado com 4 g/L de ácido xilônico + higromicina 400 $\mu\text{g/mL}$, em frascos de 100 mL contendo

20 mL de meio. O pré-inóculo foi realizado como descrito no tópico 8.6. Os cultivos celulares foram realizados em duas condições distintas, ambos começando com D.O. de aproximadamente 5. Na primeira condição, o meio foi tamponado com solução ftalato de potássio (1X), ajustado para pH 7,0, e na segunda condição, o meio não foi tamponada. O experimento ocorreu em triplicata biológica, por 96 h.

8.10 Efeito de glicose e glicerol na produção de EG em biorreatores de bancada

O pré-inóculo deste experimento foi realizado de forma diferente dos anteriores, por isso será descrito nesta seção. A linhagem *K. phaffii* JA122 foi inoculada em tubos de fundo cônico de 50 mL contendo 10 mL de meio YPDX (20 g/L de xilose, 20 g/L de glicose + antibióticos). Os tubos foram incubados em shaker (30°C e 200 rpm). Após 48 h, 10 mL do pré-inóculo foram vertidas em frascos aletados de 1 L contendo 300 mL de meio YPDX (20 g/L de xilose, 20 g/L de glicose + antibióticos). Os frascos foram incubados em shaker (30°C e 200 rpm). Depois de 24 h, 5 mL do pré-inóculo foi retirado para análise de peso seco. A D.O. foi padronizada para 1, o cultivo celular foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o pellet foi transferido para inóculo em biorreator de 500 mL. O experimento foi realizado em dois meios de cultura distintos: i) YPXG (40 g/L xilose, 20 g/L de glicerol, 2 g/L de glicose a cada 48 h e 200 ug/mL de higromicina); ii) YPDX (40 g/L xilose, 20 g/L de glicose, 2 g/L de glicose a cada 48 h e 200 ug/mL de higromicina). O experimento ocorreu por 96 h, a 400 rpm, 30°C e 0.8 v/v.min de aeração. Três alíquotas de 2 mL foram retiradas por dia, para análises de produção de metabólitos em HPLC e leitura de DO_{600nm} em espectrofotômetro, 10 mL foram coletados ao final da fermentação para análise de peso seco. O experimento foi realizado em duplicata biológica.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Efeito de diferentes concentrações de glicose na produção de EG por *K. phaffii*

Nos testes fermentativos realizados no capítulo anterior, foram usados xilose como substrato para a produção de EG e glicose como fonte de carbono para a produção de biomassa, com concentrações de 40 g/L e 2 g/L, respectivamente. A fim de compreender melhor se a glicose possui um papel importante no aumento ou na redução da produção de EG em *K. phaffii*, um experimento com diferentes proporções de glicose e xilose foi realizado. Nesse, a linhagem JA122 foi avaliada em 4 condições de cultivo, com proporções da concentração de glicose variando em relação à xilose: i) 20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose; ii) 20 g/L de glicose e 40 g/L de xilose; iii) 10 g/L de glicose e 40 g/L de xilose e iv) 2 g/L de glicose e 40 g/L de xilose. Esse experimento foi realizado em duplicata biológica.

Como pode ser observado na Figura 22, a linhagem JA122 produziu EG e AG em todas as condições de cultivo. A produção de EG foi favorecida nas condições em que a proporção de glicose inicial em relação a xilose foi de 1:1 e 1:2, chegando a produzir mais de 1,0 g/L e 1,34 g/L em 96 h de cultivo, respectivamente. Sendo a 1:2 a melhor condição, visto que a produção de EG foi mais alta, além de ter sido favorecida sob a de AG. Essas produções de EG foram as maiores concentrações atingidas até o momento neste trabalho. A produção de 1,34 g/L é 41% maior quando comparado ao experimento inicial realizado no capítulo anterior, no qual, a linhagem *K. phaffii* JA122 produziu 0,8 g/L de EG, a partir de um meio de cultura contendo 40 g/L de xilose e 2 g/L de glicose. Quanto ao AG, a linhagem JA122 foi capaz de produzir aproximadamente 1,5 g/L quando submetida ao processo fermentativo na condição 1:20, com a menor concentração de glicose dentre todas as condições (2 g/L).

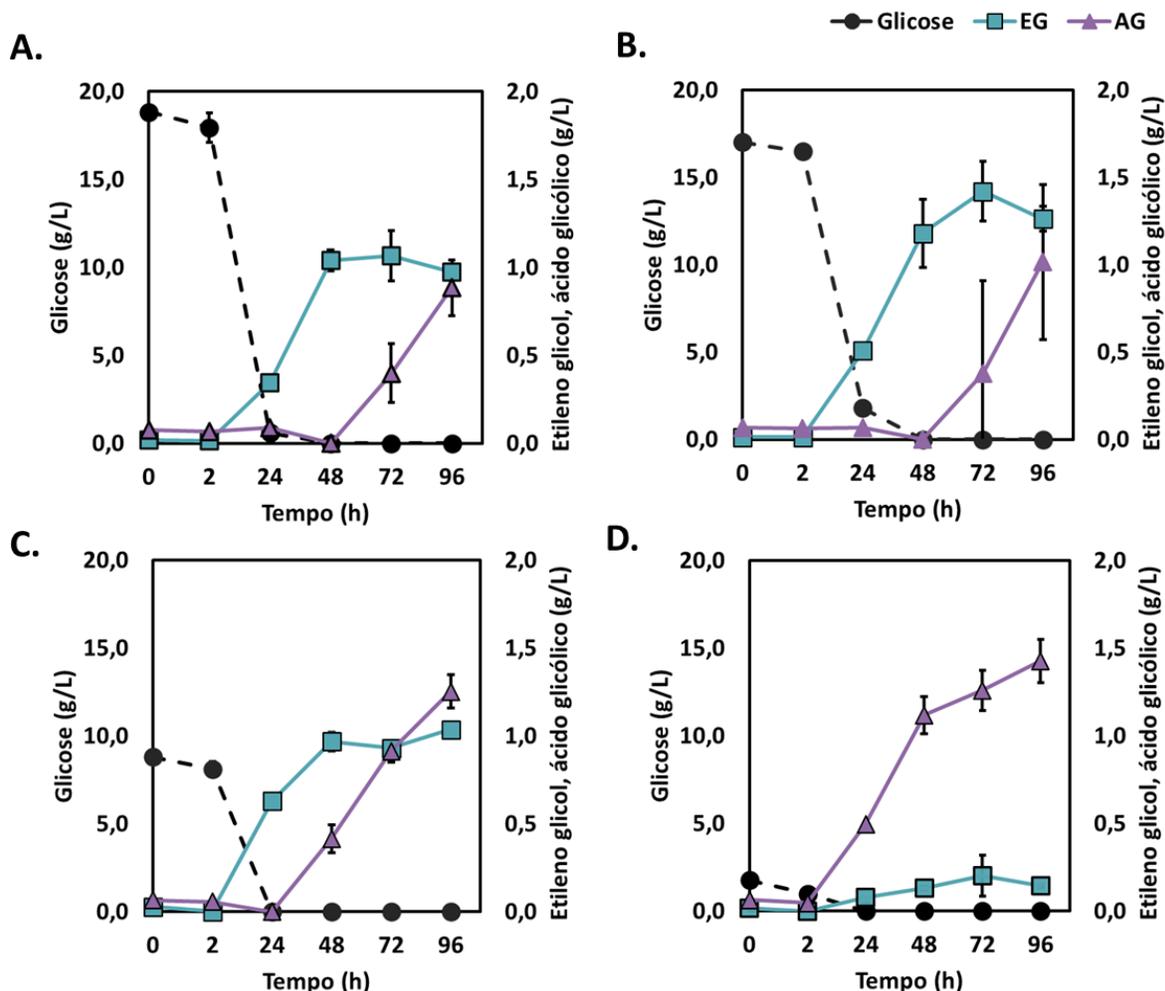


Figura 22 - Produção de ácido glicólico (AG), e etileno glicol (EG) e consumo de glicose, em diferentes condições de cultivo. Condições (glicose, xilose): **A.** 1:1- 20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose; **B.** 1:2 20 g/L de glicose e 40 g/L de xilose; **C.** 1:4 – 10 g/L de glicose e 40 g/L de xilose; **D.** 1:20 – 2 g/L de glicose e 40 g/L de xilose. Linhagem cultivada: *K. phaffii* JA122. Experimento feito em duplicata biológica. Fonte: Elaboração própria (2022).

A linhagem JA122 consumiu toda a glicose do meio de cultivo dentro das primeiras 24 h. Pode ser observado que a produção de AG foi iniciada apenas após o término de toda a glicose no meio de cultura, fato que ocorreu em todas as condições avaliadas (Figura 22 B). Até o momento, existem apenas dois trabalhos publicados nos quais a produção de EG a partir da cofermentação de xilose e glicose é avaliada em leveduras e ambos usam *S. cerevisiae* como modelo (Salusjärvi *et al.*, 2017; Uranukul *et al.*, 2019). Além disso, a maioria dos trabalhos tem a produção de EG acompanhada de AG. Em *S. cerevisiae*, as concentrações finais de EG e AG foram de 0,0014 g/L e 1,0 g/L,

respectivamente, através da via de Dahms (Salusjärvi *et al.*, 2017). Com a expressão heteróloga da via da ribulose -1P, a produção de EG em *S. cerevisiae* chegou a 4,05 g/L, a maior produção de EG reportada em leveduras até o momento. Neste mesmo trabalho, os autores reportam a produção de AG como subproduto da produção de EG, mas não detalham a concentração do metabólito em questão (Uranukul *et al.*, 2019).

A partir do presente experimento, pode ser concluído que a melhor condição de cultivo para a produção de EG é a que contém a concentração mais alta de glicose (20 g/L) e de xilose (40 g/L). Os fatores que levaram a esse aumento de produção ainda não estão totalmente esclarecidos. Uma hipótese que pode ser formada é de que a enzima aldeído desidrogenase nativa de *K. phaffii*, responsável por converter glicolaldeído em ácido glicólico, pode ser reprimida na presença de concentrações elevadas de glicose. Portanto, o fluxo de carbono só seria convergido à produção de ácido glicólico quando a concentração de glicose é metabolizada pelas células (depois de 24 h). De fato, estudos demonstraram que fatores de transcrição (Mig1, Mig2 e Nrg1) ligados à regulação da expressão do gene *AOX1*, que codifica para as enzimas álcool oxidases nativas de *K. phaffii*, são reprimidos na presença de 1 % de glicose no meio de cultivo Wang, J. *et al.*, 2017).

Nesse experimento, não só o AG passou a ser produzido apenas quando a glicose acabou, como a concentração de EG parou de aumentar neste mesmo ponto. Desta forma, confirmou-se que a produção de EG e AG são totalmente antagônicas, no qual um composto não é produzido de forma eficiente ao mesmo tempo que o outro. A partir dos resultados obtidos, otimizações de bioprocessos podem ser feitas para tentar minimizar a produção de AG, e assim guiar o fluxo de carbono para EG. Como por exemplo, experimentos de fermentação contínua, nos quais a concentração de glicose pode estar presente de maneira constante. Outra otimização que pode ser feita é a investigação da presença de enzimas aldeído desidrogenases nativas na linhagem de *K. phaffii* X-33, para que os genes sejam deletados. Alguns trabalhos reportaram a presença dessas enzimas nativas nas linhagens estudadas, tanto de leveduras (Uranukul *et al.*, 2019) quanto de bactérias (Chae *et al.*, 2018).

9.2 Presença de enzimas aldeído desidrogenase e aldeído redutase nativas em *K. phaffii*

A produção de AG por linhagens construídas para produção de EG nas diferentes condições de cultivo demonstra que a levedura possui atividade enzimática nativa capaz de converter glicolaldeído a AG. Portanto, um experimento contendo glicolaldeído como substrato foi realizado visando avaliar a atividade de aldeído desidrogenase e a presença de atividade de enzimas aldeído redutases nativas. Além de avaliar o efeito da disponibilidade de oxigênio nas respectivas reações enzimáticas. Para tanto, as linhagens JA122 e X-33 foram submetidas à experimento de fermentação em meio YPD suplementado com 10 mM de glicolaldeído em condições de cultivo aeróbicas e microaróbicas.

Como pode ser observado na Figura 23 A e B, *K. phaffii* X-33 é capaz de converter glicolaldeído a ácido glicólico em condições aeróbicas. A produção de ácido glicólico demonstra que a linhagem de *K. phaffii* provavelmente possui atividade da enzima aldeído desidrogenase.

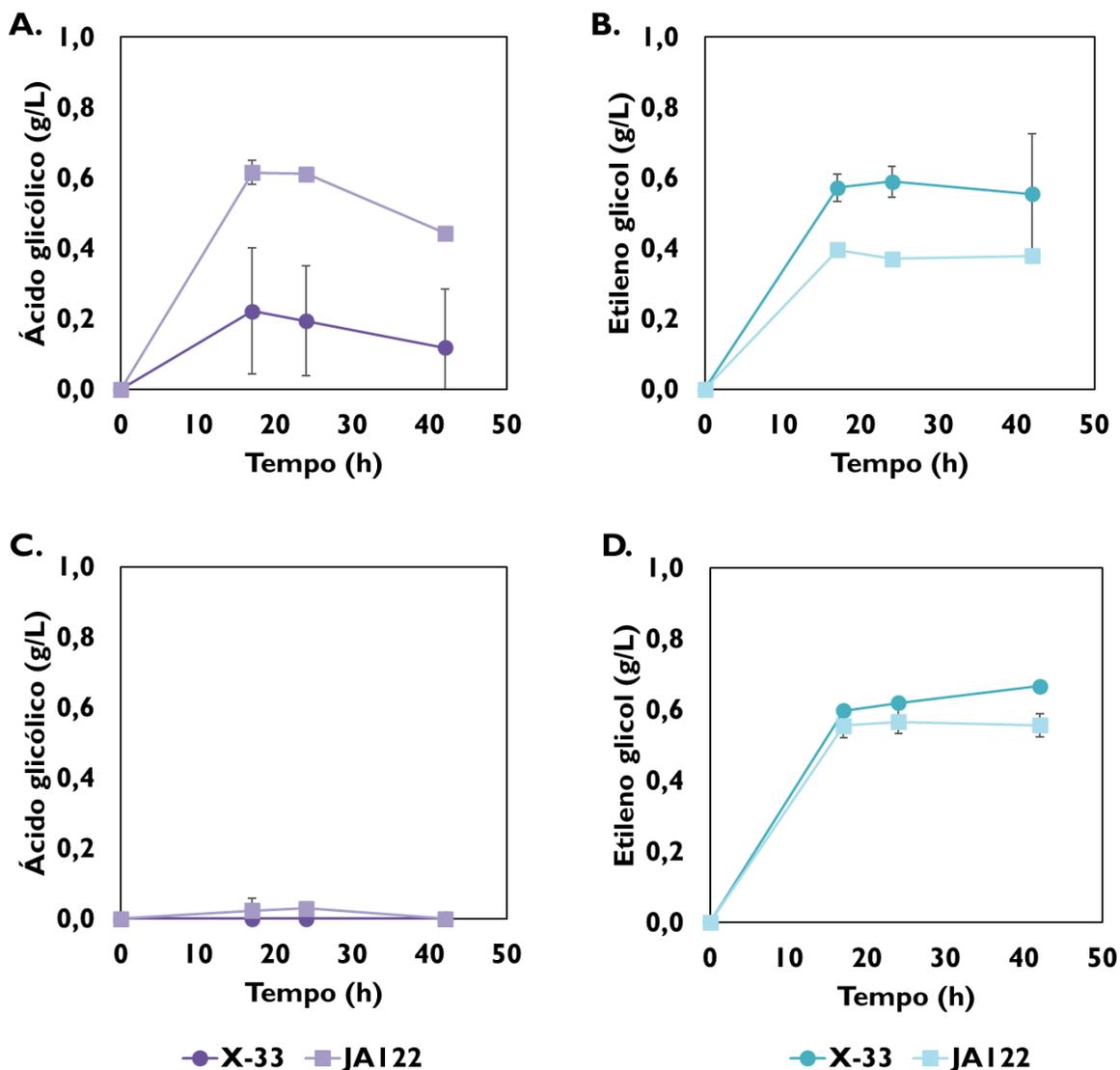


Figura 23 - Conversão de glicolaldeído (10 mM) à ácido glicólico e etileno glicol, em experimento de fermentação com duas condições distintas (A e B aeróbica e C e D microaeróbica). As linhagens cultivadas foram *K. phaffii* X-33 e *K. phaffii* JA122 (transformada com todos os genes da via de EG). Os resultados de desvio padrão representam um intervalo de confiança de 95 %, $z = 1.96$ em uma distribuição normal.

Fonte: Elaboração própria (2022).

Já na condição microaeróbica, a conversão de glicolaldeído em AG não foi detectada na linhagem sem as enzimas da via de EG. Da mesma forma, a linhagem JA122 teve a produção de AG favorecida em condições aeróbicas de fermentação, e uma taxa de conversão muito baixa quando em condição de oxigênio limitado (Figura 23C).

No que diz respeito à produção de EG a partir de glicaldeído, as duas linhagens produziram o composto em ambas as condições de cultivo (Figura 23B e D). A linhagem JA122 produziu mais EG em condição microaeróbica, corroborando com a hipótese de que a enzima aldeído redutase codificada pelo gene *FucO* é possivelmente inibida na presença de oxigênio (Cabiscol *et al.*, 1990a). A linhagem sem as enzimas da via também produziu EG nas duas condições de cultivo, o que implica a presença de enzima(s) aldeído redutase(s) nativa(s) em *K. phaffii*. Além disso, a enzima nativa parece não ser inibida na presença de oxigênio. A produção de EG detectada nos cultivos de *K. phaffii* X-33 abre possibilidades de investigação da eficácia das enzimas aldeído redutases nativas.

Os resultados obtidos com esse experimento demonstram a preferência da condição microaeróbica para a produção de EG por ambas as linhagens utilizadas. Ao contrário, a produção de AG foi preferível em condições aeróbicas. Essa divergência pode ser explorada em futuros experimentos para otimização de bioprocessos fermentativos, nos quais a taxa de aeração e oxigênio dissolvido podem ser ajustadas para diminuir a produção de AG e favorecer a de EG. Também, a enzima aldeído redutase utilizada neste trabalho parece apresentar eficácia semelhante em relação à enzima nativa de *K. phaffii*. A construção de uma linhagem contendo apenas as 3 primeiras enzimas da via de EG (XDH, XD e ALDO) se torna interessante para que se possa comparar a atividade das enzimas aldeído redutases nativas com a heteróloga.

9.3 Enzimas aldeído redutase nativas e heterólogas em linhagens de *K. phaffii*

Os resultados anteriores indicam a existência de atividades nativas de aldeído redutases (ALDR) nativas em *K. phaffii*. A fim de confirmar a presença de enzima(s) nativa(s) e comparar suas atividades com a enzima heteróloga utilizada neste trabalho foram construídas linhagens de *K. phaffii* expressando apenas as 3 primeiras enzimas da via de produção de EG (XDH, XD e ALDO).

As novas construções englobaram diferentes linhagens com diferentes combinações de enzimas XDH e XD. Com o intuito de entender se as enzimas XDH influenciam na produção de EG e AG, nessa nova conformação da via metabólica (sem

a enzima ALDR heteróloga), 4 novas linhagens foram construídas com os genes codificantes para as 4 diferentes XDHs (AM, BS, HL e MN), juntamente com o gene codificante para a XD-HL e apenas a enzima ALDO, como mostrado na Figura 24.

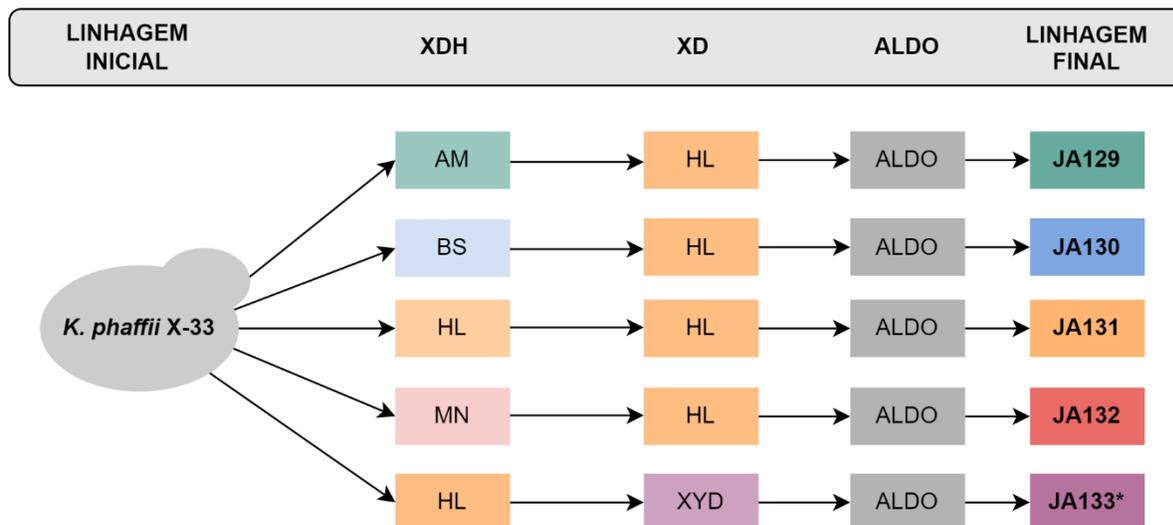


Figura 24 - Linhagens construídas expressando apenas 3 genes da via de produção de EG. Genes que codificam para enzima XDH: *xyIB-AM*, *xyIB-BS*, *xyIB-HL*, *xyIB-MN*, gene que codifica para a enzima XD: *XyID* (controle) e *xyID-hl* e gene que codifica para a enzima ALDO: *YjhH*. O esquema exemplifica a construção das linhagens a partir da *K. phaffii* X-33.

Fonte: Elaboração própria (2022).

Inicialmente, um experimento foi realizado com as 4 linhagens (JA129, 130, 131 e 132) para comparar a produção de EG e AG em meio contendo YPD suplementado com 40 g/L de xilose e 2 g/L de glicose. As linhagens foram cultivadas por 120 h, todo o perfil fermentativo está demonstrado em anexo, na Figura S 1. A maior significância estatística ocorreu no início da fermentação, em 24 h a linhagem JA131 produziu 0,32 g/L de EG enquanto as linhagens JA129, 130 e 132 produziram 0.16, 0.07 e 0.23 g/L, respectivamente (Figura 25). Os dados de desvio padrão obtidos indicam que com um intervalo de confiança de 95%, a linhagem JA131 produzirá significativamente mais EG do que as outras linhagens avaliadas. Já na produção de AG, não houve resultado significativo para diferenciar a melhor produtora. As linhagens JA129, 131 e 132 produziram 0.76, 0.78 e 0.86 g/L de AG, respectivamente, não demonstrando diferença estatística em um intervalo de confiança de 95%. A linhagem JA130 produziu 0.46 g/L de AG, sendo a que menos produziu AG, essa sim com diferença significativa para menos.

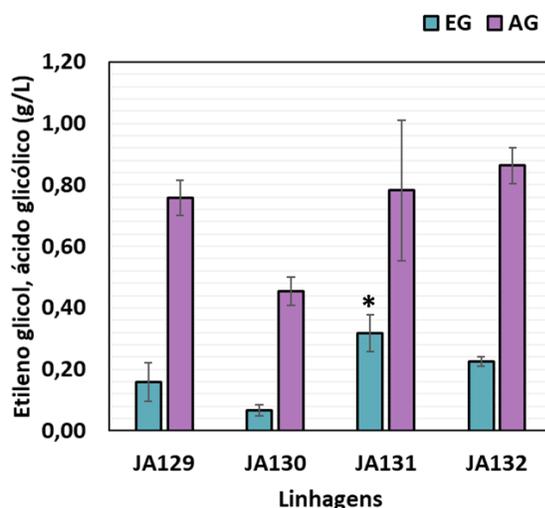


Figura 25 - Produção de etileno glicol e ácido glicólico em 24 h de cultivo das linhagens construídas com apenas 3 enzimas da via de EG. Experimento feito em duplicata. Os resultados de desvio padrão representam um intervalo de confiança de 95 %, $z = 1.96$ em uma distribuição normal. *significância estatística na produção de EG realizada pela linhagem JA131 em relação com às outras linhagens, em análise de dispersão de desvio padrão.
Fonte: Elaboração própria (2022).

Os testes iniciais indicam que as linhagens são capazes de produzir EG sem a adição da enzima ALDR heteróloga. Além disso, o experimento anterior demonstrou que existe uma diferença significativa entre a produção de EG das linhagens transformadas com as diferentes XDHs. Portanto, novos testes foram feitos, desta vez para analisar se existem diferenças na comparação entre linhagens transformadas com a via completa de EG (XDH, XD, ALDO e ALDR) e linhagens com a via de EG apenas com a enzima ALDR nativa.

Para realizar essa comparação, as linhagens *K. phaffii* JA133 (carrega os genes *XylB-HL*, *XylD* e *YjhH*, codificantes para XDH, XD e ALDO, respectivamente) e JA131 (carrega os genes *XylB-HL*, *XylD-hl* e *YjhH*, codificantes para XDH, XD e ALDO, respectivamente) foram comparadas à suas respectivas linhagens, transformadas com a via completa de produção de EG. A linhagem controle *K. phaffii* JA124 (carrega os genes *XylB-HL*, *XylD*, *YjhH* e *FucO*, codificantes para XDH, XD, ALDO e ALDR, respectivamente) e a linhagem JA122 (carrega os genes *XylB-HL*, *XylD-hl*, *YjhH* e *FucO*, codificantes para XDH, XD, ALDO e ALDR, respectivamente). Essas linhagens foram escolhidas especificamente por terem apresentado uma melhor performance na produção de EG em todos os experimentos realizados até o momento.

As linhagens escolhidas (JA124, JA133, JA122 e JA131) foram avaliadas em meio YP suplementado com 40 g/L de xilose e 2 g/L de glicose por 48 h. Ao final do cultivo foi possível detectar a produção de EG e AG no sobrenadante de todas as linhagens analisadas (Figura 26). As linhagens JA124, 133, 122 e 131 produziram 0.61, 0.35, 0.79 e 0.46 g/L de EG, respectivamente (Figura 26).

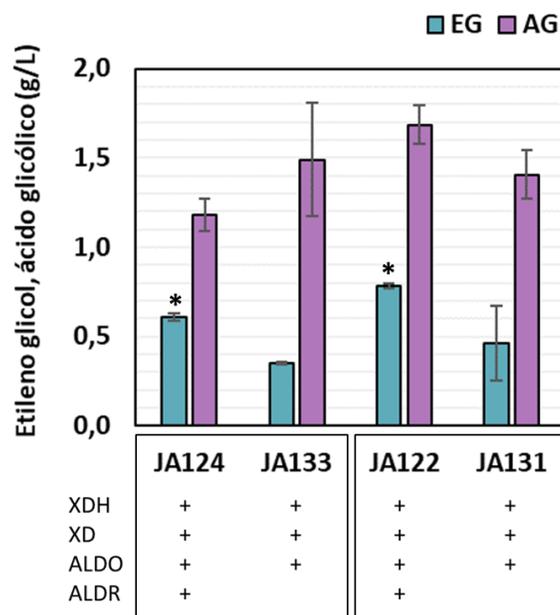


Figura 26 - Produção de etileno glicol e ácido glicólico em 48 h de cultivo das linhagens construídas com apenas 3 enzimas da via de EG (JA131, JA133), em comparação com as linhagens transformadas com todas as enzimas da via de produção de EG (JA122, JA124). Experimento feito em duplicata. Os resultados de desvio padrão representam um intervalo de confiança de 63% $z = 1$. *significância estatística na produção de EG em análise de dispersão de desvio padrão, na relação JA124 e JA133, e JA122 e JA131.

Fonte: Elaboração própria (2022).

A diferença na produção de EG entre as linhagens expressando o gene heterólogo codificante para a enzima ALDR (JA122 e JA124) e linhagens apenas com os genes nativos (JA131 e JA133) foi significativa, no intervalo de 1 desvio padrão. Ambas as linhagens portando o gene *YjhH* (ALDR heteróloga de *E. coli*) produziram 1.7 vezes mais EG do que as linhagens com apenas as 3 enzimas da via de EG. Esses resultados corroboram, mais uma vez, a hipótese de que existe atividade enzimática de ALDRs nativas em *K. phaffii*. Ademais, a diferença significativa entre as produções de EG demonstram a necessidade da super-expressão de enzimas ALDR para se obter uma maior produção de EG.

Outra comparação que pode ser feita a partir desses resultados, é a de produção de EG entre as linhagens JA124 e 122, ambas expressam a via completa de produção de EG, porém, uma possui a enzima XD-XYD e a outra XD-HL. A linhagem expressando a XD-HL (JA122) produziu 1.29 vezes mais EG do que linhagem JA124 (utilizada como

controle positivo neste trabalho), diferença considerada estatisticamente significativa no intervalo de 1 desvio padrão. Essa comparação já foi feita anteriormente, quando a linhagem JA122 foi escolhida como modelo para as análises desse trabalho, no experimento 0, do capítulo 1. Desta forma, mais uma vez, foi confirmada a hipótese de que a linhagem JA122, expressando o gene identificado neste trabalho (*xyID-hI*), contribuiu para uma maior produção de EG do que o gene que codifica para a enzima controle *xyID* de *C. crescentus*.

Novamente, concentrações de AG maiores do que EG foram detectadas no sobrenadante de todas as linhagens analisadas. As linhagens JA124, JA133, JA122 e JA131 produziram 1.11, 1.49, 1.69 e 1.41 g/L de AG, em média, respectivamente. Não houve diferença significativa entre a produção de AG das quatro linhagens. Esses resultados confirmam a existência de atividade de enzimas aldeído desidrogenases (ALDH) nativas em *K. phaffii*, e demonstram a preferência no fluxo metabólico da via de produção de EG, para AG.

9.4 Conversão de EG e AG por *K. phaffii*

Após as análises dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, notou-se a preferência na produção de AG à EG a partir de xilose através da rota metabólica de EG empregada neste trabalho. Diversos microrganismos foram reportados por converterem EG em AG, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Kataoka, Sasaki, Hidalgo, 2001). Nesse contexto, um experimento foi feito utilizando EG ou AG como única fonte de carbono para análise de produção de metabólitos em linhagens de *K. phaffii*.

As linhagens *K. phaffii* X-33, JA122 (transformada com todas as enzimas da via de produção de EG) e JA131 (transformada com apenas 3 genes da via de produção de EG) foram cultivadas por 72 h em meio contendo YP suplementado com 5 g/L de EG ou AG, com DO inicial de 10. Quando EG é utilizado como única fonte de carbono, todas as linhagens realizam a conversão de EG à AG (Figura 27) A diferença entre a linhagem controle, e as linhagens transformadas é a velocidade dessa conversão. A linhagem X-33 produz quase 4 g/L de AG em 24 h de cultivo, enquanto as linhagens JA122 e JA131 produzem 2.61 e 2.34 g/L em média, respectivamente (Figura 27). A diferença inicial da

produção de AG entre a levedura controle e as transformadas é significativa estatisticamente no ponto 24 h, após isso, os valores se assemelham e não há mais diferença significativa (Figura 27).

O perfil fermentativo das linhagens JA122 e JA131 são semelhantes e não se diferenciam estatisticamente, indicando que nessas condições de cultivo não existe diferença na influência da enzima ALDR heteróloga ou nativa de *K. phaffii* especificamente na produção de AG a partir de EG (Figura 27).

O consumo de EG parece estabilizar após as 24 h no cultivo da linhagem controle X-33 e após as 48 h no cultivo das linhagens transformadas (Figura 27). Esse fato pode ocorrer pela diminuição de oxigênio disponível no meio de cultivo, já que a produção de EG à AG ocorre com mais eficiência em condições aeróbicas de cultivo (Kataoka, Sasaki, Hidalgo, 2001).

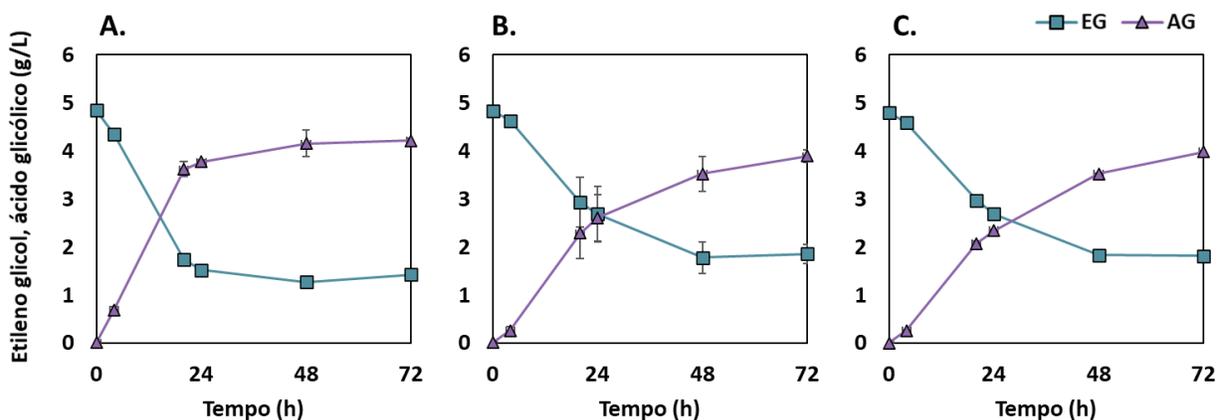


Figura 27 - Cultivo de linhagens de *K. phaffii* em meio YP suplementado com 5 g/L de EG como fonte de carbono. A fermentação foi realizada pelas linhagens **A.** *K. phaffii* X-33 **B.** *K. phaffii* JA122 (transformada com todas as enzimas da via de EG) e **C.** *K. phaffii* JA131 (transformada com apenas 3 enzimas da via de produção de EG). O cultivo foi realizado por 72 h em duplicata. O desvio padrão representa intervalo de confiança de 95%, $z = 1,96$ em uma distribuição normal. Fonte: Elaboração própria (2022).

Quando AG é utilizado como substrato, não ocorre a conversão para EG por nenhuma das linhagens testadas (resultado mostrado em anexo Figura S 2). Podendo significar que a conversão de AG a EG não ocorre pelas mesmas enzimas que convertem EG a AG nativas de *K. phaffii* e/ou não ocorre de forma metabolicamente favorável. De fato, não foram encontradas evidências da produção de EG a partir de AG descritos na literatura, até o presente momento.

9.5 Análises metabólicas para quantificação de compostos intermediários da via de produção de EG

A maioria das análises de metabólitos feitas até o momento neste trabalho estavam focadas na detecção de EG e AG. Diversos testes foram feitos para quantificar, principalmente, o consumo de xilose e a produção de outros metabólitos da via, como ácido xilônico e KDX. Porém, algumas análises só puderam ser feitas *a posteriori*, após extensos esforços de otimização de metodologias de cromatografia líquida. Vale ressaltar que a presença de ácido xilônico e KDX foi qualitativamente confirmada nos sobrenadantes das linhagens construídas neste trabalho através de análises de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas, demonstrado no capítulo 1 desta tese (seção 5.4 Validação da funcionalidade das possíveis novas XD).

Durante o estágio de doutorado na Alemanha foi possível analisar quantitativamente a produção de metabólitos e o consumo de substratos em cromatografia líquida acoplada em espectrômetro de massas. Para quantificar o possível acúmulo de intermediários da via metabólica de produção de EG, foram realizados cultivos em meio YPDX (20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose) com três linhagens diferentes: *K. phaffii* X-33, JA128 (linhagem expressando as enzimas XDH e XD, com o plasmídeo pB3Hyg vazio) e JA122 (linhagem expressando todas as enzimas da via de produção de EG).

O perfil fermentativo das linhagens é demonstrado na Figura 28. Os metabólitos xilitol, arabitol, ácido xilônico, etileno glicol e ácido glicólico foram detectados empregando LC-MS. A análise permitiu a separação de xilitol e arabitol, e xilose e ácido

xilônico - compostos que se mostram difíceis de separar por conta da coeluição anteriormente mencionada.

Na levedura controle X-33, a glicose foi assimilada rapidamente. Em 4 h de cultivo a levedura consumiu quase toda a hexose disponível (Figura 28A). A xilose foi consumida por completo em 96 h. A produção de biomassa foi de cerca de 9 g/L. A linhagem X-33 produziu xilitol a partir da xilose consumida, tendo sua produção iniciada a partir de 4 h de cultivo, atingindo a concentração máxima média de 6.2 g/L em 48 h. Após esse período, o poliol começa a ser metabolizado e cai para 4.8 g/L no ponto de 96 h (Figura 28A). O consumo de xilose e a produção de xilitol podem demonstrar a provável atividade de enzimas nativas da via de oxirredução de xilose em *K. phaffii* X-33. De modo geral, linhagens selvagens de *K. phaffii* não são conhecidas por consumirem xilose com eficiência. Estudos recentes demonstraram através de análises de transcriptoma a presença de genes que codificam para a via oxirredutiva (xilose redutase, xilitol desidrogenase e xiluloquinase). A partir de experimentos com carbono marcado (^{13}C), foram detectados altos níveis de incorporação da xilose por linhagens de *K. phaffii*, confirmando assim, a utilização da via oxirredutiva por essas leveduras, incluindo a linhagem X-33 (Heistinger *et al.*, 2022).

No presente trabalho, também foi detectada a produção de arabitol pela linhagem X-33 (Figura 28A). A produção de arabitol começou antes da produção de xilitol, atingindo sua produção média máxima de 1.40 g/L no ponto das 4 h, e não sendo mais detectável no sobrenadante a partir das 48 h (Figura 28A).

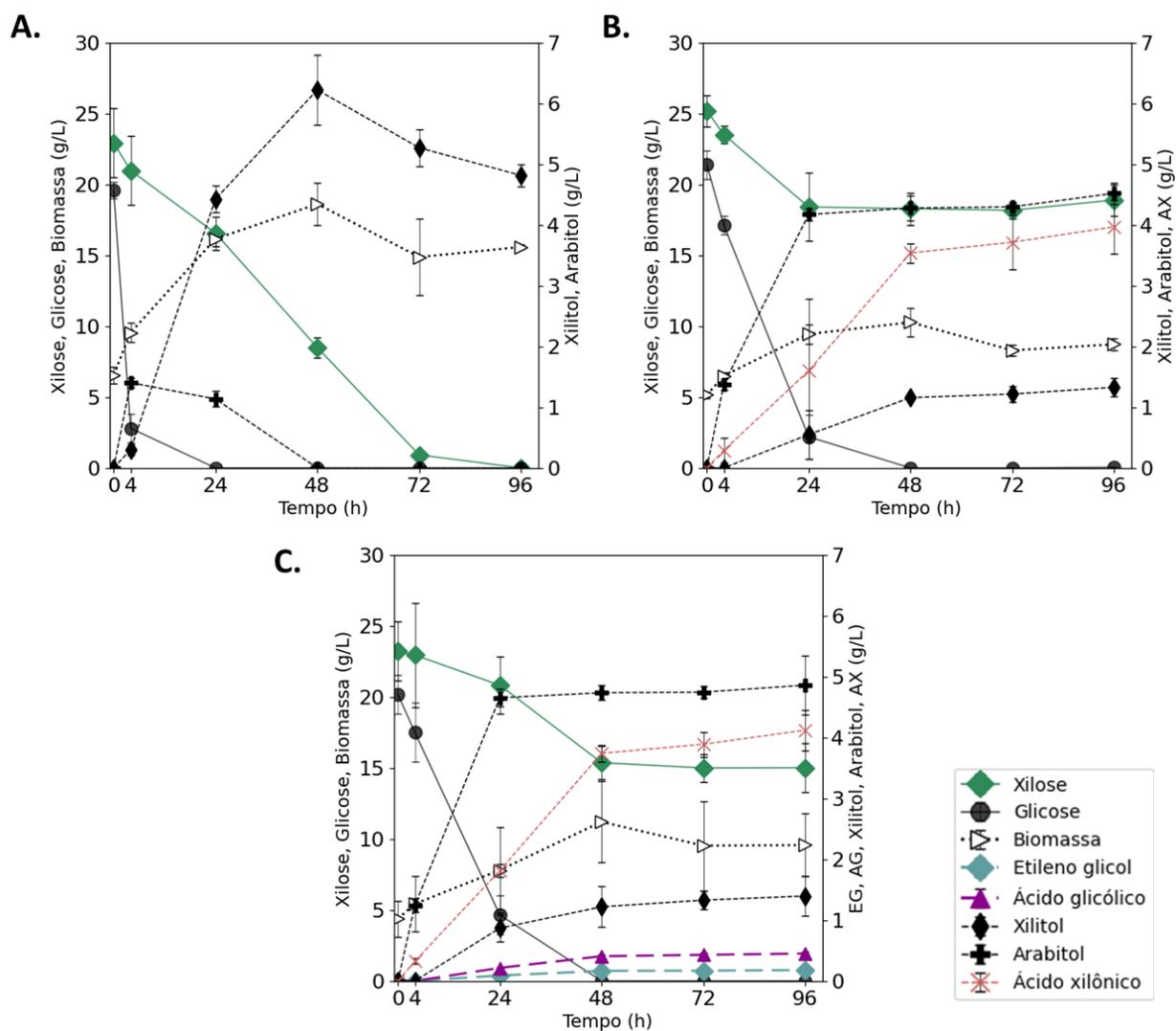


Figura 28 - Perfil fermentativo das linhagens recombinantes e linhagem controle de *K. phaffii*, em meio YPD_X. Consumo de glicose e xilose e produção de metabólitos e biomassa, em 96 h de cultivo. Linhagens de *K. phaffii*: **A. X-33; **B.** JA128; **C.** JA122. Experimento realizado em triplicata biológica. Fonte: Elaboração própria (2022).**

O segundo controle negativo utilizado foi a linhagem *K. phaffii* JA128 (Figura 28B), a qual possui os plasmídeos pGAPZB e pKLD com os genes codificantes para as enzimas XDH e XD, respectivamente, integrados no genoma. Além desses, essa linhagem também foi transformada com o plasmídeo episossomal pB3Hyg vazio. Portanto, a linhagem JA128 não possui os genes codificantes para as enzimas ALDO e ALDR, não tendo a capacidade de converter o composto intermediário KDX em glicolaldeído e etileno glicol.

O perfil fermentativo desta linhagem foi muito diferente da linhagem X-33. Toda a glicose foi consumida em um pouco mais de 24 h. A linhagem JA128 consumiu aproximadamente 6 g/L de xilose em 24 h, e não demonstrou consumo desse açúcar após esse período, deixando assim, cerca de 19 g/L da pentose residual no sobrenadante (Figura 28B). Houve um acúmulo de ácido xilônico de aproximadamente 4 g/L e a produção de 1.3 g/L de xilitol, ambos atingindo seu ponto máximo em 48 h e se mantendo assim até as 96 h (Figura 28B). Arabitol também foi produzido nesta linhagem, atingindo a concentração de 4.5 g/L em 24 h, permanecendo estável no meio até o fim do cultivo em 96 h. A produção de biomassa foi de aproximadamente 3 g/L, com crescimento lento e estável (Figura 28B).

A linhagem transformada com todos os genes da via de EG, JA122, comportou-se de forma semelhante a JA128 e, conforme esperado, foi a única linhagem capaz de produzir EG e AG. O consumo de glicose ocorreu de forma similar à linhagem controle JA128, foi totalmente consumida em 24 h. Contudo, o consumo de xilose durou mais tempo e só cessou após as 48 h de cultivo (Figura 28C). A levedura produziu cerca de 5.0 g/L de biomassa, 2 g/L a mais do que o controle JA128. Também houve a produção de arabitol, que atingiu seu ponto máximo em 24 h (4.85 g/L) e, após esse período, a concentração se manteve estável no meio. A produção de xilitol foi de aproximadamente 1.3 g/L em 48 h, seguindo o padrão da linhagem controle JA128 (Figura 28B e C). A linhagem JA122 apresentou acúmulo de 4.1 g/L de ácido xilônico em 96 h. A produção deste ácido orgânico cresceu rapidamente nas primeiras 48 h atingindo a concentração de 3.7 g/L enquanto a levedura continuava assimilando a xilose do meio de cultivo, assim que a pentose parou de ser internalizada, a produção de ácido xilônico também diminuiu. Etileno glicol e ácido glicólico foram produzidos simultaneamente, chegando à

concentração máxima de 0.18 e 0.45 g/L respectivamente. A produção de EG e AG cessou após as 48 h de cultivo (Figura 28C).

A comparação entre as 3 linhagens demonstrou um perfil fermentativo muito diferente entre a linhagem X-33 e as transformadas. A linhagem X-33 produziu mais biomassa, sendo 1.5 vezes mais do que a linhagem JA122 e 3 vezes mais do que a JA128. A produção de biomassa aparentemente foi realizada a partir da glicose assimilada, visto que a produção de biomassa cessa após as 24 h, ponto em que a glicose no meio acaba. A xilose foi utilizada para a produção de xilitol na linhagem X-33 e nas linhagens transformadas, ela foi utilizada pela via de produção de EG, e para a via da oxirredução. Nenhuma das leveduras controle (X-33 e JA128) produziu etileno glicol ou ácido glicólico, demonstrando, assim, a necessidade da expressão dos genes ALDO e ALDR que convertem o intermediário KDX em glicolaldeído em EG e AG.

O perfil de consumo de glicose e xilose e a produção de arabitol e xilitol sugerem que a produção de arabitol é proveniente da glicose, e o xilitol da xilose. Já que, pode-se observar que a produção de arabitol cessa quando a glicose acaba, em todas as linhagens analisadas (Figura 28). A análise comparativa do perfil fermentativo das três linhagens utilizadas neste experimento, demonstrou que a inserção da via metabólica de EG afeta significativamente o metabolismo de açúcares das linhagens transformadas. Essas modificações metabólicas indicam a necessidade de regeneração de cofatores celulares, o que foi refletido na alta produção de arabitol. As linhagens transformadas (JA122 e JA128) produziram 3 x mais arabitol do que a linhagem controle X-33. Além disso, o consumo de xilose foi menos eficaz nas linhagens transformadas.

De fato, alguns estudos recentes demonstraram a produção persistente de arabitol por células de *K. phaffii* em condições de oxigênio limitado, quando a célula necessita de regeneração de cofatores NADH. Neste caso, o metabolismo celular é desviado para a redução de ribulose ou xilulose a arabitol resultando na regeneração de NADH (Bernauer *et al.*, 2021; Junqueira *et al.*, 2023; Melo *et al.*, 2018b). Essa maior necessidade de renovação de cofatores pode explicar a baixa produção de EG e a diminuição do consumo de xilose a partir das 48 h. Além de indicarem outras possíveis otimizações na rota metabólica de produção de EG.

9.6 Identificação e quantificação de xilonolactona

Após análises em cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas, foi possível avaliar quantitativamente a concentração de ácido xilônico e xilose presentes no mesmo sobrenadante de cultivo celular. Porém, a xilonolactona, outro metabólito importante da via de produção de EG, é um composto que não pode ser separado do ácido xilônico por métodos de HPLC ou LC-MS (Buchert, Viikari, 1988). A xilonolactona é um composto de cadeia fechada produzido a partir da oxidação da xilose pela enzima XDH. A xilonolactona pode ser aberta espontaneamente na presença de água ou com a catálise de uma enzima lactonase e hidrolisada a ácido xilônico (Trichez *et al.*, 2022).

Estudos realizados em linhagens de *P. fragi* sugerem que a xilonolactona pode ser acumulada no meio de cultura e lentamente hidrolisada a ácido xilônico por meio da via de Weimberg (Buchert, Viikari, 1988; Dvořák, Kováč, Lorenzo, 2020; Weimberg, 1961). Desta forma, como a enzima lactonase heteróloga não foi super-expressa em nenhuma das linhagens utilizadas neste trabalho, foi realizado um experimento colorimétrico para que não houvesse dúvidas de que o composto detectado na análise do LC-MS era ácido xilônico e não xilonolactona. Para tal, foram empregadas as mesmas amostras do ensaio anterior (seção 9.5 Análises metabólicas para quantificação de compostos intermediários da via de produção de EG), e os sobrenadantes analisados foram apenas os das linhagens JA128 e JA122. A linhagem controle X-33 não foi usada pois esta não produz ácido xilônico, e conseqüentemente, não seria possível observar xilonolactona no sobrenadante.

O ensaio colorimétrico foi realizado utilizando a correlação entre a DO medida e a concentração dos padrões utilizados. Para isso, 3 curvas padrão foram feitas: xilose, ácido xilônico e xilonolactona, cada composto estava presente em 3 diferentes concentrações (1, 5 e 10 mM). O ensaio foi projetado especificamente para analisar a presença de xilonolactona. No entanto, foram conduzidas análises contendo xilose e ácido xilônico no meio de cultura apenas para confirmar que a presença desses dois compostos não afetaria a precisão do ensaio colorimétrico. Após a leitura de DO das amostras contendo os padrões de xilose e ácido xilônico, verificou-se que a DO detectada não foi significativa o suficiente para que pudesse interferir no resultado de

xilonolactona (Figura S 3). Assim, optou-se por construir a curva padrão utilizando apenas xilonolactona como referência. Para a determinação das concentrações das amostras, os cálculos foram realizados com base na equação da reta (inclinação e interceptação). A figura contendo a equação e o coeficiente de determinação (R^2) pode ser encontrada nos materiais suplementares. (Figura S 3).

Após a realização do ensaio colorimétrico, a leitura de DO no espectro de luz de 550 nm foi realizada para cada sobrenadante correspondente às amostras coletadas de 0 a 96 h, no cultivo do experimento anterior (0) para as linhagens JA122 (transformada com todas as enzimas da via de produção de EG) e JA128 (transformada com apenas as duas primeiras enzimas da via de produção de EG – XDH e XD). No entanto, os valores obtidos não apresentaram DO significativa o suficiente para serem calculados usando a curva padrão com o limite mínimo de detecção de 1 mM (mínimo DO 0,145). Os resultados estão detalhados na Tabela S 2, em anexo.

Com base nesses resultados, é possível inferir que as concentrações de xilonolactona no sobrenadante do cultivo das linhagens JA122 e JA128 foram insignificantes. Esses dados reforçam a presença efetiva de ácido xilônico nos sobrenadantes fermentativos das linhagens, demonstrando, assim, a funcionalidade da enzima XDH.

Além disso, esses resultados sugerem que o gargalo na via de EG implementada neste estudo não está primariamente relacionado à conversão de xilose em ácido xilônico. Ao invés disso, a eficiência das enzimas xilonato desidratases implementadas pode ser um fator crítico. Portanto, é essencial investigar o uso exclusivo de ácido xilônico como fonte de carbono pelas linhagens transformadas de *K. phaffii*, a fim de avaliar sua capacidade de produzir EG a partir desse substrato e entender se o acúmulo de ácido xilônico é um gargalo principal deste trabalho.

9.7 Ácido xilônico como substrato fermentativo para a produção de EG em linhagem transformada de *K. phaffii*

Como foi verificado no ensaio anterior, a presença de pelo menos 4 g/L de ácido xilônico foi confirmada no sobrenadante do cultivo das linhagens transformadas com a via completa de EG. Para avaliar o metabolismo celular de ácido xilônico pela levedura

K. phaffii, a linhagem JA122 foi testada em duas condições diferentes de cultivo contendo meio YP suplementado com 4 g/L de ácido xilônico como única fonte de carbono em triplicata biológica. A primeira condição foi tamponada utilizando a solução ftalato de potássio, com pH ajustado para 7.0, e a segunda não teve pH ajustado, iniciando assim com pH 6.4. Os cultivos com as duas diferentes condições no pH foram realizados para que fosse possível avaliar se o pH influenciaria no consumo de ácido xilônico pelas células de *K. phaffii*.

Contudo, ao fim das 96 h de cultivo, nenhuma linhagem cresceu significativamente em nenhuma das duas condições de cultivo. A OD_{600nm} inicial utilizada neste experimento foi de aproximadamente 5.3 e após 96 h, a D.O. aumentou para 7.8, em média. Após análise em cromatografia líquida, não foi constatado consumo do ácido xilônico e, conseqüentemente, não houve produção de qualquer metabólito detectável. O aumento da OD_{600nm} pode ter ocorrido por consumo do carbono presente no meio YP (2%) utilizado juntamente com o ácido xilônico, visto que este meio possui extrato de levedura na sua composição.

Em experimentos prévios do presente trabalho, já foi constatada a produção de ácido xilônico pela linhagem transformada JA122 e posterior conversão do ácido xilônico em KDX. Neste caso, o ácido já estava incorporado na célula, através da xilose. Portanto, a hipótese existente é a possibilidade da levedura *K. phaffii* não possuir proteínas transportadoras de ácido xilônico, visto que, não houve consumo do referido metabólito em mais de 90 h de cultivo. Para o melhor do nosso conhecimento, não há experimentos publicados que se refiram ao consumo de ácido xilônico por linhagens de *K. phaffii*, portanto, experimentos futuros são necessários para avaliar melhor esta hipótese.

O uso de ácido xilônico como substrato fermentativo para a produção de EG não é comumente encontrado na literatura. Um artigo publicado em 2020, avaliou o consumo de ácido xilônico e a produção de etileno glicol por *Enterobacter cloacae* (Zhang et al, 2020). No referido trabalho, a linhagem *E. cloacae* S1 foi capaz de produzir 34.1 g/L de etileno glicol com rendimento de 0.288 g/g, o que corresponde a aproximadamente 70 % do rendimento teórico máximo de produção de EG pela via de Dahms. Após otimizações de processos fermentativos, a melhor condição encontrada para a produção de EG e

consumo de ácido xilônico foi com pH 7,0 e batelada alimentada em biorreator, o qual foi totalmente assimilado pelas células de *E. cloacae*.

Os experimentos realizados neste trabalho demonstram o funcionamento a via de EG implementada e também os diversos caminhos de otimizações que podem ser tomados a fim de aumentar a performance da via como um todo. Otimizações moleculares serão necessárias, principalmente, a super-expressão de algumas enzimas como a xilonato desidratase, para aumentar a conversão de ácido xilônico em KDX. Mas também, a otimização dos parâmetros dos processos fermentativos se faz necessária, como controle de pH, temperatura e aeração.

9.8 Avaliação da produção de etileno glicol e ácido glicólico utilizando xilose como substrato e glicerol ou glicose como fonte de carbono, em biorreator.

Glicerol é um subproduto da produção de biodiesel e sua utilização em processos biotecnológicos é interessante por agregar valor à cadeia produtiva de biodiesel no contexto de biorrefinarias (Tomàs-Gamisans; Ferrer; Albiol, 2018). Poucos trabalhos são encontrados na literatura nos quais a via sintética de produção de etileno glicol é implementada em microrganismos. Essa gama diminui ainda mais quando tentamos encontrar pesquisas utilizando glicerol como fonte de carbono em conjunto com a xilose em leveduras. Como *K. phaffii* possui a habilidade de utilizar glicerol como substrato para a produção de biomassa (Gasser, Mattanovich, 2018), esse composto pode ser uma boa fonte de carbono para crescimento celular, antes do processo de produção de EG.

A fim de avaliar a produção de EG, utilizando glicose e glicerol como fonte de carbono, em ambiente fermentativo mais controlado, foram realizados experimentos de fermentação em biorreator de bancada (500 mL). A linhagem JA122 foi selecionada para realizar esse novo processo fermentativo. Foram realizadas duas bateladas em biorreator, uma em meio contendo meio YP suplementado com xilose (40 g/L) e glicose (20 g/L), e outra com xilose (40 g/L) e glicerol (20 g/L), ambas em duplicata biológica. As altas concentrações de glicose e glicerol foram utilizadas para favorecer a produção de biomassa celular.

Apenas a linhagem JA122 crescida em meio contendo glicerol foi capaz de produzir uma pequena quantidade de EG (0,15 g/L), como mostram a Figura 29. A falta

de produção de EG neste experimento pode ser explicado pela presença de aeração durante todo o processo fermentativo. A conversão de glicolaldeído a EG é realizada pela última enzima da via de EG, a aldeído redutase. Neste trabalho, o gene utilizado foi o *FucO*, codificante para uma enzima aldeído redutase nativa de *E. coli* e, como foi demonstrado anteriormente, a atividade enzimática da *FucO* é inibida na presença de oxigênio (Cabiscol *et al.*, 1990b).

A produção de AG foi detectada nas duas condições, 0,72 g/L em meio contendo glicose e 1,82 g/L em meio contendo glicerol. A produção de AG foi significativamente maior no cultivo suplementado com glicerol, o que pode ser explicado pela diferença na utilização de cofatores na via de assimilação da glicose e do glicerol.

Neste experimento, ao contrário do que era esperado, a linhagem JA122 não consumiu as fontes de carbono secundárias, glicose e glicerol de forma eficiente. A glicose só foi totalmente consumida após 92 h, e no cultivo contendo glicerol, restaram aproximadamente 6 g/L do composto após as 92 h. O consumo máximo de glicose foi 20 g/L e de glicerol 17 g/L, em 92 h de fermentação. A análise feita em cromatografia líquida (HPLC), para este experimento específico, não possibilita a separação dos compostos xilose e ácido xilônico, pois os dois possuem o mesmo tempo de retenção, quando a coluna HPX87 é utilizada para análise, e os sobrenadantes deste cultivo não puderam ser avaliados por LC-MS utilizando a metodologia do experimento anterior. Portanto, os valores de consumo de xilose ainda serão posteriormente analisados em uma metodologia otimizada, utilizando uma coluna ELSD em UHPLC ou um LC-MS.

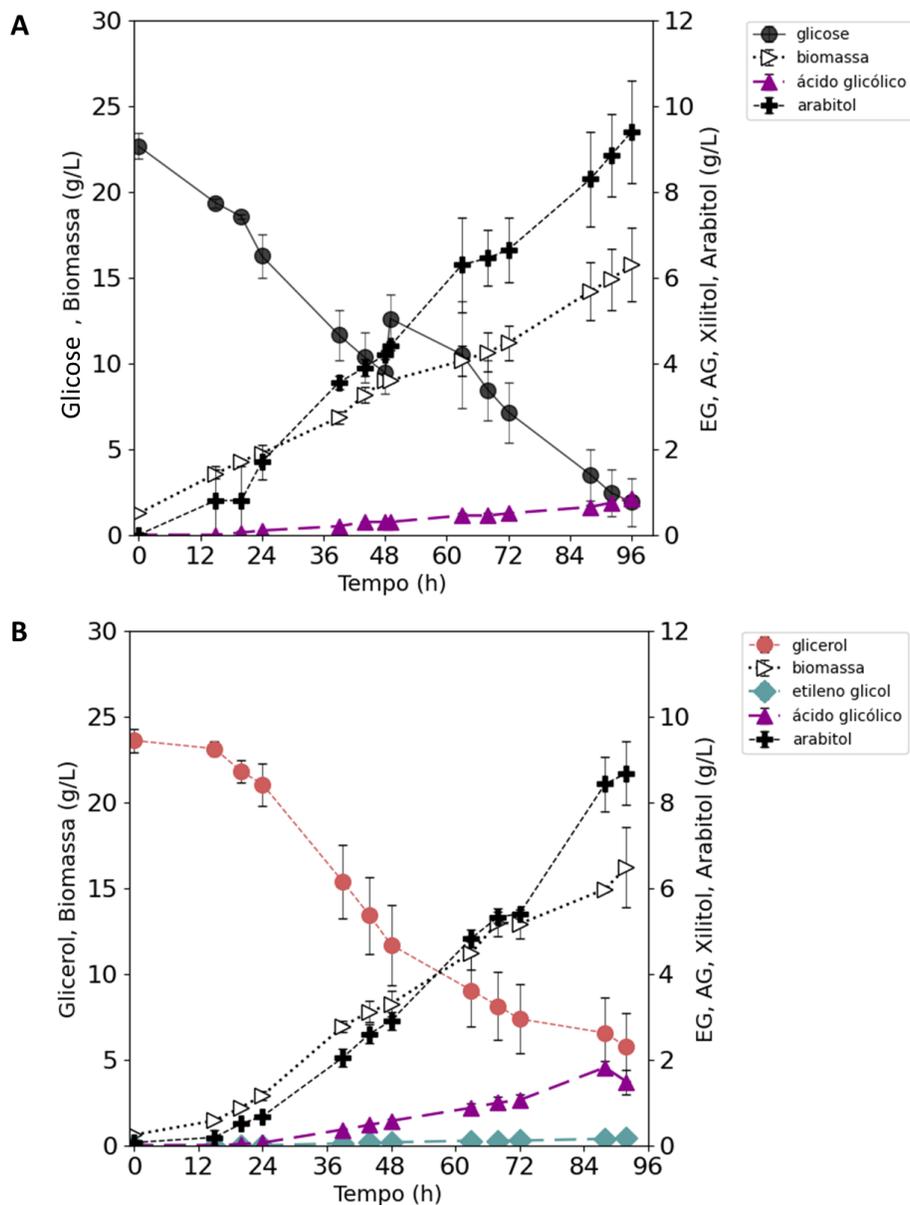


Figura 29 - Experimento de batelada em biorreator de bancada (500 mL), realizado em meio YP suplementado com glicose ou xilose, por 92 h. A linhagem utilizada foi a *K. phaffii* JA122, transformada com todos os genes da via de produção de EG. A) crescimento em meio YPD_X; (xilose 40 g/L, glicose 20 g/L); B) crescimento em meio YPG_X; (xilose 40 g/L, glicerol 20 g/L). Ambos representados em duplicata biológica.

Fonte: Elaboração própria (2022).

Também pôde ser observada a produção de arabitol pela linhagem JA122, em ambas as condições de cultivo. Os valores de produção de arabitol foram ainda maiores do que os encontrados no experimento anterior. Neste experimento, a linhagem JA122

produziu em média aproximadamente 8 g/L de arabitol, em ambas as condições empregadas, 2 vezes mais do que no experimento anterior (seção 9.5 Análises metabólicas para quantificação de compostos intermediários da via de produção de EG). As maiores diferenças entre os experimentos realizados em frasco e em biorreator foram a velocidade do consumo das fontes de carbono e a produção de biomassa. Enquanto no experimento anterior (Figura 28) as células assimilaram a glicose em 24 h, neste experimento, a glicose foi assimilada em 92 h e o glicerol não foi totalmente consumido neste mesmo período (Figura 29). A comparação do perfil de crescimento da linhagem JA122 nos dois experimentos (Figura 28 e Figura 29) demonstrou uma maior produção de biomassa no experimento em biorreator, no qual a linhagem produziu cerca de 2.8 vezes mais biomassa do que no experimento anterior (Figura 28 e Figura 29).

A demora no consumo da fonte de carbono pode estar correlacionada com a produção de arabitol e o desbalanço de cofatores. No experimento anterior foi demonstrado que o arabitol é produzido a partir de glicose, o qual pode ser novamente verificado neste experimento. O arabitol continua a ser produzido até o final da batelada, e a glicose ou glicerol continuam a ser consumidos até este ponto (Figura 29). A maior produção de biomassa pode ser explicada pela maior aeração que foi realizada no experimento em biorreator (0.8 v/v.min).

Neste experimento foi demonstrado que o uso de glicerol como fonte de carbono tem potencial na produção de EG a partir de xilose. Novos experimentos podem ser feitos a fim de entender melhor desses dois compostos como coadjuvantes na produção de EG. Como foi mencionado anteriormente, o uso de glicerol é uma alternativa sustentável, que pode ser explorada devido ao potencial da levedura *K. phaffii* de utilizar esse composto como fonte de carbono para a produção de biomassa celular. Otimizações no processo fermentativo devem ser feitas para diminuir os gargalos na via. Ademais, pela primeira vez, a cofermentação de xilose e glicerol foi demonstrada para a produção biotecnológica de EG.

10 CONCLUSÃO

Neste capítulo a produção de EG foi demonstrada em diversos experimentos diferentes e a mesma se mostrou funcional e eficaz nas linhagens testadas. A linhagem transformada com todas as enzimas da via de produção de EG (*K. phaffii* JA122), incluindo a nova enzima XD-HL, foi consolidada como a melhor produtora de EG, produzindo significativamente mais EG do que a linhagem controle (*K. phaffii* JA124). Diferentes condições para a produção de EG foram estudadas e a melhor condição foi verificada como sendo 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose, que possibilitou a produção média máxima de EG de 1.34 g/L, realizada pela linhagem JA122. A existência de enzimas ALDR nativas de *K. phaffii*, capazes de converter glicaldeído em EG de forma semelhante à enzima heteróloga (codificada pelo gene *FucO* de *E. coli*) foi detectada. A partir dos resultados deste capítulo, foi novamente confirmado que a linhagem que mais produz EG carrega o gene *xyIB-hl*, que codifica para a enzima XDH-HL. A capacidade de conversão de EG a AG foi verificada em todas as linhagens de *K. phaffii* estudadas, incluindo a linhagem X-33, indicando a existência de enzimas ALDH nativas. Os metabólitos da via de produção de EG foram identificados. Finalmente, a linhagem JA122 foi cultivada em biorreatores de bancada e o uso de glicerol como cosubstrato fermentativo para a produção de EG foi demonstrado pela primeira vez de maneira que possa possibilitar o seu uso para a produção de EG a partir da via empregada neste trabalho.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este trabalho reporta pela primeira vez a produção de EG a partir de xilose em linhagens de *K. phaffii*. Cinco novas linhagens produtoras de EG foram construídas com todos os genes codificantes para as enzimas da via de produção de EG (XDH, XD, ALDO e ALDR). A tentativa de sanar o principal gargalo da via de produção de EG reportado na literatura (enzimas XD com baixa atividade enzimática) foi realizada através da seleção *in silico* de novas isoenzimas XD. A atividade das novas enzimas XDs foram testadas *in vivo* e a eficácia das mesmas comprovada através de análises qualitativas da presença do intermediário KDX, em LC-MS, e na produção de EG realizada através das novas linhagens de *K. phaffii* construídas.

Análises estatísticas demonstraram que a linhagem *K. phaffii* JA122, construída com o gene *xyID-hl* codificante para a nova enzima XD-HL, identificada no capítulo 1 deste trabalho, produziu significativamente mais EG do que as linhagens controle. A melhor condição para a produção de EG foi a que continha a mesma proporção de açúcares, xilose e glicose (1:1, 20 g/L de ambos), na qual a linhagem JA122 atingiu sua produção média máxima de 1.34 g/L de EG. Neste mesmo experimento, foi verificado que a produção de AG é provavelmente inibida pela presença de glicose (>5 g/L) no meio de cultivo.

No futuro, estudos aprofundados de cinética enzimática serão necessários para entender melhor o funcionamento das novas enzimas XDs selecionadas e utilizadas neste trabalho. Além disso, análise do número de cópias do gene codificante para XD integradas no genoma de *K. phaffii* é essencial para responder se a melhora na produção de EG observada nas novas enzimas em relação aos controles é relacionada ao número de cópias do gene.

A linhagem X-33 foi capaz de produzir EG e AG a partir de glicaldeído, sugerindo a existência de enzima (s) aldeído desidrogenase a aldeído redutase nativa(s) de *K. phaffii*. Para investigar mais a fundo a presença dessas enzimas, 4 novas linhagens de *K. phaffii* foram construídas com toda os genes da via de produção de EG, menos o gene heterólogo *fucO*, que codifica a enzima ALDR. A produção de EG realizada pelas linhagens com a via completa se mostrou 1.7 vezes maior, em média, comprovando a

necessidade de super expressão do gene codificante para a enzima ALDR. A existência de enzimas aldeído desidrogenases (ALDH) nativas também foi comprovada a partir de experimentos contendo EG como substrato, demonstrando a necessidade de deleção dessas enzimas, para que o carbono seja totalmente direcionado para a produção de EG.

A produção de EG foi reportada pela primeira vez em condições de cultivo com a cofermentação de xilose e glicerol em biorreatores. E diversos gargalos foram identificados a partir desse experimento, dentre eles, se destacou o papel da aeração. A presença de oxigênio molecular diminui a produção de EG quando a enzima ALDR, codificada pelo gene *fucO* é expresso em *K. phaffii*. Além disso, o metabolismo celular parece ser redirecionado para a produção de biomassa.

De modo geral, arabitol, xilitol, ácido glicólico e ácido xilônico foram os principais metabólitos acumulados no sobrenadantes dos cultivos celularessendo o arabitol o principal subproduto. A produção de xilitol também chamou a atenção, já que *K. phaffii* não é conhecida por metabolizar xilose com eficiência.

Esses resultados salientam a necessidade de otimizar a expressão das enzimas da via de produção de EG. Modificações moleculares como a super-expressão das enzimas XD e ALDR e deleção de enzimas nativas como a aldeído desidrogenases (ALDH) e xilose redutases (XR) se fazem necessárias. Além disso, a otimização das condições de cultivo também pode ser uma alternativa eficiente para a redução de coprodutos. A avaliação da produção de EG em fermentação contínua, no qual a concentração de glicose permanece constante pode ser uma alternativa para reduzir a formação AG. Outras perspectivas podem envolver a exploração da produção de AG em linhagens heterólogas de *K. phaffii*, esse composto também tem alto valor de mercado e pode ser utilizado como bloco construtor em diversos setores industriais.

Finalmente, *K. phaffii* demonstrou ser uma levedura versátil, com imenso potencial biotecnológico ainda inexplorado. A construção de novas ferramentas moleculares pode acelerar o uso dessa levedura como *chassi* microbiano para engenharia metabólica, facilitando a super expressão e deleção de genes. Técnicas integradas de “multiômicas” podem ser a resposta para melhorar a compreensão do metabolismo secundário dessa

levedura, e expandir ainda mais o *range* de moléculas que podem ser produzidas utilizando *K. phaffii* como modelo.

REFERÊNCIAS

AGILENT TECHNOLOGIES. **pBluescript II phagemid vectors**: instruction manual. [s.l.]: Agilent Technologies, [2008?]. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/212205.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2022.

ALMEIDA, J. R. M. *et al.* Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340-349, apr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.1676>. Acesso em: 4 maio 2021.

ALKIM, C. *et al.* Optimization of ethylene glycol production from (d)-xylose via a synthetic pathway implemented in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 127, p. 1–12, sep. 2015. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-015-0312-7>. Acesso em: 12 ago. 2022

ÁLVAREZ, A. *et al.* Novel method for holocellulose analysis of non-woody biomass wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 189, p. 250–256, jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.043>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA - ABIQUIM. **Demanda por químicos sobe 9,2% no primeiro trimestre de 2021**. 2021. Disponível em: <https://abiquim.org.br/comunicacao/noticia/9514>. Acesso em: 4 maio. 2021.

AUSLÄNDER, S.; AUSLÄNDER, D.; FUSSENEGGER, M. Synthetic biology—the synthesis of biology. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 23, p. 6396–6419, jun. 2017. DOI: 10.1002/anie.201609229.

BAÑARES, A. B. *et al.* Discovering a novel d-xylonate-responsive promoter: the Pyjhl-driven genetic switch towards better 1,2,4-butanetriol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 19, p. 8063–8074, oct. 2019. DOI: 10.1007/s00253-019-10073-0.

BAPTISTA, S. L. *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of top value chemicals from biorefinery carbohydrates. **Biotechnology Advances**, v. 47, jan., p. 107697, 2021. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107697.

BERGMANN, J. C. *et al.* Biotechnological Application of Non-conventional Yeasts for Xylose Valorization. In: SIBIRNY, Andriy (ed.). **Non-conventional Yeasts: from basic research to application**. United States: Springer International Publishing, 2019. p. 23–74. DOI: 10.1007/978-3-030-21110-3_2.

BERNAUER, L. *et al.* Komagataella phaffii as emerging model organism in fundamental research. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–16, jan. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2020.607028.

BETANCUR, M. O. *et al.* Multicopy plasmid integration in *Komagataella phaffii* mediated by a defective auxotrophic marker. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–11, jun. 2017. DOI: 10.1186/s12934-017-0715-8.

BHATIA, S. K. *et al.* Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource Technology**, v. 300, n. 122724, p. 1-48, dec. 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.

BRASKEM. Redução das emissões de CO₂. In: BRASKEM, **Biopolímero Polietileno Verde, inovação transformando plástico em sustentabilidade**. São Paulo: Braskem, [2021?]. Disponível em: https://www.braskem.com.br/Portal/Principal/Arquivos/Download/Upload/Catalogo_PE_Verde.pdf. Acesso em: 6 abr. 2021.

BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals - a review. **Chimia**, v. 69, n. 10, p. 572–581, 2015. DOI: 10.2533/chimia.2015.572.

BUCHERT, J.; VIKARI, L. The role of xylonolactone in xylonic acid production by *Pseudomonas fragi*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 333–336, jan. 1988. DOI: 10.1007/BF00251763.

CABISCOL, E. *et al.* Oxygen regulation of L-1,2-propanediol oxidoreductase activity in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 9, p. 5514–5515, 1990a. DOI: 10.1128/jb.172.9.5514-5515.1990.

CABISCOL, E. *et al.* Oxygen regulation of L-1,2-propanediol oxidoreductase activity in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 9, p. 5514–5515, 1990b. DOI: 10.1128/jb.172.9.5514-5515.1990.

CABULONG, R. B. *et al.* Enhanced yield of ethylene glycol production from D-xylose by pathway optimization in *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 97, p. 11–20, feb. 2017a. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2016.10.020.

CABULONG, R. B. *et al.* Enhanced yield of ethylene glycol production from D-xylose by pathway optimization in *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 97, p. 11–20, feb. 2017b. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2016.10.020.

CABULONG, R. B. *et al.* Engineering *Escherichia coli* for glycolic acid production from D-xylose through the Dahms pathway and glyoxylate bypass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 5, p. 2179–2189, mar. 2018. DOI: 10.1007/s00253-018-8744-8.

CABULONG, R. B. *et al.* Enhanced glycolic acid yield through xylose and cellobiose utilization by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 6, p. 1081-1091, jun. 2021. DOI: 10.1007/s00449-020-02502-6.

CAM, Y. *et al.* Engineering of a Synthetic Metabolic Pathway for the Assimilation of (d)-Xylose into Value-Added Chemicals. **ACS Synth. Biol.**, v. 5, n. 7, p. 607–618, 2016. DOI: 10.1021/acssynbio.5b00103.

CARBONELL, P.; RADIVOJEVIC, T.; GARCÍA MARTÍN, H. Opportunities at the intersection of synthetic biology, machine learning, and automation. **ACS Synthetic Biology**, v. 8, n. 7, p. 1474–1477, 2019. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00540.

CARNEIRO, C. V. G. C. *et al.* Advances in *Komagataella phaffii* engineering for the production of renewable chemicals and proteins. **Fermentation**, v. 8, n. 11, p. 575, out. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation8110575>.

CARUS, M.; RASCHKA, A. Renewable carbon is key to a sustainable and future-oriented chemical industry. **Chemical Fibers International**, dec. 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/329790481_Renewable_Carbon_Is_Key_to_a_Sustainable_and_Future-Oriented_Chemical_Industry. Acesso em: 12 ago. 2022.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS - CGEE. **INT e CGEE abordam tecnologias e políticas para o desenvolvimento de Cidades Sustentáveis**. 2021. Disponível em: <https://www.cgee.org.br/-/int-e-cgee-abordam-tecnologias-e-politicas-para-o-desenvolvimento-de-cidades-sustentaveis>. Acesso em: 4 maio. 2021.

CHAE, T. U. *et al.* Production of Ethylene Glycol from Xylose by Metabolically Engineered *Escherichia coli*. **American Institute of Chemical Engineers (AIChE)**, v. 64, n. 12 jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/aic.16339>.

CHEN, W. *et al.* Co-pyrolysis of lignocellulosic biomass and microalgae: Products characteristics and interaction effect. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 860–868, sep. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.022>.

CHEN, Y. *et al.* Systems and synthetic biology tools for advanced bioproduction hosts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 64, p. 101–109, aug. 2020. DOI: [10.1016/j.copbio.2019.12.007](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.007).

CHI, H. *et al.* Engineering and modification of microbial chassis for systems and synthetic biology. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 25–33, 2019a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.12.001>.

CHI, H. *et al.* Engineering and modification of microbial chassis for systems and synthetic biology. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 25–33, 2019b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.12.001>.

CHOI, S. Y. *et al.* Engineering the xylose-catabolizing Dahms pathway for production of poly(d-lactate-co-glycolate) and poly(d-lactate-co-glycolate-co-d-2-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1353–1364, nov. 2017. DOI: [10.1111/1751-7915.12721](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12721).

CHOMVONG, K. *et al.* Bypassing the pentose phosphate pathway: Towards modular utilization of xylose. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–16, jun. 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158111>. Acesso em: 12 ago. 2022.

CHUNDAWAT, S. P. S. *et al.* Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 121–145, 2011. DOI: [10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205](https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205).

COSTA, P. P. K. G. *et al.* Development and validation of HILIC-UHPLC-ELSD methods for determination of sugar alcohols stereoisomers and its application for bioconversion processes of crude glycerin. **Journal of Chromatography A**, v. 1589, p. 56–64, mar. 2019. DOI: [10.1016/j.chroma.2018.12.044](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.044).

DAHMS, A. S. 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 60, n. 4, p. 1433–1439, out. 1974. DOI: [10.1016/0006-291x\(74\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(74)90358-1).

DE JONG, E. *et al.* **Bio-Based Chemicals: a 2020 update**. Paris: IEA Bioenergy, 2020. Disponível em: <https://task42.ieabioenergy.com/wp->

<content/uploads/sites/10/2020/02/Bio-based-chemicals-a-2020-update-final-200213.pdf>.
Acesso em: 12 ago. 2022.

JUNQUEIRA, A. C. O. *et al.* Loss of a functional mitochondrial pyruvate carrier in *Komagataella phaffii* does not improve lactic acid production from glycerol in aerobic cultivation. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, feb. 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11020483.

DVOŘÁK, P.; KOVÁČ, J.; LORENZO, V. Biotransformation of d-xylose to d-xylonate coupled to medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production in cellobiose-grown *Pseudomonas putida* EM42. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 1273–1283, 1 jul. 2020. DOI: 10.1111/1751-7915.13574.

FAVARO, L.; JANSEN, T.; VAN ZYL, W. H. Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol. **Crit Rev Biotechnol.**, v. 39, n. 6, p. 800–816, jun. 2019. DOI: 10.1080/07388551.2019.1619157.

FISCHER, J. E.; GLIEDER, A. Current advances in engineering tools for *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 59, p. 175–181, oct. 2019. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.06.002.

FRANCOIS, J. M.; ALKIM, C.; MORIN, N. Engineering microbial pathways for production of bio-based chemicals from lignocellulosic sugars: Current status and perspectives. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 118, jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01744-6>. Acesso em: 12 ago. 2022.

GAO, J.; JIANG, L.; LIAN, J. Development of synthetic biology tools to engineer *Pichia pastoris* as a chassis for the production of natural products. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 110–119, may 2021. DOI: 10.1016/j.synbio.2021.04.005.

GASSER, B.; MATTANOVICH, D. A yeast for all seasons – is *Pichia pastoris* a suitable chassis organism for future bioproduction? **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 17, p. 1–4, 2018. DOI: 10.1093/femsle/fny181.

GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS. Global Ethylene Glycol Industry. **Market Report**, p. 189, 2023. Disponível em: https://www.reportlinker.com/p05899447/Global-Ethylene-Glycol-Industry.html?utm_source=GNW. Acesso em: 5 abr. 2021.

GOH, Y. J.; BARRANGOU, R. Harnessing CRISPR-Cas systems for precision engineering of designer probiotic lactobacilli. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 163–171, apr. 2019. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.11.009.

HARHANGI, H. R. et al. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. **Arch Microbiol**, v. 180, n. 2, p. 134–141, aug. 2003. DOI: 10.1007/s00203-003-0565-0.

HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 262, p. 310–318, apr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.099>. Acesso em: 12 ago. 2022.

HEIDER, S. A. E.; WENDISCH, V. F. Engineering microbial cell factories: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* with a focus on non-natural products. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 8, p. 1170–1184, aug. 2015. DOI: 10.1002/biot.201400590.

HEISTINGER, L. et al. Genotypic and phenotypic diversity among *Komagataella* species reveals a hidden pathway for xylose utilization. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, apr. 2022. DOI: 10.1186/s12934-022-01796-3.

HOU, J. et al. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the efficient co-utilization of glucose and xylose. **FEMS yeast research**, v. 17, n. 4, p. 1–11, jun. 2017. DOI: 10.1093/femsyr/fox034.

HUANG, Y. F.; CHIUEH, P.; LO, S. L. A review on microwave pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Sustainable Environment Research**, v. 26, n. 3, p. 103–109, may 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.serj.2016.04.012>. Acesso em: 12 ago 2022.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES. Codon optimization tool: synthetic gene design made easy. 2023. Disponível em: <https://www.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool>. Acesso em: 12 ago. 2022

INVITROGEN. **pGAPZ A, B, and C pGAPZ α A, B, and C Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins**: user manual. [s. l.]: Thermofisher Scientific, 2010. Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pgapz_man.pdf. Acesso em: 12 ago. 2022.

JAGTAP, S. S.; RAO, C. V. Microbial conversion of xylose into useful bioproducts. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 102, n. 21, p. 9015–9036, nov. 2018. DOI: 10.1007/s00253-018-9294-9.

JEFFRIES, T. W. **Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi**. Pentoses and Lignin. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 27, p. 1-32, 1983. DOI: 10.1007/BFb0009101.

JIANG, Y. *et al.* Characterization of D-xylonate dehydratase yjhG from escherichia coli. **Bioengineered**, v. 6, n. 4, p. 227–232, 2015. DOI: 10.1080/21655979.2015.1040208.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresour Technol**, v. 199, p. 103–112, oct. 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.009.

KATAOKA, M.; SASAKI, M.; HIDALGO, A.-R. G. D. Glycolic acid production using ethylene glycol-oxidizing microorganisms. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 65, n. 10, p. 2265–2270, oct. 2001. DOI: 10.1271/bbb.65.2265.

KOMATSU, M. *et al.* Genome-minimized Streptomyces host for the heterologous expression of secondary metabolism. **PNAS**, v. 107, n. 6, p. 2646–2651, jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0914833107>.

KWAK, S.; JIN, Y. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered Saccharomyces cerevisiae: a review and perspective. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–15, may 2017. DOI: 10.1186/s12934-017-0694-9.

LEE, H. The structure and function of yeast xylose (aldose) reductases. **Yeast**, v. 14, n. 11, p. 977–984, aug. 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0061(199808)14:11<977::AID-YEA302>3.0.CO;2-J.

LEE, J. W. *et al.* Engineering xylose metabolism in yeasts to produce biofuels and chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 67, p. 15–25, feb. 2021. DOI: 10.1016/j.copbio.2020.10.012.

LEE, S. Y.; KIM, H. U. Systems strategies for developing industrial microbial strains. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 1061–1072, oct. 2015. DOI: 10.1038/nbt.3365.

LIU, H. *et al.* Biosynthesis of ethylene glycol in Escherichia coli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 8, p. 3409–3417, apr. 2013a. DOI: 10.1007/s00253-012-4618-7.

LIU, H. *et al.* Biosynthesis of ethylene glycol in Escherichia coli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 8, p. 3409–3417, apr. 2013b. DOI: 10.1007/s00253-012-4618-7.

LIU, X. *et al.* Anaerobic digestion of lignocellulosic biomasses pretreated with Ceriporiopsis subvermispora. **Journal of Environmental Management**, v. 193, p. 154–162, maio 2017. DOI: 10.1016/j.jenvman.2017.01.075.

LIU, Z.; ZHANG, Y.; NIELSEN, J. Synthetic Biology of Yeast. **Biochemistry**, v. 58, n. 11, p. 1511–1520, mar. 2019. DOI: 10.1021/acs.biochem.8b01236.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. RIA M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 44–49, 2015. DOI: 10.1016/j.cofs.2014.10.001.

MARTÍNEZ-GARCÍA, E.; DE LORENZO, V. Molecular tools and emerging strategies for deep genetic/genomic refactoring of *Pseudomonas*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 47, p. 120–132, oct. 2017. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.06.013.

MCCARTY, N. S.; LEDESMA-AMARO, R. Synthetic biology tools to engineer microbial communities for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 181–197, 2019. DOI: DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.11.002.

MELO, N. T. M. *et al.* Effect of pyruvate decarboxylase knockout on product distribution using *pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) engineered for lactic acid production. **Bioengineering**, v. 5, n. 1, p. 1–13, feb. 2018a. DOI: 10.3390/bioengineering5010017.

MELO, N. T. M. *et al.* Effect of pyruvate decarboxylase knockout on product distribution using *pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) engineered for lactic acid production. **Bioengineering**, v. 5, n. 1, p. 1–13, feb. 2018b. DOI: 10.3390/bioengineering5010017.

MURANAKA, Y. *et al.* Lignin-based resin production from lignocellulosic biomass combining acidic saccharification and acetone-water treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 308, p. 754–759, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.09.117>.

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. Sobre o nosso trabalho para alcançar os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil. 2023. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 12 ago. 2022.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. IlvD/Edd family dehydratase [*Brevundimonas subvibrioides*]. 2023. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_013269499.1?report=genbank&log\\$=protopp&blast_rank=1&RID=6D0CE5WB016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_013269499.1?report=genbank&log$=protopp&blast_rank=1&RID=6D0CE5WB016). Acesso em: 12 ago. 2022.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. IlvD/Edd family dehydratase [*Halomonas lutea*]. 2023. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_019016838.1?report=genbank&log\\$=protopp&blast_rank=1&RID=6D04W8RD013](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_019016838.1?report=genbank&log$=protopp&blast_rank=1&RID=6D04W8RD013). Acesso em: 12 ago. 2022.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. IivD/Edd family dehydratase [Nitrospirillum amazonense]. 2023. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_004274215.1?report=genbank&log\\$=prottop&blast_rank=1&RID=6CX4SDU701N](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_004274215.1?report=genbank&log$=prottop&blast_rank=1&RID=6CX4SDU701N). Acesso em: 12 ago. 2022.

NIELSEN, J. Systems biology of metabolism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 245–275, jun. 2017. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-044757.

NUNN, C. E. M. *et al.* Metabolism of pentose sugars in the hyperthermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus* and *Sulfolobus acidocaldarius*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 44, p. 33701–33709, 2010. DOI: 10.1074/jbc.M110.146332.

ØSTBY, H. *et al.* Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 47, n. 9-10, p. 623-657, aug. 2020. DOI: 10.1007/s10295-020-02301-8.

PEREIRA, B. *et al.* Efficient utilization of pentoses for bioproduction of the renewable two-carbon compounds ethylene glycol and glycolate. **Metabolic Engineering**, v. 34, p. 80–87, mar. 2016. DOI: 10.1016/j.ymben.2015.12.004.

PHYLLIS2. Database for the physico-chemical composition of (treated) lignocellulosic biomass, micro- and macroalgae, various feedstocks for biogas production and biochar. 2021. Disponível em: <https://phyllis.nl/>. Acesso em: 15 mar. 2021.

PICHIA TECHNOLOGY FORM RCT. **Pichia Produced Products on the Market**. 2022. Disponível em: <https://pichia.com/science-center/commercialized-products/>. Acesso em: 12 ago. 2022.

PRIELHOFER, R. *et al.* GoldenPiCS: a golden gate-derived modular cloning system for applied synthetic biology in the yeast *Pichia pastoris*. **BMC Systems Biology**, v. 11, n. 1, p. 1–14, dec. 2017. DOI: 10.1186/s12918-017-0492-3.

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

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

- RAUD, M. *et al.* Dependence of the hydrolysis efficiency on the lignin content in lignocellulosic material. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 37, p. 16338–16343, out. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.190>.
- REBNEGGER, C. *et al.* *Pichia Pastoris* exhibits high viability and a low maintenance energy requirement at near-zero specific growth rates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 15, p. 4570–4583, jul. 2016. DOI: 10.1128/AEM.00638-16.
- ROBZYK, K.; KASSIR, Y. A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 14, p. 3790, jul. 1992. DOI: 10.1093/nar/20.14.3790.
- ROSENFELD, S. A.; STEVIS, P. E.; HO, N. W. Cloning and characterization of the xyl genes from *Escherichia coli*. **Mol Gen Genet**, v. 194, n. 3, p. 410–415, 1984. DOI: 10.1007/BF00425552.
- SALUSJÄRVI, L. *et al.* Production of ethylene glycol or glycolic acid from D-xylose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 22, p. 8151–8163, nov. 2017. DOI: 10.1007/s00253-017-8547-3.
- SALUSJÄRVI, L. *et al.* Biotechnological production of glycolic acid and ethylene glycol: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 6, p. 2525–2535, feb. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09640-2>. Acesso em: 12 ago. 2022.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. M. **Molecular cloning: a laboratory manual**. V. 3. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SCHELLENBERG, G. D. *et al.* Xylose isomerase from *Escherichia coli*. Characterization of the protein and the structural gene. **J Biol Chem**, v. 259, n. 11, p. 6826–6832, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39802-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39802-2).
- SCHNEIDER, H. *et al.* Physiological properties of a mutant of *Pachysolen tannophilus* deficient in NADPH-dependent D-xylose reductase. **Appl Environ Microbiol**, v. 55, n. 11, p. 2877–2881, 1989. DOI: 10.1128/aem.55.11.2877-2881.1989.
- 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. DOI: 10.1128/JB.01438-06.
- SUN, T. *et al.* Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce fuels and chemicals from xylose: a review. **Bioresource Technology**, v. 337, p. 125484, oct. 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125484.

ŚWIĄTEK, K. *et al.* Acid hydrolysis of lignocellulosic biomass: sugars and furfurals formation. **Catalysts**, v. 10, n. 4, p. 1–18, 2020. DOI: 10.3390/catal10040437.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Invitrogen. **One Shot™ TOP10 Electrocomp™ E. coli**. 2006a. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C404050>. Acesso em: 12 ago. 2022.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Invitrogen. **pGAPZ A, B, and C pGAPZ α A, B, and C Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins**: user manual. [s. l.]: Thermofisher Scientific, 2010. Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pgapz_man.pdf. Acesso em: 12 ago. 2022.

TOIVARI, M. H. *et al.* Microbial d-xylonate production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 1–8, aug. 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-4288-5.

TOMÁS-GAMISANS, M.; FERRER, P.; ALBIOL, J. Fine-tuning the *P. pastoris* iMT1026 genome-scale metabolic model for improved prediction of growth on methanol or glycerol as sole carbon sources. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 224–237, 2018. DOI: 10.1111/1751-7915.12871.

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

URANUKUL, B. *et al.* Biosynthesis of monoethylene glycol in *Saccharomyces cerevisiae* utilizing native glycolytic enzymes. **Metabolic Engineering**, v. 51, sep. 2018, p. 20–31, jan. 2019. DOI: 10.1016/j.ymben.2018.09.012.

VALDEHUESA, K. N. G. *et al.* Everyone loves an underdog: metabolic engineering of the xylose oxidative pathway in recombinant microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 18, p. 7703–7716, sep. 2018. DOI: DOI: 10.1007/s00253-018-9186-z.

VALDIVIA, M. *et al.* Biofuels 2020: biorefineries based on lignocellulosic materials. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 585–594, 2016. DOI: 10.1111/1751-7915.12387.

VIEIRA, F. S. **Desenvolvimento de métodos baseados em espectrometria de massas e cromatografia líquida para análise de compostos químicos produzidos por bioconversão de glicerina**. 2018.

Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2018. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/items/7ee97e7c-69df-47ed-8742-549f820af60c>. Acesso: 12 ago. 2022.

VU, H. P. *et al.* A comprehensive review on the framework to valorise lignocellulosic biomass as biorefinery feedstocks. **Sci Total Environ.**, v. 15, n. 743, 15 nov. 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140630.

WANG, J. *et al.* Methanol-Independent Protein Expression by AOX1 promoter with trans-acting elements engineering and glucose-glycerol-shift induction in *Pichia pastoris*. **Scientific Reports**, v. 7, feb. 2017. DOI: 10.1038/srep41850.

WANG, X. *et al.* D-1,2,4-Butanetriol production from renewable biomass with optimization of synthetic pathway in engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 406–412, feb. 2018a. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.11.062.

WANG, Y. *et al.* **Biosynthesis of ethylene glycol from d-xylose in recombinant escherichia coli.** **Bioengineered**, v. 9, n. 1, p. 233-241, 2018b. DOI: 10.1080/21655979.2018.1478489.

WEIMBERG, R. Pentose oxidation by *Pseudomonas fragi*. **The Journal of biological chemistry**, v. 236, n. 3, p. 629–635, 1961. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818642796/pdf?md5=ab61b23253798cce3550b67afba58d4&pid=1-s2.0-S0021925818642796-main.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2022.

WEN, J. *et al.* A synthetic malonyl-coa metabolic oscillator in *Komagataella phaffii*. **ACS Synthetic Biology**, v. 9, n. 5, p. 1059–1068, may 2020. DOI: 10.1021/acssynbio.9b00378.

YAN, Y. *et al.* Transcriptome characterization and expression profile of defense-related genes in pear induced by *Meyerozyma guilliermondii*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 141, 63–70, feb. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.03.011>.

YU, J. *et al.* Cellulose, xylan and lignin interactions during pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Fuel**, v. 191, p. 140–149, mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.11.057>.

YU, T. *et al.* Strategies and challenges for metabolic rewiring. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 15, p. 30–38, jun. 2019. DOI: 10.1016/j.coisb.2019.03.004.

ZAHRL, R. J. *et al.* Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 7, p. 1–15, nov. 2017. DOI: 10.1093/femsyr/fox068.

ZHANG, Y.; LIU, D.; CHEN, Z. Production of C2-C4 diols from renewable bioresources: New metabolic pathways and metabolic engineering strategies. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 1–20, dec. 2017. DOI: 10.1186/s13068-017-0992-9.

ZHANG, Z. *et al.* Ethylene glycol and glycolic acid production from xylonic acid by *Enterobacter cloacae*. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 89, p. 1–16, apr. 2020. DOI: 10.1186/s12934-020-01347-8.

ZHAO, Z. *et al.* Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 21, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1662-x>. Acesso em: 12 ago. 2022.

ZHUANG, X. *et al.* Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresource Technol.**, v. 199, p. 68–75, aug. 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.051.

ANEXO A - Sequências de DNA codificantes para os genes utilizados

Genes da via implementada em *Komagataella phaffii* para a produção de Etileno glicol

1) Genes codificantes para xilose desidrogenases (XDH)

Genes já descritos na patente BR102018001359-9_870180005782 (Embrapa Agronegria)

Sequências proteicas:

>XDH-BS: gi|302384049|ref|YP_003819872.1| short-chain dehydrogenase/reductase SDR [Brevundimonas subvibrioides ATCC 15264]

MSGAVYPSLKGRLVVVTGGGSGIGAALTEGFARQGARVIFLDRAEAEARELAERLADC
SPGPVFRSCDLLDLGALQTALAGIMAEHGPIDVLLNNAANDDRHTLAEVTPAYWDDRI
GVNLRHLYFAAQAVAPGMRARGRGVILNLGSIWHLGLPDL SIYETAKAGIEGMTRALA
RELGTDGVRVACIVPGNVRTPRQMKWYTPEGEAEIVAAQCLKGRIEPQDVAALALFLA
SDDARFITGHEYFVDAGWR

>XDH-AM: gi|490398293|ref|WP_004274213.1| 3-oxoacyl-ACP reductase [Azospirillum amazonense] >gi|346917558|gb|EGX99884.1| short-chain dehydrogenase/reductase SDR [Azospirillum amazonense Y2]

MGKPFPGPEYIMTHAIYPSLQGKRIVVTGGGSGIGAAITEAFVRQGAQVSFLDIAETDS
RALEQSLAEGAAHAPKFYKCDLTNLDQLKATLAEIQNAGPVDVLVNNNAANDDRHTIEQI
TPEYWDNRMAVNLRHMFFASQAVVPGMKAQRSGAIINFGSISWHVALPELLMYQTAK
AGIEGMTRSLARDLGEHNVRVTCVVPGGV RTERQMRLWHNP EEEARILSQQCLKERV
DPPHVAAMVLFLASDDGRMCTSHEYFVDAGWR

>XDH-MN: gi|522141217|ref|WP_020652426.1| hypothetical protein [Massilia niastensis]
MSDTSQQDLIYAVY PDLAGKR VVVTGGGSGIGAELVAAFAGQGARVWFLDIAEEAGR
ALAASLAESVDGPRHAPRFIKCDLTDLAALKA AFEDIEGEAGGVDILLNNAANDDRHDIE
EVTPAYWENRMNVNLRHQFFCSQAVIPGMKKQGDGVILNFGSISWHLPHTELSLYMT
AKAAIEGMTRGMARDLGKYGIRASTVVP GAVRTPRQQALWHTPEEEARILAGQCLPA
RVEMQDVAALSLFLASSNGRRC SGREYFVDAGWYGA

>XDH-HL: gi|517846638|ref|WP_019016846.1| 3-oxoacyl-ACP reductase [Halomonas lutea]

MTHPSARYPSLEQRVVFITGGGSGIGAALTRAFHRQGARVVFVDIAKEASKALVEE LEL
ETGRAPCFEFCDIRDVEALQSTIVRVGETLGPIRVLINNAANDDRHDWRD VDVAYWDE
RMSLNLRPMFFTIQAVAEQMREAGGSIINFGSISVRLALGDMAAYVSAKAAVHGLTR
SLARDLGPHGIRVNTLVPGSV MTERQLEKWIGPEDEANIQAHQCLKVRLEAEHIAPAAL
FLAADD SAQISAQEIPVDGGWG

2) Genes codificantes para D-xilonato desidratases

SEQ nº1

>xylD: D-Xylonate dehydratase, NCBI - Reference Sequence: NC_011916.1:c941471-939696 *Caulobacter crescentus* NA1000, complete genome

ATGTCTAACCGCACGCCCCGCGGTTCCGGTCCCGCGATTGGTTCGATAACCCCG
 ACCATATCGACATGACCGCGCTCTATCTGGAGCGCTTCATGAACTACGGGATCAC
 GCCGGAGGAGCTGCGCAGCGGCAAGCCGATCATCGGCATCGCCCAGACCGGCA
 GCGACATCTCGCCCTGCAACCGCATCCACCTGGACCTGGTCCAGCGGGTGCGGG
 ACGGGATCCGCGACGCCGGGGGCATCCCCATGGAGTTCGGTCCATCCGATCT
 TCGAGAACTGCCGTCGCCCGACGGCGGCGCTGGACCGGAACCTCTCGTACCTGG
 GTCTCGTCGAGACCCTGCACGGCTATCCGATCGACGCCGTGGTTCTGACCACCGG
 CTGCGACAAGACCACCCCGGCCGGGATCATGGCCGCCACCACGGTCAATATCCC
 GGCCATCGTGCTGTCGGGCGGCCCGATGCTGGACGGCTGGCACGAGAACGAGCT
 CGTGGGCTCGGGCACCGTGATCTGGCGCTCGCGCCGCAAGCTGGCGGCCGGCG
 AGATCACCGAGGAAGAGTTCATCGACCGCGCCGCCAGCTCGGCGCCGTGCGCGG
 GCCACTGCAACACCATGGGCACGGCCTCGACCATGAACGCCGTGGCCGAGGCGC
 TGGGCCTGTGCTGACCGGCTGCGCGGCCATCCCCGCCCCCTACCGCGAGCGCG
 GCCAGATGGCCTACAAGACCGGCCAGCGCATCGTTCGATCTGGCCTATGACGACGT
 CAAACCGCTCGACATCCTGACCAAGCAAGCCTTCGAGAACGCCATCGCCCTGGTG
 GCGGCGGCCGGCGGCTCGACCAACGCCAGCCGCACATCGTGGCCATGGCCCG
 TCACGCCGGCGTCGAGATCACCGCCGACGACTGGCGCGCGGCCTATGACATCCC
 GCTGATCGTCAACATGCAGCCGGCCGGCAAGTATCTGGGCGAGCGCTTCCACCG
 AGCCGGCGGCGCGCCGGCGGTGCTGTGGGAGCTGTTGCAGCAAGGCCGCCTGC
 ACGGCGACGTGCTGACCGTCACCGGCAAGACGATGAGCGAGAACCTGCAAGGCC
 GCGAAACCAGCGACCGCGAGGTGATCTTCCCGTACCACGAGCCGCTGGCCGAGA
 AGGCCGGGTTCTGGTTCTCAAGGGCAACCTCTTCGACTTCGCGATCATGAAGTC
 CAGCGTGATCGGCGAGGAGTTCGCAAGCGCTACCTGTGCGAGCCCGGCCAGGA
 AGGCGTGTTGCAAGCCCGCGCCATCGTGTTCGACGGCTCGGACGACTATCACAA
 CGGATCAACGATCCGGCCCTGGAGATCGACGAGCGCTGCATCCTGGTGATCCGC
 GGCGCGGGTCCGATCGGCTGGCCCGGCTCGGCCGAGGTCGTCAACATGCAGCC
 GCCGGATCACCTTCTGAAGAAGGGGATCATGAGCCTGCCACCCTGGGCGATGG
 CCGTCAGTCGGGCACCGCCGACAGCCCCTCGATCCTGAACGCCTCGCCCGAAAG
 CGCGATCGGCGGCGGCCTGTGCTGGCTGCGCACCGGCGACACCATCCGCATCGA
 CCTCAACACCGGCCGCTGCGACGCCCTGGTTCGACGAGGCGACGATCGCCGCGC
 GCAAGCAGGACGGCATCCCGGCGGTTCCCGCCACCATGACGCCCTGGCAGGAAA
 TCTACCGCGCCCACGCCAGTCAGCTCGACACCGGCGGCGTGCTGGAGTTCGCGG
 TCAAGTACCAGGACCTGGCGGCCAAGCTGCCCCGCCACAACCACTGA

>YP_002516235.1 xylonate dehydratase xylD [*Caulobacter vibrioides* NA1000]
 MSNRTPRRFRSRDWFDPDHIDMTALYLERFMNYGITPEELRSGKPIIGIAQTGSDISP
 CNRIHLDLVQRVRDGI RDAGGIPMEFPVHPIFENCRRPTAALDRNLSYLGLVETLHGYP
 DAVVLTGCDKTTTAPAGIMAATTVNIPAVLSGGPMLDGHENELVSGTVIWRSRRL
 AAGEITEEFIDRAASSAPSAGHCNTMGTASTMNAVAEALGLSLTGCAAIPAPYRERG
 QMAYKTGQRIVDLAYDDVKPLDILTKQAFENAIALVAAAGGSTNAQPHIVAMARHAGVE
 ITADDWRAAYDIPLIVNMQPAGKYLGERFHRAGGAPAVLWELLQQGRLHGDVLTVTGK

TMSENLQGRETSDREVIFPYHEPLAEKAGFLVLKGNLDFDFAIMKSSVIGEEFRKRYLSQ
 PGQEGVFEARAIVFDGSDDYHKRINDPALEIDERCILVIRGAGPIGWPGSAEVVNMQPP
 DHLLKKGIMSLPTLGDGRQSGTADSPSILNASPESAIGGGLSWLRTGDTIRIDLNTGRC
 DALVDEATIAARKQDGIPAVPATMTPWQEIYRAHASQLDGTGGVLEFAVKYQDLAAKLP
 RHNH

>Sequência de nucleotídeos otimizada para expressão em *K. phaffii*

ATGTCCAACAGGACCCCAAGACGTTTCAGATCCAGAGATTGGTTCGATAACCCAGA
 CCACATTGACATGACCGCCTTGTACTTGGAGAGATTCATGAACTACGGTATCACCC
 CAGAGGAACTGAGATCCGGTAAGCCAATTATTGGTATCGCTCAGACTGGTTCGA
 CATCTCTCCATGTAACAGAATCCACTTGGACTTGGTCCAGAGGGTCAGAGATGGTA
 TTAGAGATGCTGGTGGTATCCCAATGGAATTTCCAGTGCACCCAATCTTCGAGAAC
 TGTAGAAGGCCAACTGCTGCCTTGGACAGAACTTGTCTTACTTGGGTCTTGTCTGA
 GACTCTGCACGGTTACCCAATTGACGCTGTTGTTTTGACTACCGGTTGCGACAAGA
 CTACTIONCAGCTGGTATTATGGCTGCTACCACCGTTAACATCCCAGCCATCGTTTTG
 TCTGGTGGTCCAATGTTGGATGGTTGGCACGAAAACGAATTGGTCGGTTCGGGTA
 CTGTCATTTGGAGATCCAGAAGAAAGTTGGCTGCTGGTGAGATCACTGAGGAAGA
 GTTTATTGACAGAGCTGCTTCTTCTGCTCCATCCGCTGGTCACTGTAACACTATGG
 GACTGCTTCCACTATGAACGCTGTTGCTGAGGCTTTGGGTTTGTCTTACTGGT
 TGTGCTGCTATTCCAGCTCCATACAGAGAAAGGGGTCAGATGGCTTACAAGACCG
 GTCAAAGAATCGTTGACTTGGCCTACGATGACGTCAAGCCATTGGACATCTTGACT
 AAGCAGGCTTTCGAGAACGCTATCGCTTTGGTTGCTGCAGCTGGTGGTTCTACTAA
 TGCTCAACCACACATCGTTGCTATGGCTAGACACGCTGGTGGTTGAGATTACTGCTG
 ATGATTGGAGAGCTGCCTACGACATCCCATTGATCGTTAACATGCAACCAGCCGGT
 AAGTACCTGGGTGAAAGATTTTCATAGAGCCGGTGGTGGTCCAGCTGTTTTGTGGG
 AATTATTGCAGCAGGGTAGATTGCACGGTGACGTTTTGACTGTTACTGGTAAGACC
 ATGTCCGAGAACCTGCAAGGTAGAGAACTTCCGACAGAGAGGTCATCTTCCCATA
 CCATGAACCATTGGCTGAGAAGGCCGGTTTTCTTGGTTTTGAAGGGTAACTTGTTCCG
 ACTTCGCCATCATGAAGTCCTCCGTCATTGGTGAAGAGTTCAGAAAGAGATACTTG
 TCCCAGCCAGGTCAAGAGGGTGTTTTTTGAAGCTAGAGCTATCGTGTTCCGACGGTTC
 TGATGATTACCACAAGAGAATCAACGACCCCGCCTTGGAAATTGACGAGAGATGTA
 TCTTGGTCATCAGAGGTGCTGGTCCAATTGGTTGGCCAGGTTCTGCTGAAGTTGTC
 AACATGCAGCCACCAGACCACTTGTGTAAGAAAGGTATTATGTCCCTGCCAACTCT
 TGGTGACGGTAGACAATCTGGAAGTCTGACTCTCCATCCATCTTGAACGCTTCTC
 CAGAATCCGCTATTGGTGGTGGTTTTGTCTTGGTTGAGAACTGGTGACACCATCAGA
 ATCGACCTGAACACTGGTAGATGTGACGCCTTGGTTGACGAGGCTACTATTGCTGC
 TAGAAAGCAGGATGGTATTCCAGCCGTTCCAGCTACTATGACTCCATGGCAAGAAA
 TCTACAGAGCCCACGCTTCTCAATTGGACACTGGTGGTGGTTTTGGAGTTCGCCGTT
 AAGTACCAAGACTTGGCTGCTAAGTTGCCTAGACACAACCACTAA

SEQ nº 2

>YjhG: D-Xylonate dehydratase, BioCYC - Escherichia coli K-12 substr. MG1655.
 Chromosome, Region: 4522127 - 4524094 (reverse complement)

ATGTCTGTTGCAATATTTTTGCTGACGAGAGCCACGATATTTACACCGTCAGAAC
 GCACGCCGATGGCCCGGACGGCGAACTCCCATTAACCGCAGAGATGCTTATCAAC
 CGCCCGAGCGGGGATCTGTTCCGGTATGACCATGAATGCCGGAATGGGTTGGTCTC
 CGGACGAGCTGGATCGGGACGGTATTTTACTGCTCAGTACACTCGGTGGCTTACG
 CGGCGCAGACGGTAAACCCGTGGCGCTGGCGTTGCACCAGGGGCATTACGAACT
 GGACATCCAGATGAAAGCGGGCGGCCGAGGTTATTAAAGCCAACCATGCCCTGCC
 TATGCCGTGTACGTCTCCGATCCTTGTGACGGGCGTACTCAGGGTACAACGGGGA
 TGTTTGATTGCTACCATAACGAAATGACGCATCGATGGTAATGCGCCGCCTTATT
 CGCTCTCTGCCCGACGCGAAAGCAGTTATTGGTGTGGCGAGTTGCGATAAGGGGC
 TTCCGGCCACCATGATGGCACTCGCCGCGCAGCACAACATCGCAACCGTGCTGGT
 CCCC GGCGGCGCAGCTGCCCGCAAAGGATGGAGAAGACAACGGCAAGGTGC
 AAACCATTGGCGCACGCTTCGCCAATGGCGAATTATCTCTACAGGACGCACGCCG
 TGCGGGCTGTAAAGCCTGTGCCTCTTCCGGCGGCGGGCTGTCAATTTTTGGGCACT
 GCCGGGACATCTCAGGTGGTGGCCGAAGGATTGGGACTGGCAATCCCACATTCA
 GCCCTGGCCCCTTCCGGTGAGCCTGTGTGGCGGGAGATCGCCAGAGCTTCCGCG
 CGAGCTGCGCTGAACCTGAGTCAAAAAGGCATCACCACCCGGGAAATTCTCACCG
 ATAAAGCGATAGAGAATGCGATGACGGTCCATGCCGCGTTCGGTGGTTCAACAAA
 CCTGCTGTTACACATCCCGGCAATTGCTCACCAGGCAGGTTGCCATATCCCGACC
 GTTGATGACTGGATCCGCATCAACAAGCGCGTGCCCCGACTGGTGAGCGTACTGC
 CTAATGGCCCGGTTTATCATCCAACGGTCAATGCCTTTATGGCAGGTGGTGTGCCG
 GAAGTCATGTTGCATCTGCGCAGCCTCGGATTGTTGCATGAAGACGTTATGACGGT
 TACGGGCAGCACGCTGAAAGAAAACCTCGACTGGTGGGAGCACTCCGAACGGCG
 TCAGCGGTTCAAGCAACTCCTGCTCGATCAGGAACAAATCAACGCTGACGAAGTG
 ATCATGTCTCCGCAGCAAGCAAAAAGCGCGCGGATTAACCTCAACTATCACCTTCCC
 GGTGGGCAATATTGCGCCAGAAGGTTCCGGTGATCAAATCCACCGCCATTGACCCC
 TCGATGATTGATGAGCAAGGTATCTATTACCATAAAGGTGTGGCGAAGGTTTATCT
 GTCCGAGAAAAGTGCGATTTACGATATCAAACATGACAAGATCAAGGCGGGCGAT
 ATTCTGGTCATTATTGGCGTTGGACCTTCAGGTACAGGGATGGAAGAAACCTACCA
 GGTTACCAGTGCCCTGAAGCATCTGTCATACGGTAAGCATGTTTTCGTTAATCACCG
 ATGCACGTTTCTCGGGCGTTTCTACTGGCGCGTGCATCGGCCATGTGGGGCCAGA
 AGCGCTGGCCGGAGGCCCCATCGGTAAATTACGCACCGGGGATTTAATTGAAATT
 AAAATTGATTGTCGCGAGCTTCACGGCGAAGTCAATTCCTCGGAACCCGTAGCGA
 TGAACAATTACCTTCACAGGAGGAGGCAACTGCAATATTAATGCCAGACCCAGCC
 ATCAGGATTTACTTCCCGATCCTGAATTGCCAGATGATACCCGGCTATGGGCAATG
 CTTCAGGCCGTGAGTGGTGGGACATGGACCGGTTGTATTTATGATGTAAACAAAAT
 TGCGCGGGCTTTGCGCGATTTTATGAATAAAAACCTGA

>sp|P39358|YJHG_ECOLI D-xylonate dehydratase YjhG OS=Escherichia coli (strain K12) OX=83333 GN=yjhG PE=1 SV=2 (uniprot)

MSVRNIFADESHDIYTVRTHADGPDGELPLTAEMLINRPSGDLFGMTMNAAGMGWSPD
 ELDRDGILLSTLGGLRGADGKPVALALHQGHYELDIQMKAAA EVIKANHALPYAVYVS
 DPCDGR TQGTGMFDSL PYRNDASMVMRRLIRSLPDAKAVIGVASCDKGLPATMMAL
 AAQHNIATVLPGGATLPAKDGEDNGKVQTIGARFANGELSLQDARRAGCKACASSG
 GGCQFLGTAGTSQVVAEGLGLAIPHSALAPSGEPVWREIARASARAALNLSQKGITTR
 EILTDKAIENAMTVHAAF GGSTNLLLHIPAIAHQAGCHIPTVDDWIRINKRVPRLVSVLPN
 GPVYHPTVNAFMAGGVPEVMLHLRSLGLLHEDVMTVTGSTLKENLDWWEHSERRQR

FKQLLLDQEQINADEVIMSPQQAKARGLTSTITFPVGNIAPEGSVIKSTAIDPSMIDEQGI
 YYHKGVAKVYLSEKSAIYDIKHDKIKAGDILVIIGVGPSGTGMEETYQVTSALKHLSYGK
 HVSLITDARFSGVSTGACIGHVGPEALAGGPIGKLRTGDLIEIKIDCRELHGEVNFLGTR
 SDEQLPSQEEATAILNARPSHQDLLPDELPDDRLWAMLQAVSGGTWTGCIYDVNKI
 GAALRDFMKNK

>Sequência de nucleotídeos otimizada para expressão em *K. phaffii*

ATGTCCGTCCGTAACATCTTCGCTGACGAATCTCACGACATCTACACCGTTAGAAC
 TCACGCTGATGGTCCAGATGGTGAAGTGGCATTGACTGCTGAGATGCTGATTAACA
 GACCATCCGGTGACTTGTTCCGGTATGACTATGAACGCTGGTATGGGTTGGTCCCC
 AGATGAATTGGACAGAGATGGTATCTTGCTGCTGTCCACTCTTGGTGGTTTGAGAG
 GTGCTGATGGTAAGCCAGTTGCTTTGGCATTGCATCAAGGTCACTACGAGTTGGAC
 ATCCAGATGAAGGCTGCTGCTGAGGTTATTAAGGCTAACCACGCTTTGCCATACGC
 CGTCTACGTTTCTGATCCATGTGACGGTAGAACTCAGGGTACTACTGGTATGTTCCG
 ACTCCTTGCCATACAGAAACGACGCCTCCATGGTCATGAGAAGATTGATCAGATCC
 TTGCCAGACGCCAAGGCTGTTATTGGTGGTGGTCTTCTTGACAAAGGGTTTGCCAGC
 TACTATGATGGCTTTGGCTGCTCAGCACAACTTGGCCTGTTTTGGTTCAGGTG
 GTGCTACTTTGCCTGCTAAGGATGGTGAAGATAACGGTAAGGTTCCAGACTATCGGT
 GCCAGATTCCGCTAACGGTGAATTGTCCTTGCAAGATGCTAGACGTGCTGGTTGTAA
 GGCTTGTGCTTCTTCTGGTGGTGGTGGTGTGAGTTTTGGTACTGCCGGTACTTCCC
 AGGTTGTTGCTGAAGGTTTGGGTCTTGCTATTCCACACTCTGCTTTGGCTCCATCT
 GGTGAACCAGTTTGGAGAGAGATTGCTAGAGCTTCCGCTAGAGCTGCTTTGAACTT
 GTCCCAGAAGGGTATCACTACCAGAGAGATCCTGACTGACAAGGCTATCGAGAAC
 GCTATGACTGTTACGCTGCTTTTGGTGGTTCACCAACTTGTGTTGCACATCCC
 AGCTATTGCTCACCAAGCTGGTTGTACATTCCAAGTGTGACGACTGGATCAGGA
 TCAACAAGAGAGTCCCAAGATTGGTTTTCCGTCTTGCCAAACGGTCCAGTTTACCAT
 CCTACTGTCAACGCTTTTATGGCCGGTGGTGGTCCAGAAGTCATGTTGCATTTGAG
 ATCCTTGGGTTTGTGACGAGGACGTTATGACCGTACTGGTTCACACTCTGAAAG
 AAACTTGGACTGGTGGGAACACTCCGAGAGAAGGCAAAGATTCAAGCAGTTGCT
 GTTGGACCAAGAGCAGATTAACGCTGACGAGGTTATCATGTCCCACAACAAGCTA
 AGGCCAGAGGTTTACTTCCACCATCACTTTCCAGTCCGGTAACATTGCTCCAGAG
 GGTTCCGTTATTAAGTCCACTGCTATTGACCCATCCATGATCGACGAGCAAGGTAT
 CTACTATCACAAGGGTGTGCCAAGGTTTACCTGTCTGAAAAGTCTGCCATCTACG
 ACATCAAGCACGACAAGATTAAGGCCGGTGACATCTTGGTTATCATCGGTGTTGGT
 CCATCCGGAAGTGGTATGGAAGAGACTTACCAAGTTACCTCCGCCTTGAAGCACCT
 GTCTTACGGTAAGCACGTTTCTTGGTACTGACGCTAGATTCTCCGGTGGTTTCCA
 CTGGTGGTGTATTGGTCATGTTGGTCTGAAGCTCTTGCTGGTGGTCTATTGGA
 AAGTTGAGAACTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 GTGAGGTCAACTTTCTGGGTACTAGATCCGACGAACAGCTGCCATCTCAAGAAGA
 GGCTACTGCTATCTTGAACGCCAGACCATCTCACCAAGACTTGTGCCAGATCCAG
 AATTGCCTGACGACACTAGATTGTGGGCTATGTTGCAAGCTGTTTCCGGTGGTACT
 TGGACCGGTTGTATCTACGACGTTAACAAGATCGGTGCTGCCCTGAGAGACTTCAT
 GAACAAGAATAA

SEQ nº 3

>AM_XD: dihydroxy-acid dehydratase

gnl|GCF_000225995|G19PU-758 NIL "G19PU-758-MONOMER" 3635..5413
Azospirillum/Nitrospirillum amazonense Y2 NZ_AFBX01000893

ATGGTTGACCGTCCTTCTGTCCGTTTCCGTTCCCGCGATTGGTTTGACGCGCCGG
ACCGGATCGACATGACCGCGCTCTATCTGGAGCGCTTCATGAACTACGGCATCAC
GCCGCAGGAACTGCGCTCCGGCAAGCCATCATCGGCATCGCCCAGACCGGCAG
CGACATCTCGCCCTGCAATCGTATTCACCTGGATTTGGCCAAGCGCGTCCGCGAC
GGTATCCGCGACGCCGGCGGCATTCCCATGGAATTCCCGGTTACACCCATCTTTG
AAAAGTGCCGTCGTCCGACGGCGGCCATGGACCGGAATCTCGCTTACATGGGCCT
GGTGGAGATCCTGTACGGCTATCCCATCGACGCCGTGGTACTGACCACCGGCTGC
GACAAGACCACGCCC GCCGGCATCATGGCCGCCAGCACGGTGCATATCCCGGCC
ATCGTCCTGTCCGGCGGTCCCATGCTGGACGGCTGGCATGAGGGCGACCTGGTA
GGTTCCGGCACCGTCATCTGGCGCAGCCGCCGCAAGCTGGCGGCCGGCCTGATC
GACGAGGAGGAGTTCCTGGACGCGGGCGCCTCCTCGGCGCCGTCCGGCCGGCCA
CTGCAACACCATGGGCACGGCCAGCACCATGAACGCCGTGGCCGAGGGCCTGGG
CCTGTGCTCACCGGCTGCTCCGCCATTCCCGCCCCCTACCGCGAACGCGGGCA
GATGGCGTACGAGACGGGCGCCGCATCGTCGACATGGCCTATGAGGATCTGCG
CCCGTCCAAGATCCTGTGCGCGGAAAGCTTCCTGAACGCCATCAAGCTGGTGGGT
GCGCTCGGCGGCTCCAGCAACGCGCAGCCGCACATCAACGCCATGGCCCCGCCAC
GCCGGCGTGGAAGTACGGCCGACGACTGGCGCATCCACGGCTATGACGTGCCG
CTGTTGGTCAACATGCAGCCGGCGGGCAAATATTTGGGCGAACGCTTCCACCGCG
CCGGCGGGCGTGCCCGCCGTGATGTGGGAACTGCAGCAGGCGGGCAAGCTGTTT
GACAAGGCGATGTCCGTCGCCGGCCGCCCATCGGCGAGAACCTGGAGGGCCG
CGAGAGCCCGGACCGGGAGATGATCACACCCTATAGCGCCCCCTGAAGGAGCG
TGCCGGCTTCTGGTGTGAAGGGCAACCTGTTGACTTCGCCATCATGAAGACC
AGCGTGATCTCGGAAGAGTTCCGCCAGCGTTACCTGAGCGAGCCGGGCGCGAG
GGTGTGTATGAGGGCCGGGCCATCGTCTTCGACGGTCCGGACGATTACCACGAG
CGCATCAACGACCCGGCGCTGAACATCGACGAACGCTGCATCCTGGTGGTGGCG
GGCGCCGGTCCGCTGGGCTTCCCCGGCTCGGCCGAGGTGGTGAACATGCAGCC
GCCCCAGCGCTGCTGAAGGCCGGCATCACAGCCTGCCGACCATCGGCGACCG
CCGCCAGTCCGGCACCTCGGACAGCCCGTCCATCCTGAACGCCTCGCCGGAGAG
TGCCGTGGGCGGAGGGCTGGCATGGCTGCGCACCGGGCGACACCATCCGCATCGA
CCTGAACCAGGGCACCTGCGACATGCTGGTGGACGATGCCGAGATCCAGAAGCG
CAAGGCCGATGGCATCCCGGCCACCCACCCAGCTACACGCCGTGGCAGGAGAT
GTACCGCCAGACCGTGGGCCAGCTGGATAGTGGCGGCTGCATGGAGCCGGCGTT
GAAGTATCGGGGTGTCGTGGCCCATCCGCCACGGCACAACCATTGA

>WP_004274215.1 dihydroxy-acid dehydratase [Nitrospirillum amazonense]

MVDRPSVRFRRSRDWFADPRIDMTALYLERFMNYGITPQELRSGKPIIGIAQTGSDISP
CNRIHLDLAKRVRDGI RDAGGIPMEFPVHPIFENCRRPTAAMDRNLAYMGLVEILYGY
IDAVVLTGCDKTPAGIMAAS TVDIPAIVLSGGPMLDGWHEGDLVSGT VIWRSRRL

AAGLIDEEEFLDAAASSAPSAGHCNTMGTASTMNAVAEGLGLSLTGCSAIPAPYRERG
 QMAYETGRRIVDMAYEDLRPSKILSRESFLNAIKLVGALGGSSNAQPHINAMARHAGV
 ELTADDWRIHGVDVPLLVMQAPAGKYLGERFHRAGGVPVMMWELQQAGKLFDKAMS
 VAGRPIGENLEGRESPDREMITPYSAPLKERAGFLVLKGNLFDFAIMKTSVISEEFRQR
 YLSEPGREGVYEGRAIVFDGPDDYHERINDPALNIDERCILVVRGAGPLGFPGSAEVVN
 MQPPDALLKAGITSLPTIGDGRQSGTSDSPSILNASPESAVGGGLAWLRTGDTIRIDLN
 QGTCDMLVDDAEIQKRKADGIPATPPSYTPWQEMYRQTVGQLDSGGCMEPALKYRG
 VVAHPPRHNH

>Sequência de nucleotídeos otimizada para expressão em *K. phaffii*

ATGGTGGACAGACCCCTCCGTCAGATTCAGATCCAGAGATTGGTTTGACGCCCCAG
 ACAGAATTGACATGACTGCCTTGTACTTGGAGAGATTCATGAACACTACGGTATCACC
 CCACAAGAGCTGAGATCCGGTAAGCCAATTATTGGTATCGCTCAGACTGGTTCCGA
 CATCTCTCCATGTAACAGAATCCACTTGGACCTGGCCAAGAGGGTTAGAGATGGTA
 TTAGAGATGCTGGTGGTATCCCAATGGAATTTCCAGTGCACCCAATCTTCGAGAAC
 TGTAGAAGGCCAACTGCTGCCATGGATAGAACTTGGCTTACATGGGTCTTGTCGA
 GATCCTGTACGGTTACCCAATTGACGCTGTTGTTTTGACCACCGGTTGTGACAAGA
 CTACTIONCAGCTGGTATTATGGCTGCTTCCACTGTTGACATCCCAGCCATCGTTTTG
 TCTGGTGGTCCAATGTTGGATGGTTGGCACGAAGGTGATTTGGTTGGTTCCGGTA
 CTGTCATTTGGAGATCCAGAAGAAAGTTGGCTGCCGGTTTGATCGACGAAGAAGA
 GTTTTTGGACGCTGCTGCTTCTTCTGCTCCATCTGCTGGTCACTGTAACACTATGG
 GTACTGCCTCTACTATGAACGCTGTTGCTGAAGGTTTGGGTTTGCCTTGACTGGT
 TGTTCCGCTATTCCAGCTCCATACAGAGAAAGGGGTCAAATGGCTTACGAGACTG
 GTAGAAGAATCGTGGACATGGCCTACGAGGATCTTAGACCATCCAAGATTTTGTCC
 AGAGAGTCCTTCTGAACGCCATCAAGTTGGTTGGTGTCTTGGTGGTTCTTCCAA
 CGCTCAACCACACATTAACGCTATGGCTAGACACGCTGGTGGTGGAGTTGACTGCTG
 ATGATTGGAGAATCCACGGTTACGACGTTCCACTGCTGGTTAACATGCAACCTGCT
 GGTAAGTACCTGGGTGAGAGATTTTCATAGAGCTGGTGGTGGTCCAGCTGTCATGT
 GGAATTGCAACAAGCCGGTAAGTTGTTTCGACAAGGCTATGTCTGTTGCCGGTAG
 ACCAATCGGTGAAAACCTTGAAGGTAGAGAGTCTCCAGACAGAGAGATGATCACT
 CCATACTCCGCTCCATTGAAAGAGAGAGCCGGTTTTCTTGGTCTTGAAGGGTAACTT
 GTTTGACTTCGCCATCATGAAGACCTCCGTCATCTCTGAAGAGTTCAGGCAGAGAT
 ACTTGTCCGAGCCAGGTAGAGAAGGTGTTTACGAGGGTAGAGCTATCGTTTTTCGAT
 GGTCCAGATGACTACCACGAGAGAATCAACGATCCAGCCTTGAACATCGACGAGA
 GATGTATCTTGGTTGTCAGAGGTGCTGGTCCATTGGGTTTTCCAGGTTCTGCTGAG
 GTTGTCAACATGCAGCCACCAGATGCTTTGTTGAAGGCTGGTATCACTTCCCTTGCC
 AACTATCGGTGACGGTAGACAATCTGGTACTTCTGACTCCCCATCCATCTTGAACG
 CTTCTCCAGAATCTGCTGTTGGTGGTGGTTTTGGCTTGGTTGAGAACTGGTGACACT
 ATCAGGATCGACCTGAACCAGGGTACTTGTGACATGTTGGTTGACGACGCTGAGA
 TTCAAAGAGAAAGGCTGACGGTATCCCAGCTACTCCACCATCTTATACTCCATGG
 CAAGAGATGTACAGACAGACCGTTGGTCAATTGGACTCCGGTGGTTGTATGGAAC
 CAGCTTTGAAGTACAGAGGTGTTGTTGCTCATCCACCTAGACACAACCACTAA

SEQ n° 4

>BS_XD: dihydroxy-acid dehydratase

gnl|BSUB633149|G1GM8-2085 NIL "G1GM8-2085-MONOMER" 2087095..2088879

Brevundimonas subvibrioides ATCC 15264

ATGAACAAACCACTGCGCAGCCGGCCTGGTTCAACAATCCCGACAATCCCGACA
 TGACCGCCCTCTATCTGGAGCGGTATCTGAACTACGGCCTGACCCGCCGGGAGCT
 GCAGTCGGACAAGCCGATCATCGGGATCGCCCAGACCGGTTCCGGACCTGAGCCC
 GTGCAACCGGCATCACCTCGTCTGGCCGAACGGGTCCGCGAAGGCATCCGCGA
 AGCCGGCGGCATCGCCATGGAGTTCCTGGTCCATCCGATCCAGGAGACCGGCAA
 GCGGCCGACGGCGGGACTTGACCGAAACCTCGCCTATCTGGGCCTGGTTCGAGAG
 CCTTTACGGCTATCCCCTCGATGGCGTGGTTCTGACCATCGGCTGTGACAAGACC
 ACGCCCGCCTGCCTGATGGCCGCTGCGACCGTCGACATGCCGGCCATCGCCCTG
 TCCGTGGGCCCCATGCTGAACGGCTGGCACAAGGGGCGAGCGGACCGGTTCCGG
 GACCATCATCTGGAAGGCACGCCAGATGATGGCGGCCGGCGAGATCGACTACGA
 AGGCTTCGTGCAACTGGTTGCGTCGTGCGCACCGTCCGTCCGGCTACTGTAACACC
 ATGGGTACGGCGACGACGATGAACTCGCTGGCCGAGGCCCTGGGCATGTCCCTG
 CCCGGCTCGGCCGCGATCCCAGGCCCGTATCGCGAACGCGCGCAGGTGCGCCTAC
 GAGACCGGTCCCGGATCGTGGAGATGGTGCACGAGGACCTGAAGCCGTCCGAC
 ATCCTGACGCGCGAGGCCTTCCACAACGCGATTGTCGTGAACTCCGCGATCGGG
 GGGTCGACCAACGCCCTATCCATCTGACGGCCCTGGCGCGCCATGCCACGTC
 GATGTGCCGCTGCAGGACTGGCAGACGACGGCCTGCATGTGCCCTGCTCGTC
 AATCTGCAGCCGGCCGGGCGAGTACCTCGGCGAGGATTATTTCCACGCCGGTGGG
 GTACCCGCCGTCGTGCACGAGCTGATGCAGAAGGGCCTGATCCACGAGGACGCC
 CTGACCGTCCAGGGCCGGACCATCGGCCGAGAAGTCCCGCGGCAAGGCAACGGAC
 CTGCCCCGACGTCATCAAGCCCTTCGACGCGCCGATGAAGGCCGATGCCGGGTTT
 GTCGTCTTACCCGGCAATCTGTTCAACTCGGCGATCATGAAGCTGAGCGTGATCA
 GTCCCGAGTTCCGCGAACGCTATCTGTCCGACCCCGCCGACCCCAATGCGTTTCA
 AGGTCCTGCGGTGCTGTTTCGACGGTCCGGAAGACTATCACCACCGCATCGACGAT
 CCCGACCTGGGCATCACCGAGCGGACCCTGCTGTTTCATGCGCGGAGCCGGGCCC
 ATCGGCTATCCGGGCGCGGCCGAAGTCGTGAACATGCAGCCGCCGGCCCATCTG
 ATCCGCCAGGGCGTGACCGCCCTGGCCTGTATCGGCGACGGTCGACAGTCGGGC
 ACCTCGGGCTCCGCCTCGATCCTCAACGCGTCTCCAGAGGCGGCGGGCGGGC
 AATATCGCCCTCCTCCGACCGGGCGACCGGGTCCGGATCGACCTCAATACCGGC
 CGGGCCGACATCCTGATCTCCGACGAAGACCTGGCCGGGCGGGCGCGCCGCGCT
 CGAGGCCGCGGGCGGGCTATCGCTACCCCGCGTCCCAGACGCCCTGGCAGGAAAT
 CCAGCGGGGCATGGTCGGCCAGCTGGAAACCGGTGCCGTGCTGGAGCCCGCCG
 TAAAGTATCACCGCATTGTGGATCGCTTCGGCCTGCCCGGGACAGCCATTGA

>WP_013269499.1 dihydroxy-acid dehydratase [*Brevundimonas subvibrioides*]

MNKPLRSRAWFNNPDNDPDMTALYLERYLNYGLTRRELQSDKPIIGIAQTGSDLSPCNR
 HHLVLAERVREGIREAGGIAMEFPVHPIQETGKRPTAGLDRNLAYLGLVESLYGYPLDG
 VVLTIGCDKTTPACLMAAATVDMPAIALSVGPMLNGWHKGERTGSGTIIWKARQMMAA
 GEIDYEGFVELVASSAPSVGYCNTMGTATTMNSLAEALGMSLPGSAAIPAPYRERAQV

AYETGRRIVEMVHEDLKPSDILTREAFHNAIVVNSAIGGSTNAPIHLTALARHAHVDPVPL
 QDWQTHGLHVPLLVLNLPAGQYLGEDYFHAGGVPVAVVHELMQKGLIHEDALTVTGR
 IGENCRGKATDLPDVIKPFDAPMKADAGFVFTGNLFNSAIMKLSVISPEFRERYLSDP
 ADPNAFEGPAVVFDGPEDYHHRIDDPDLGITERTLLFMRGAGPIGYPGAEEVVMQPP
 AHLIRQGV TALACIGDGRQSGTSGSASILNASPEAAAGGNIALLR TGDRVRIDLNTGRA
 DILISDEDLAGRRAALEAAGGYRYPASQTPWQEIQRGMVGQLETGAVLEPAVKYHRIV
 DRFGLPRDSH

>Sequência de nucleotídeos otimizada para expressão em *K. phaffii*

ATGAACAAGCCCCTGAGATCCAGAGCCTGGTTTAAACAACCCAGATAACCCTGACAT
 GACCGCCTTGTACTTGGAGAGATACTTGAAC TACGGTCTGACCAGAAGAGAGTTG
 CAATCCGACAAGCCAATCATCGGTATTGCTCAA ACTGGTCCGACTTGTCCCATG
 TAACAGACACCATTGGTTTTGGCCGAGAGAGTCAGAGAGGGTATTAGAGAAGCT
 GGTGGTATCGCCATGGAATTTCCAGTTCACCCAATCCAAGAGACTGGTAAGAGGC
 CAACTGCTGGTTTGGATAGAACTTGGCCTACTTGGGTCTTGTGCGAGTCCTTGTAC
 GGTTACCCATTGGACGGTGTGTTTTGACCATCGGTTGTGACAAGACTACCCCAGC
 TTGTTTGATGGCTGCTGCTACTGTTGACATGCCAGCTATTGCTTTGTCCGTCGGTC
 CAATGTTGAACGGTTGGCATAAGGGTGAGAGA ACTGGTTCTGGTACTATCATCTGG
 AAGGCCAGACAAATGATGGCCGCTGGTGAATTGACTACGAGGGTTTCGTTGAGT
 TGGTTGCTTCTTCTGCTCCATCCGTTGGT TACTGTAACACTATGGGTACTGCTACTA
 CCATGAACTCATTGGCTGAGGCTTTGGGTATGTCTTTGCCAGGTTCTGCTGCTATT
 CCAGCTCCATACAGAGAAAGAGCCCAAGTTGCTTACGAAACCGGTAGAAGAATCG
 TCGAGATGGTTCACGAGGACTTGAAGCCATCCGACATCTTGACTAGAGAGGCTTTC
 CACAACGCCATCGTTGTTAACTCTGCTATCGGTGGTTCCTACTAACGCTCCAATTCA
 CTTGACTGCTTTGGCTAGACACGCTCACGTTGACGTTCCATTGCAAGATTGGCAA
 CTCACGGATTGCACGTTCCACTGTTGGT TAACTTGCAACCTGCTGGTCAGTACCTT
 GGTGAGGATTACTTTTCATGCTGGTGGTGTTCAGCTGTTGTCCACGAATTGATGCA
 AAAGGGTTTGATCCACGAGGACGCTTTGACTGTTACTGGTAGAACTATCGGTGAGA
 ACTGTAGAGGTAAGGCTACTGACTTGCCAGACGTCATTAAGCCATTCGACGCTCCT
 ATGAAGGCTGACGCTGGTTTTGTTGTTTT CACCGGTA ACTTGTTCAACTCCGCCAT
 CATGAAGTTGTCCGTTATCTCCCAGAGTTCAGAGAGAGATACCTGTCTGATCCAG
 CTGACCCAAACGCTTTTTGAAGGTCCAGCCGTTGTTTTCGACGGTCCAGAAGATTAC
 CACCACAGAATTGACGATCCAGACTTGGGTATCACCGAGAGAACCTTGTTGTTTCAT
 GAGAGGTGCTGGTCCAATTGGTTACCCAGGTGCTGCTGAAGTTGTTAACATGCAG
 CCACCAGCTCACCTGATTAGACAAGGTGTTACAGCTTTGGCCTGTATCGGTGACG
 GTAGACAATCTGGTACTTCTGGTTCGCTTCCATCTTGAACGCTTCACCTGAAGCT
 GCTGCTGGTGAAATATCGCTTTGTTGAGA ACCGGTGACAGAGTCAGAATCGACTT
 GAACACTGGTAGAGCCGACATTTTGATTTCCGATGAGGATTTGGCTGGTAGAAGG
 GCTGCTTTGGAAGCAGCTGGTGGATATAGATA CCCTGCTTCTCAA ACTCCATGGCA
 AGAGATCCAAAGAGGTATGGTTGGTCAGTTGGAGACTGGTGCTGTTTTGGAACCT
 GCCGTTAAGTACCATAGAATCGTGGACAGATTCGGTCTGCCAAGAGATTCCCCTA
 A

SEQ nº 5

>HL_XD: dihydroxy-acid dehydratase

gnl|GCF_000378505|G168V-193 NIL "G168V-193-MONOMER"
 (complement(218758..220560)) *Halomonas lutea* DSM 23508 NZ_KB899989
 ATGAGCGACCAAAGATTACGCCAGCCAGCTCCGCTCGCGCTGGTGGTTCGACA
 ATCCCGAGCACCCCGGGACTACGGCAATCTGTATCGAGCGCTACATGAACTATGG
 GGTGACGCTGGAAGAATTGCGCAGCGGCAAGCCGATTATCGGCATCGCTCAGTCT
 GTTCCGACCTTACACCGTGCAACCGTCATCACATCGAGCTGGTCAAGCGCGTCA
 AGGATGGTATTTCGGGCGGCGGGTGGGGTGCCGTTTCGAGTTCCCCATGCACCCGA
 TCCATGAGAACGTGCGTCGCCCGACGGCAGCGCTGGATCGCAACCTGGCCTACC
 TGGGCCTGGTCGAGGTGCTGCATGGCTACCCACTGGATGGCGTGGTACTGACTAC
 CGGTTGTGACAAGACCACACCCGCCTGTCTGATGGCGGCGGCCACCGTCAATATC
 CCCGCCATCGTGCTTTCCGGTGGTCCCATGCTCAATGGCTGGCGTGGCAGCAACG
 AGCGTGTCGGCTCGGGCACCATCATTGGGAGCTGCGCAAGCGCCTGGCGGCAG
 GGGACATTGATTACGAAGAGTTCCTCTCCCGAGCCACCGATTTCGGCACCGTCCGT
 CGGGCACTGCAATACCATGGGCACCGCCTCGACCATGAACTCCATGGCGGAATGC
 CTGGGCATGAGCTTGCCCGGCTCGGCGATCATCCCGGCGCCGTACAAGGAGCGC
 TCCATCGTCGCCTATGATACCGGCAAGCGCATCGTCGATATGGTCTGGGAAGATA
 TACGCCCGCTGGATATCCTCACTCGCGAGGCCTTCGAGAACGCCATCGTCGCCTG
 TTCGGCGCTGGGGGGATCGAGCAATGCGCCTATCCATATCATTGCCATTGCCCGC
 CACGCCGGGATCGAGATACCAATGACGACTGGCAACAACCTGGGGCACCAAGATTT
 CGTTGCTGAGCAATGTCATGCCCGCCGGTGTCTACTTGTGTGAGGAGTTCTATCGT
 GCCGGCGGGGTGCCGGCGGTGCTTAACGAGCTGTTGAAAGTCGGCAAGTTGCAT
 GGCGAAGCGCGCACGGTCAACGGGCGGACACTGGCAGAGAATGTCGAAGGCCG
 GGAAACATTGGACGAAGACGTCATCCGTCGCTACGACAAGCCGCTGGTCGAGCAT
 GCCGGATTCATCAACCTCAAGGGCAACTTGTTGACTCCGCGCTGATGAAGACCA
 GCGTGATATCGGACGAATTCCGTCAGCGCTTCCCTGAGCCGTCCCGACGATCCGGA
 TGCCTTTGAAGGTCGCGTGGCGGTGTTGACGGCTCCGAGGATTACCATGCGCG
 GATCGACGATCCCGATCTGGAAATCGATGAGAACACGGTCCTGGTGTGCGTGGC
 GCAGGGCCGGTGGGCCATCCCGGTGGGGCCGAGGTGGTCAACATGCAGCCGCC
 CGAGGCCTTGATCAAGCGCGGTATCGAGTCGTTGCCCTGCCTGGGCGATGGCCG
 TCAGTCGGGGACCTCGGGCTCGCCGTCGATTCTCAATGCCGCGCCTGAAGCAGC
 GGTCGGAGGGGGGCTAGCGCTTCTCGAAACGGGGGATCGTATTCGCATCGACCT
 GCGCAAGGGCGAGGCCAACCTGCTGGTATCCGATGAGGATCTGGCGCAGCGCCG
 CGAGCGTCTGGCATCGCGGGGTGGCTATATTTATCCGCCACACCAGACCCCGTGG
 CAGGAGATCCAGCGCGGCATGGTTCGAACAGCACGACCGTGGCATGACACTCGAG
 CCGGCGACTAAATATCGGGATGTGGCGCGGCGCACACCCCCACGGGACAATCAC
 TGA

>WP_019016838.1 dihydroxy-acid dehydratase [*Halomonas lutea*]
 MSDQKITPSQLRSRWWFDNPEHPGTTAICIERYMNYGVTLEELRSGKPIIGIAQSGSDL
 TPCNRHHIELVKRVKDGIRAAGGVPEFPMHPIHENVRRPTAALDRNLAYLGLVEVLHG
 YPLDGVVLTGCDKTTPACLMAAATVNIPAVLSGGPMLNGWRGSNERVSGTIIWEL
 RKRLAAGDIDYEEFLSRATDSAPSVGHCNTMGTASTMNSMAECLGMSLPGSAIIPAPY
 KERSIVAYDTGKRIVDMVWEDIRPLDILTREAFENAIVACCSALGGSSNAPIHIIAIARHAGI
 EITNDDWQQLGHQISLLSNVMPAGVYLCEEFYRAGGVPVAVLNELLKVGKLGHEARTVN

GRTLAENVEGRETLDEDVIRRYDKPLVEHAGFINLKGNLFDSALMKTSVISDEFQRFL
SRPDDPDAFEGRVAVFDGSEYHARIDDPLEIDENTVLMRGAGPVGHPGGAEVNV
MQPPEALIKRGIESLPCLGDGRQSGTSGSPSILNAAPEAAVGGGLALLETGDRIRIDL
KGEANLLVSDLELAQRRLASRGGYIYPPHQTPWQEIQRGMVEQHDRGMTLEPATK
YRDVARRTPPRDNH

>Sequência de nucleotídeos otimizada para expressão em *K. phaffii*

ATGTCGGACCAGAAGATCACCCCATCTCAGTTGAGATCCAGATGGTGGTTCGATAA
CCCAGAACACCCAGGTACTIONACTGCCATCTGTATTGAGAGGTACATGAACTACGGTG
TCACCTTGGAGGAACTGAGATCCGGTAAGCCAATTATCGGTATTGCTCAATCCGGT
TCCGACTTGACCCCATGTAACAGACACCACATCGAGTTGGTTAAGAGAGTCAAGGA
CGGTATCAGAGCTGCTGGTGGTGTTCATTGCAATTTCCAATGCACCCAATCCACG
AGAACGTTAGAAGGCCAACTGCTGCTTTGGACAGAACTTGGCTTACTTGGGTCTT
GTGCAAGTCTTGCACGGTTACCCATTGGACGGTGTGTTTTGACTACCGGTTGTGA
CAAGACTACCCAGCTTGTGTTGATGGCTGCTGCTACTGTTAACATCCCAGCCATCG
TTTTGTCTGGTGGTCCAATGTTGAACGGTTGGAGAGGTTCTAACGAGAGAGTTGGT
TCCGGTACTATCATCTGGGAGTTGAGAAAAGATTGGCTGCCGGTGACATCGACTA
CGAAGAGTTTTTGTCCAGAGCTACTGACTCCGCTCCATCTGTTGGTCACTGTAACA
CTATGGGTACTIONGCTCCACTATGAACTCCATGGCTGAATGTTTGGGTATGTCCTTG
CCAGGTTCCGCTATTATTCCAGCTCCATACAAAGAGAGATCCATCGTTGCTTACGA
CACCGGTAAGAGAATCGTTGACATGGTCTGGGAAGATATTAGGCCATTGGACATCT
TGACCAGAGAGGCTTTTCGAGAACGCTATTGTGCTTGTCTGCTCTTGGTGGTTCT
TCCAACGCTCCAATCCACATTATCGCTATCGCTAGACACGCTGGTATCGAGATCAC
TAACGATGACTGGCAACAACCTGGGTCACCAGATTTCTTTGCTGTCCAACGTTATGC
CAGCCGGTGTGTTACTTGTGCGAAGAGTTCTATAGAGCCGGTGGTGTCCCAGCTGT
TTTGAACGAGTTGTTGAAGGTTCGGTAAGTTGCACGGTGAGGCTAGAACTGTTAACG
GTAGAACTTTGGCTGAGAACGTCGAGGGTAGAGAACTTTGGACGAGGACGTCAT
CAGAAGATACGACAAGCCATTGGTTGAGCACGCCGTTTCATTAACCTTGAAGGGTA
ACTTGTTCGACTCCGCCTTGATGAAGACTTCCGTTATTTCCGACGAGTTCAGGCAG
AGATTCTTGTCCAGACCTGATGATCCAGACGCCTTTGAAGGTAGAGTTGCTGTTTT
CGATGGTTCGAGGATTACCACGCTAGAATTGATGACCCAGACTTGGAGATCGAC
GAGAACACCGTTTTTGGTTATGAGAGGTGCTGGTCCAGTTGGTCATCCAGGTGGTG
CTGAAGTTGTTAACATGCAACCACAGAGGCTTTGATCAAGAGAGGTATCGAATCC
TTGCCATGCCTTGGTGACGGTAGACAATCTGGTACTTCTGGTTCCCATCCATCTT
GAACGCTGCACCTGAAGCTGCTGTTGGAGGTGGTTTGGCTTTGTTGGAACTGGT
GACAGAATCAGGATCGACCTGAGAAAGGGTGAAGCCAACCTTGTGGTTTCTGACG
AGGACTTGGCTCAGAGAAGAGAGAGATTGGCTTCAAGAGGTGGTTACATCTACCC
ACCACATCAAACCCCATGGCAAGAGATCCAAAGAGGTATGGTTGAACAGCACGAC
AGAGGTATGACTTTGGAGCCAGCTACCAAGTACAGAGATGTTGCTAGAAGAACC
CACCTAGAGACAACCACTAA

3) Genes da via para produção de Etileno Glicol
SEQ nº 6

>YjhH: 2-dehydro-3-deoxy-D-pentonate aldolase

gnl|ECOLI|G7911 yjhH "G7911-MONOMER" (complement(4524105..4525010))
Escherichia coli K-12 substr. MG1655

ATGAAAAAATTCAGCGGCATTATTCCACCGGTATCCAGCACGTTTCATCGTGACGG
AACCTTGATAAAAAGGCAATGCGCGAAGTTGCCGACTTCCTGATTAATAAAGGGG
TCGACGGGCTGTTTTATCTGGGTACCGGTGGTGAATTTAGCCAAATGAATACAGCC
CAGCGCATGGCACTCGCCGAAGAAGCTGTAACCATTTGTCGACGGGCGAGTGCCG
GTATTGATTGGCGTTCGGTCCCTTCCACTGACGAAGCGGTCAAACCTGGCGCAGC
ATGCGCAAGCCTACGGCGCTGATGGTATCGTCGCCATCAACCCCTACTACTGGAA
AGTCGCACCACGAAATCTTGACGACTATTACCAGCAGATCGCCCGTAGCGTCACC
CTACCGGTGATCCTGTACAACCTTCCGGATCTGACGGGTCAGGACTTAACCCCGG
AAACCGTGACGCGTCTGGCTCTGCAAACGAGAATATCGTTGGCATCAAAGACAC
CATCGACAGCGTTGGTCACTTGGCTACGATGATCAACACAGTTAAGTCGGTACGC
CCGTCGTTTTCGGTATTCTGCGGTTACGATGATCATTTGCTGAATACGATGCTGCT
GGGCGGCGACGGTGCGATAACCGCCAGCGCTAACTTTGCTCCGGAACCTCTCCGT
CGGCATCTACCGCGCCTGGCGTGAAGGCGATCTGGCGACCGCTGCGACGCTGAA
TAAAAAATACTACAACCTGCCCGCTATTTACGCCCTCGAAACACCGTTTGTCTCACT
GATCAAATACAGCATGCAGTGTGTGCGGGCTGCCTGTAGAGACATATTGCTTACCAC
CGATTCTTGAAGCATCTGAAGAAGCAAAGATAAAGTCCACGTGCTGCTTACCGCG
CAGGGCATTTTACCAGTCTGA

>gnl|ECOLI|G7911-MONOMER; putative 2-dehydro-3-deoxy-D-pentionate aldolase
(complement(4524105..4525010)) Escherichia coli K-12 substr. MG1655

MKKFSGIIPVSSTFHRDGLDKKAMREVADFLINKGVDGLFYLGTTGGEFSQMNTAQR
MALAEEAVTIVDGRVPVLIGVGGSPSTDEAVKLAQHAQAYGADGIVAINPYWVAPRNL
DDYYQQIARSVTLPVILYNFPDLTGQDLTPETVTRLALQENENIVGIKDTIDSVGHLRTMIN
TVKSVRPSFSVFCGYDDHLLNTMLLGGDGAITASANFAPELSVGIYRAWREGDLATAA
TLNKKLLQLPAIYALETFFVSLIKYSMQCVGLPVETYCLPPILEASEEAKDKVHVLLTAQ
GILPV

>Sequência de nucleotídeos otimizada para expressão em *K. phaffii*

ATGAAGAAGTTCTCCGGTATCATCCCACAGTGTCTCTACTTTTCACCGTGATGG
TACTCTGGACAAGAAAGCCATGAGAGAGGTTGCCGACTTCCTGATCAACAAGGGT
GTTGACGGTCTGTTCTACCTTGGTACTGGTGGTGAAGTTCTCCAGATGAACACTGC
TCAAAGAATGGCTTTGGCTGAAGAGGCCGTTACTATCGTTGATGGTAGAGTCCCAG
TTCTGATCGGTGTTGGTTCTCCATCTACTGACGAGGCTGTTAAGTTGGCTCAACAC
GCTCAAGCTTACGGTGCTGATGGTATCGTTGCTATCAACCCCTACTACTGGAAGGT
CGCCCCAAGAACTTGGACGACTACTACCAACAGATCGCCAGATCCGTTACCTTG
CCAGTCATCTTGTACAACCTTCCAGACTTGACTGGTCAGGACTTGACTCCAGAGAC
TGTTACTAGATTGGCCTTGCAGAACGAGAACATCGTCGGTATCAAGGACACTATCG
ACTCCGTTGGTCACCTGAGAACTATGATCAACACCGTCAAGTCCGTCAGACCATCC
TTCTCTGTTTTCTGTGGTTACGACGACCACTTGTGAACACCATGTTGCTTGGTGG
TGACGGTGCTATACTGCTTCTGCTAACTTCGCTCCAGAGCTGTCTGTTGGAATCT
ACAGAGCTTGGAGAGAAGGTGACTTGGCTACTGCTGCTACCTTGAACAAGAAGCT
GTTGCAGTTGCCAGCTATCTACGCTTTGGAGACTCCTTTCGTTTCCCTGATCAAGT

ACTCCATGCAGTGTGTTGGTTTGCCAGTCGAGACTTACTGTCTGCCTCCAATCTTG
 GAAGCTTCTGAGGAAGCTAAGGACAAGGTCCACGTTTTGTTGACTGCTCAGGGTAT
 CTTGCCAGTTTAA

SEQ nº 7

>FucO: aldehyde reductase

gnl|ECOLI|EG10351 fucO "LACTALDREDUCT-MONOMER"
 (complement(2931865..2933013)) Escherichia coli K-12 substr. MG1655

ATGGCTAACAGAATGATTCTGAACGAAACGGCATGGTTTGGTCGGGGTGCTGTTG
 GGGCTTTAACCGATGAGGTGAAACGCCGTGGTTATCAGAAGGCGCTGATCGTCAC
 CGATAAACGCTGGTGCAATGCGGCGTGGTGGCGAAAGTGACCGATAAGATGGAT
 GCTGCAGGGCTGGCATGGGCGATTTACGACGGCGTAGTGCCCAACCCAACAATTA
 CTGTCGTCAAAGAAGGGCTCGGTGTATTCCAGAATAGCGGCGCGGATTACCTGAT
 CGCTATTGGTGGTGGTTCTCCACAGGATACTTGTAAGCGATTGGCATTATCAGCA
 ACAACCCGGAGTTTGCCGATGTGCGTAGCCTGGAAGGGCTTTCCCGACCAATAA
 ACCCAGTGTACCGATTCTGGCAATTCCTACCACAGCAGGTAAGTGCAGGAGAGTG
 ACCATTAACCTACGTGATCACTGACGAAGAGAAACGGCGCAAGTTTGTGGTTCG
 TCCGCATGATATCCCGCAGGTGGCGTTTATTGACGCTGACATGATGGATGGTATGC
 CTCCAGCGCTGAAAGCTGCGACGGGTGTCGATGCGCTCACTCATGCTATTGAGGG
 GTATATTACCCGTGGCGCGTGGGCGCTAACCGATGCACTGCACATTAAGCGATT
 GAAATCATTGCTGGGGCGCTGCGAGGATCGGTTGCTGGTGATAAGGATGCCGGA
 GAAGAAATGGCGCTCGGGCAGTATGTTGCGGGTATGGGCTTCTCGAATGTTGGGT
 TAGGGTTGGTGCATGGTATGGCGCATCCACTGGGCGCGTTTTATAACTCCACA
 CGGTGTTGCGAACGCCATCCTGTTACCGCATGTCATGCGTTATAACGCTGACTTTA
 CCGGTGAGAAGTACCGCGATATCGCGCGCGTTATGGGCGTGAAAGTGGAAGGTAT
 GAGCCTGGAAGAGGCGCGTAATGCCGCTGTTGAAGCGGTGTTTGTCTCAACCGT
 GATGTCGGTATTCCGCCACATTTGCGTGATGTTGGTGTACGCAAGGAAGACATTCC
 GGCCTGGCGCAGGCGGCACTGGATGATGTTTGTACCGGTGGCAACCCGCGTGA
 AGCAACGCTTGAGGATATTGTAGAGCTTTACCATAACCGCCTGGTAA

>gnl|ECOLI|LACTALDREDUCT-MONOMER L-1,2-propanediol oxidoreductase
 (complement(2931865..2933013)) Escherichia coli K-12 substr. MG1655

MANRMILNETAWFGRGAVGALTDEVKRRGYQKALIVTDKTLVQCGVVAKVTDKMDAA
 GLAWAIYDGVVNPNTITVVKEGLGVFQNSGADYLIAIGGGSPQDTCKAIGIISNNPEFAD
 VRSLEGLSPTNKPSVPILAIPTTAGTAAEVTINYVITDEEKRRKFVCDPHDIPQVAFIDA
 DMMDGMPPALKAATGVDALTHAIEGYITRGAWALTDALHIKAIIEIAGALRGSVAGDKD
 AGEEMALGQYVAGMGFSNVGLGLVHGMAHPLGAFYNTPHGVANAILLPHVMRYNAD
 FTGEKYRDIARVMGVKVEGMSLEEARNAAVEAVFALNRDVGIPPHLRDVGVRKEDIPA
 LAQAALDDVCTGGNPREATLEDIVELYHTAW

>Sequência de nucleotídeos otimizada para expressão em *K. phaffii*

ATGGCCAACAGAATGATCTTGAACGAGACTGCCTGGTTCCGGTAGAGGTGCTGTTG
 GTGCTTTGACTGACGAAGTCAAGAGAAGAGGTTACCAGAAGGCCTTGATCGTCAC
 CGACAAGACTTTGGTTCAGTGTGGTGTGTTGCCAAGGTCCTGATAAGATGGATG

CTGCTGGTTTGGCTTGGGCTATCTATGATGGTGTGTCCCAAATCCAACCATCACC
 GTCGTCAAAGAAGGTCTGGGAGTTTTCCAAAACCTCTGGTGCCGACTACTTGATCGC
 TATTGGTGGTGGATCTCCACAGGACACTTGTAAGGCTATCGGCATCATCTCTAACA
 ACCCAGAGTTCGCTGACGTGAGATCCTTGGAAGTTTTGTCCCAACTAACAAGCC
 ATCCGTTCCCTATCTTGGCTATCCCAACTACTGCTGGAAGTCTGCTGAGGTCACTA
 TCAACTACGTTATTACCGACGAAGAGAAGCGTAGGAAGTTCGTTTGC GTTGACCCA
 CACGACATTCCACAGGTTGCTTTCATTGACGCTGACATGATGGATGGTATGCCACC
 AGCTTTGAAGGCTGCTACTGGTGTGATGCATTGACTCACGCTATCGAGGGTTACA
 TTACAAGAGGTGCTTGGGCTCTTACTGACGCCTTGACATTAAGGCCATTGAGATT
 ATTGCCGGTGCCTTGAGAGGTTCTGTTGCTGGTGATAAGGATGCCGGTGAAGAGA
 TGGCATTGGGTCAATACGTTGCTGGTATGGGTTTCTCCAACGTCGGTTTGGGTCTT
 GTTCATGGAATGGCTCATCCATTGGGTGCCTTTTACAACACTCCTCACGGTGTTC
 TAACGCCATTTTGTGCCACACGTCATGAGATACAACGCCGACTTTACTGGTGAGA
 AGTACAGAGACATTGCCAGAGTCATGGGTGTTAAGGTTGAGGGTATGTCCCTGGA
 AGAAGCTAGAAACGCTGCTGTTGAAGCTGTTTTCGCCCTGAACAGAGATGTTGGTA
 TTCCACCACACCTGAGAGATGTCGGTGTAGAAAAGAGGACATCCCAGCTTTGGCT
 CAAGCTGCTTTGGATGATGTGTGTACAGGTGGTAACCCAAGAGAGGCTACTTTGG
 AGGATATTGTCGAGTTGTACCACACCGCTTGGTAA

Sequência de nucleotídeos do plasmídeo pB3-036-Cas9

>pB33-036-Cas9

CGCTGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGC
 TGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTC
 AAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT
 GGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGT
 CCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTAT
 CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCG
 TTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA
 AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
 GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC
 TAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAA
 GAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTT
 GTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGAT
 CTTTTCTACGGGGTGGAGCGCAAAAAACCCCGCCCCTGACAGGGCGGGGTTTTTTT
 CGCGATCGGAGGATCCTTTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCTCGTCCAATCAGGT
 AGCCATCTCTGAAATATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACCTGCTGGCAACGT
 AAAATTCTCCGGGGTAAAACCTTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGAAACGTCTCTTC
 CCTTCTCTCCTTCCACCGCCCGTTACCGTCCCTAGGAAATTTACTCTGCTGGA
 GAGCTTCTTCTACGGCCCCCTTGCAGCAATGCTCTTCCCAGCATTACGTTGCGGGT
 AAAACGGAGGTCGTGTACCCGACCTAGCAGCCCAGGGATGGAAAAGTCCCGGCC
 GTCGCTGGCAATAATAGCGGGCGGACGCATGTCATGAGATTATTGGAAACCACCA
 GAATCGAATATAAAAGGCGAACACCTTTCCCAATTTTGGTTTCTCCTGACCCAAAGA
 CTTTAAATTTAATTTATTTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAACCTATCAAACACCAT

GGCGTCTTCGGATCCCTCGAGGAAGACGCGCTTTTAGTGTACATCTGATAATATAG
TACTACCACGTATGATAATGTAGAGAATAGGCTTCCTTGTCGAGTGTGTTTGCAGTT
TTCTTGAGTTTCAAGGTTTAAATGCTGGTATATTAGTTCATCGAAGGTTTCAGCCAA
TAGCACCTTAAATCAATCAAATAATTGACTCTTACGAAAGAGCCTACTGTGTTTA
GTATCGAAGTCGTTTACCTTTTCATGTTGAATAGCTTCCTCTCTGACCCTAACATTTT
AAGATCCTCCTAAAGTTACCCGGATTGTGAAATTCTAATGATCCACCTGCCCAATG
CATTTTTTCTTTATTAGTTTACCTTTTTTACCTAATATACGAGCTTGTTAAAGTAAGT
GGCACTGCAATACTAGGCTTATTGTTGATATTATGATGAATCGTTTTACAAACTTG
ATTTCTGTGAACTCACCATGTACTAAGGAAAAAACATGCATCACCATCTGAATAT
TTGACCGCTCCGGGGAGCCTGCCATTAGGCAAACACCAACTAGGAACCTACACCA
AGTTATGAAGGAGCTTGAAAGGATTATAAAAAATGCGATTACCTAATACACACAC
GATGCCTGAGCGGTTAATGTGAAATTTCCCGGCCATCGATCGCCCCACAATCAGA
CTATTTTCGCTCATACAATAAAAAGTCTCCTGTTTCCACCCGAGTATCACCAGAACA
AAGTAACAAATACAAAACCATGGACAAGAAGTACTCCATTGGGCTCGATATCGGCA
CAAACAGCGTCGGTTGGGCCGTCATTACGGACGAGTACAAGGTGCCGAGCAAAAA
ATTCAAAGTTCTGGGCAATACCGATCGCCACAGCATAAAGAAGAACCTCATTGGCG
CCCTCCTGTTGACTCCGGGGAGACGGCCGAAGCCACGCGGCTCAAAGAACAG
CACGGCGCAGATATACCCGCAGAAAGAATCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTT
TAGTAATGAGATGGCTAAGGTGGATGACTCTTTCTTCCATAGGCTGGAGGAGTCCT
TTTTGGTGGAGGAGGATAAAAAGCACGAGCGCCACCCAATCTTTGGCAATATCGT
GGACGAGGTGGCGTACCATGAAAAGTACCCAACCATATATCATCTGAGGAAGAAG
CTTGAGACAGTACTGATAAGGCTGACTTGCGGTTGATCTATCTCGCGCTGGCGCA
TATGATCAAATTTGGGGACACTTCCTCATCGAGGGGGACCTGAACCCAGACAAC
AGCGATGTCGACAAACTCTTTATCCAACCTGGTTCAGACTTACAATCAGCTTTTCGAA
GAGAACCCGATCAACGCATCCGGAGTTGACGCCAAAGCAATCCTGAGCGCTAGGC
TGTCCAAATCCCGGCGGCTCGAAAACCTCATCGCACAGCTCCCTGGGGAGAAGAA
GAACGGCCTGTTTGGTAATCTTATCGCCCTGTCACTCGGGCTGACCCCCAACTTTA
AATCTAACTTCGACCTGGCCGAAGATGCCAAGCTTCAACTGAGCAAAGACACCTAC
GATGATGATCTCGACAATCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCAGACCTTT
TTTTGGCGGCAAAGAACCTGTCAGACGCCATTCTGCTGAGTGATATTCTGCGAGTG
AACACGGAGATCACCAAAGCTCCGCTGAGCGCTAGTATGATCAAGCGCTATGATG
AGCACCACCAAGACTTGACTTTGCTGAAGGCCCTTGTCAGACAGCAACTGCCTGA
GAAGTACAAGGAAATTTTCTTCGATCAGTCTAAAAATGGCTACGCCGGATACATTG
ACGGCGGAGCAAGCCAGGAGGAATTTTACAAATTTATTAAGCCCATCTTGGAAAAA
ATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTAAAGCTTAACAGAGAAGATCTGTTGCGCA
AACAGCGCACTTTTCGACAATGGAAGCATCCCCACCAGATTCACCTGGGCGAACT
GCACGCTATCCTCAGGCGGCAAGAGGATTTCTACCCCTTTTTGAAAGATAACAGGG
AAAAGATTGAGAAAATCCTCACATTTTCGGATACCCTACTATGTAGGCCCCCTCGCC
CGGGGAAATTCCAGATTCGCGTGGATGACTCGCAAATCAGAAGAGACTATCACTCC
CTGGAATTCGAGGAAGTCGTGGATAAGGGGGCCTCTGCCAGTCCTTCATCGAA
AGGATGACTAACTTTGATAAAAATCTGCCTAACGAAAAGGTGCTTCTAAACACTCT
CTGCTGTACGAGTACTTCACAGTTTATAACGAGCTCACCAAGGTCAAATACGTAC
AGAAGGGATGAGAAAGCCAGCATTCTGTCTGGAGAGCAGAAGAAAGCTATCGTG

GACCTCCTCTTCAAGACGAACCGGAAAGTTACCGTGAAACAGCTCAAAGA_gGACTA
TTTCAAAAAGATTGAATGTTTCGACTCTGTTGAAATCAGCGGAGTGGAGGATCGCT
TCAACGCATCCCTGGGAACGTATCACGATCTCCTGAAAATCATTAAAGACAAGGAC
TTCCTGGACAATGAGGAGAACGAGGACATTCTTGAGGACATTGTCCTCACCCCTTAC
GTTGTTTGAAGATAGGGAGATGATTGAAGAACGCTTGAAAACCTTACGCTCATCTCT
TCGACGACAAAGTCATGAAACAGCTCAAGAGGCGCCGATATACAGGATGGGGGCG
GCTGTCAAGAAAACCTGATCAATGGGATCCGAGACAAGCAGAGTGGAAAGACAATC
CTGGATTTTCTTAAGTCCGATGGATTTGCCAACCGGAACTTCATGCAGTTGATCCAT
GATGACTCTCTCACCTTTAAGGAGGACATCCAGAAAGCACAAGTTTCTGGCCAGG
GGGACAG_cCTTCACGAGCACATCGCTAATCTTGCAAGGTAGCCCAGCTATCAAAAAG
GGAATACTGCAGACCGTTAAGGTCGTGGATGAACTCGTCAAAGTAATGGGAAGGC
ATAAGCCCGAGAATATCGTTATCGAGATGGCCCGAGAGAACCAAACCTACCCAGAA
GGGACAGAAGAACAGTAGGGAAAGGATGAAGAGGATTGAAGAGGGTATAAAAGAA
CTGGGGTCCCAAATCCTTAAGGAACACCCAGTTGAAAACACCCAGCTTCAGAATGA
GAAGCTCTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCAGGGACATGTACGTGGATCAGGAA
CTGGACATCAATCGGCTCTCCGACTACGACGTGGATCATATCGTGCCCCAGTCTTT
TCTCAAAGATGATTCTATTGATAATAAAGTGTTGACAAGATCCGATAAAAATAGAGG
GAAGAGTGATAACGTCCCCTCAGAAGAAGTTGTCAAGAAAATGAAAATTATTGGC
GGCAGCTGCTGAACGCCAAACTGATCACACAACGGAAGTTCGATAATCTGACTAA
GGCTGAACGAGGTGGCCTGTCTGAGTTGGATAAAGCCGGCTTCATCAAAGGCAG
CTTGTTGAGACACGCCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAAATTCTCGATTCACGCAT
GAACACCAAGTACGATGAAAATGACAAACTGATTTCGAGAGGTGAAAGTTATTACTC
TGAAGTCTAAGCT_cGTCTCAGATTTTCAGAAAGGACTTTTCAGTTTTATAAGGTGAGAG
AGATCAACAATTACCACCATGCGCATGATGCCTACCTGAATGCAGTGGTAGGCACT
GCACTTATCAAAAAATATCCCAAGCTTGAATCTGAATTTGTTTACGGAGACTATAAA
GTGTACGATGTTAGGAAAATGATCGCAAAGTCTGAGCAGGAAATAGGCAAGGCCA
CCGCTAAGTACTTCTTTTACAGCAATATTATGAATTTTTTCAAGACCGAGATTACACT
GGCCAATGGAGAGATTCGGAAGCGACCACTTATCGAAACAAACGGAGAAACAGGA
GAAATCGTGTGGGACAAGGGTAGGGATTTTCGCGACAGTCCGGAAGGTCTGTCCA
TGCCGCAGGTGAACATCGTTAAAAAGACCGAAGTACAGACCGGAGGCTTCTCCAA
GGAAAGTATCCTCCCGAAAAGGAACAGCGACAAGCTGATCGCACGCAAAAAGAT
TGGGACCCCAAGAAATACGGCGGATTTCGATTCTCCTACAGTCGCTTACAGTGTACT
GGTTGTGGCCAAAGTGGAGAAAGGGAAAGTCTAAAAAACTCAAAGCGTCAAGGAA
CTGCTGGGCATCACAAATCATGGAGCGATCAAGCTTCGAAAAAAACCCCATCGACTT
TCTCGAGGCGAAAGGATATAAAGAGGTCAAAAAAGACCTCATCATTAAGCTTCCCA
AGTACTCTCTTTGAGCTTGAAAACGGCCGGAAACGAATGCTCGCTAGTGCGGG
CGAGCTGCAGAAAGGTAACGAGCTGGCACTGCCCTCTAAATACGTTAATTTCTTGT
ATCTGGCCAGCCACTATGAAAAGCTCAAAGGGT_cCCCGAAGATAATGAGCAGAA
GCAGCTGTTTCGTGGAACAACACAAACACTACCTTGATGAGATCATCGAGCAAATAA
GCGAATTCTCCAAAAGAGTGATCCTCGCCGACGCTAACCTCGATAAGGTGCTTTCT
GCTTACAATAAGCACAGGGATAAGCCCATCAGGGAGCAGGCAGAAAACATTATCC
ACTTGTACTCTGACCAACTTGGGCGCGCCTGCAGCCTTCAAGTACTTCGACACC
ACCATAGACAGAAAGCGGTACACCTCTACAAAGGAGGTCTGGACGCCACACTGA

TTCATCAGTCAATTACGGGGCTCTATGAAACAAGAATCGACCTCTCTCAGCTCGGT
GGAGACAGCAGGGCTGACCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGTGAGCTTCGTCCGAC
GGCGGCCACGGGTCCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCCCTTTTCCTTTGTGCGATA
TCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAA
CCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTATAG
TTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGA
CGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACG
CTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGGCGCTAATTCATGGACATGGAGGCCAGAAT
ACCCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCAGGGGCATGATGTGACTGTCGCC
CGTACATTTAGCCCATACATCCCATGTATAATCATTTGCATCCATACATTTTGATG
GCCGCACGGCGCGAAGCAAAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACGTGCGAGCAGG
GAAACGCTCCCCTCACAGACGCGTTGAATTGTCCCCACGCCGCGCCCCTGTAGAG
AAATATAAAAGGTTAGGATTTGCCACTGAGGTTCTTCTTTTCATATACTTCCTTTAAA
ATCTTGCTAGGATACAGTTCTCACATCACATCCGAACATAAACAACCATGGGTAAAA
AGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTCGACAG
CGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTC
GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCT
ACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAA
GTGCTTGACATTGGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTG
CACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTCCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCA
GCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAG
CGGGTTCGGCCCATTTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACTACATGGCGTGAT
TTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGA
CACCGTCAGTGCGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGA
GGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTCCGGCTCCAACAATGTC
CTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCATTGACTGGAGCGAGGGCGATGTTCCG
GGGATTCCAATACGAGGTGCGCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTG
TATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGACAGGATC
GCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGC
TTGGTTGACGGCAATTTGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTTCGATGCGACGCAA
TCGTCCGATCCGGAGCCGGACTGTGCGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCG
CGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAACCGAC
GCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAATCAGTACTGACAATAAAAAGATTC
TTGTTTTCAAGAACTTGTCATTTGTATAGTTTTTTTATATTGTAGTTGTTCTATTTTAA
TCAAATGTTAGCGTGATTTATATTTTTTTTCGCCTCGACATCATCTGCCAGATGCG
AAGTTAAGTGCGCAGAAAGTAATATCATGCGTCAATCGTATGTGAATGCTGGTCGC
TATACTGGCTTCCTTTTCATCACGTGCTATAAAAATAATTATAATTTAAATTTTTTAA
ATAAATATATAAATTAATAAATAGAAAGTAAAAAAGAAATTAAGAAAAAATAGTTTT
TGTTTTCCGAAGATGTAAAAGACTCTAGGGGGATCGCCAACAATACTACCTTTTAT
CTTGCTCTTCCTGCTCTCAGGTATTAATGCCGAATTGTTTCATCTTGCTGTGTAGA
ACACCACACACGAAAATCCTGTGATTTTACATTTTACTTATCGTTAATCGAATGTATA
TCTATTTAATCTGCTTTTCTTGTCTAATAAATATATATGTAAAGTACGCTTTTTGTTGA
AATTTTTAAACCTTTGTTTATTTTTTTTTCTTCATTCCGTAACCTTCTACCTTCTTAA

TTTACTTTCTAAAATCCAAATACAAAACATAAAAATAAATAAACACAGAGTAAATTCC
CAAATTATTCCATCATTAAAAGATACGAGGCGCGTGTAAGTTACAGGCAAGCGATC
G

ANEXO B - Produção de EG e AG em linhagens com diferentes genes codificantes para a Enzima XDH

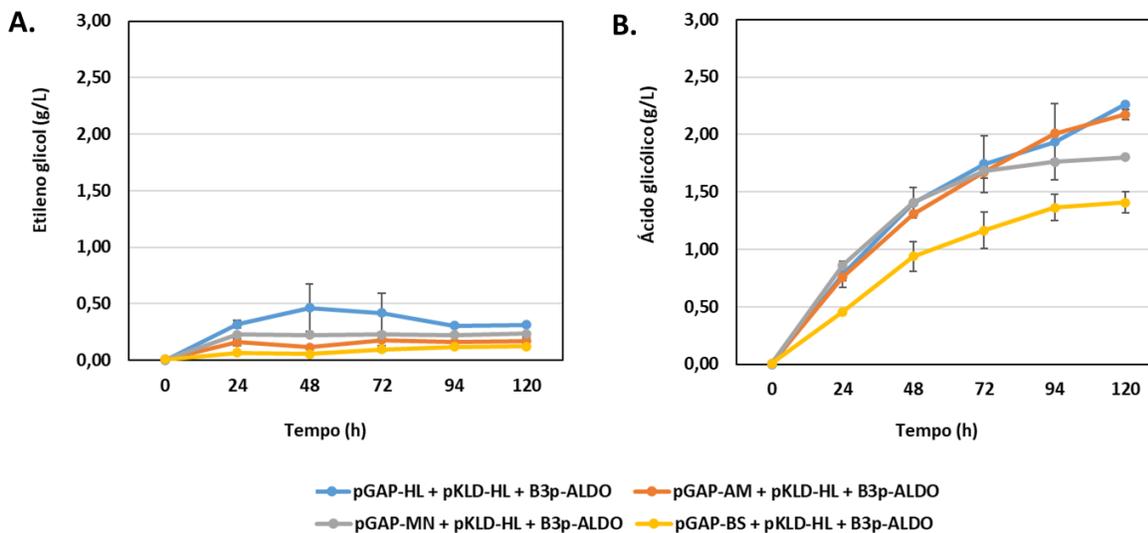


Figura S 1 - Perfil fermentativo completo e produção de EG e AG, em 120 h de cultivo das linhagens de *K. phaffii* construídas com as enzimas XDH, XD e ALDO.

Fonte: Elaboração própria (2022).

ANEXO C - Cultivo de linhagens de *K. phaffii* em meio contendo AG como substrato

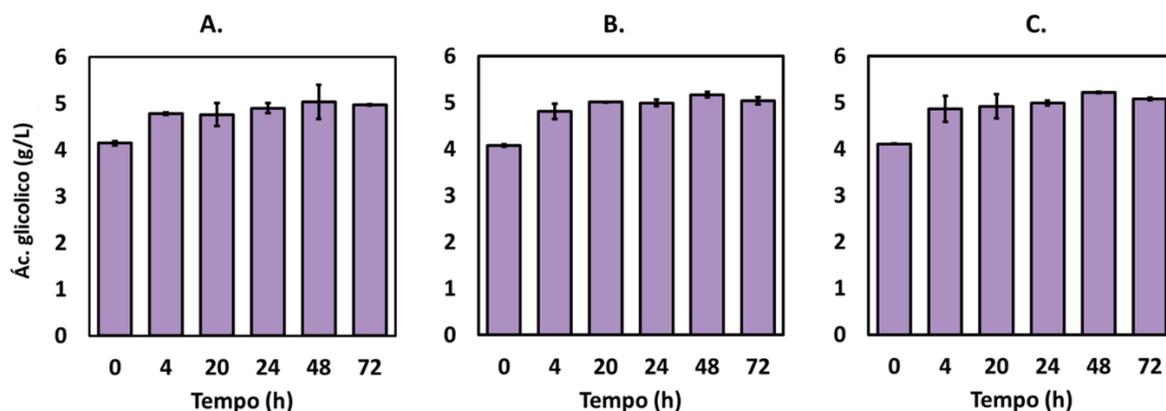


Figura S 2 - Concentração de AG em 72 h de cultivo de linhagens de *K. phaffii*. A. *K. phaffii* X-33; B. *K. phaffii* JA122 (transformada com os genes codificantes para todas as enzimas da via de EG); C. *K. phaffii* JA131 (transformada com os genes codificantes para as enzimas XDH, XD e ALDO).

Fonte: Elaboração própria (2022).

ANEXO D – Parâmetros para realização de ensaio colorimétrico para detecção de lactonas

Tabela S 1- Valores medidos para curva padrão dos compostos xilose, ácido xilônico e xilonolactona para ensaio colorimétrico de detecção de lactonas em espectro de luz de 550 nm.

composto	concentração(mM)	leitura (DO 550 nm)
xilose	1	0,007
	5	0,034
	10	0,072
ácido xilônico	1	0,004
	5	0,002
	10	0,003
xilonolactona	1	0,145
	5	0,748
	10	1,296

Fonte: Elaboração própria (2022).

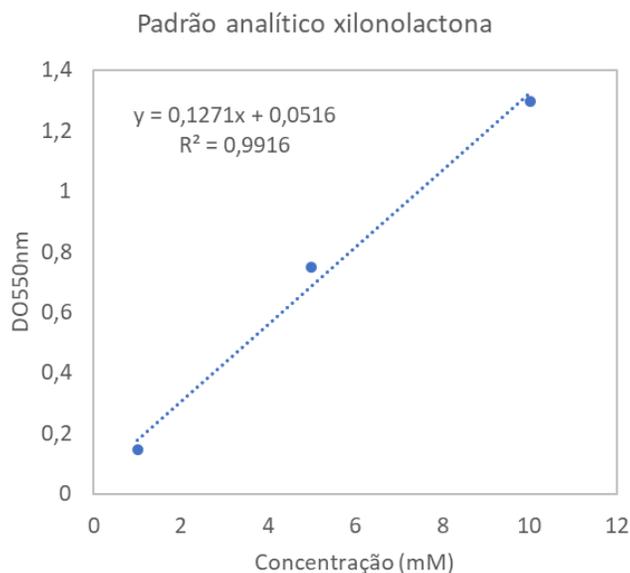


Figura S 3 - Padrão analítico indicando a correlação entre a DO550 nm medida e a concentração (mM) de xilonolactona. Cálculo realizado a partir da inclinação e interceptação da reta (x, y) representada. Fonte: Elaboração própria (2022).

Tabela S 2 - Valores* médios de leitura de densidade ótica (DO) 550nm dos sobrenadantes de cultivo fermentativo das linhagens *K. phaffii* JA122 e JA128

Tempo (h)	<i>K. phaffii</i> JA122	<i>K. phaffii</i> JA128
0	0,018 ± 0,029	0,010 ± 0,015
4	0,004 ± 0,006	0,000 ± 0,000
24	0,007 ± 0,008	0,029 ± 0,031
48	0,049 ± 0,043	0,065 ± 0,017
72	0,013 ± 0,012	0,039 ± 0,019
96	0,002 ± 0,004	0,029 ± 0,026

*após subtração do valor de referência (0,321)

Fonte: Elaboração própria (2022).