

ENGENHARIA METABÓLICA DE *Komagataella phaffii* PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO XILÔNICO

Pedro William Gomes de Oliveira⁽¹⁾, Marciano Régis Rubini⁽⁴⁾, João Ricardo Moreira de Almeida^(2,3)

⁽¹⁾Estudante de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, DF. ⁽²⁾Professor, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

⁽³⁾Pesquisador, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF. ⁽⁴⁾Pós-doc, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

⁽¹⁾pedro.william@gmail.com

RESUMO: O ácido xilônico (AX) é um composto com diversas aplicações nas indústrias farmacêutica, têxtil e de construção civil. A *Komagataella phaffii* destaca-se como plataforma para produção de proteínas recombinantes e metabólitos de interesse devido à sua robustez em meios complexos, mantendo atividade em hidrolisado e tolerando até 6 g/L de ácido acético. Embora linhagens recombinantes de *K. phaffii* expressando o gene *xylB* de *Halomonas lutea* (codificador da XDH) produzam AX com bom rendimento em meio sintético (> 0,95 g/g), o desempenho pode ser otimizado, tanto em termos de produtividade quanto na contração final. Este estudo visou melhorar a produção de AX por *K. phaffii* através da modulação da expressão do gene *xylB*, avaliando o impacto de diferentes promotores e sítios de integração genômica. Foram construídos cassetes de expressão do gene *xylB* sob controle dos promotores P_{GAP} (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e P_{GCW14} (proteína ancorada de glicosil fosfatidil inositol), direcionados para integração nas regiões 5'-UTR dos loci *ENO1* (enolase 1) e NTS (regiões espaçadoras não transcritas). As linhagens recombinantes foram cultivadas em meio mínimo contendo xilose para avaliação da produção de AX. A comparação dos sítios de integração revelou que a linhagem ENO-GAP-XDH apresentou desempenho superior à NTS-GAP-XDH, com produção de AX 28% maior (2,67 vs 2,09 g/L), rendimento 68% superior (0,42 vs 0,25 g/g) e maior produtividade específica. Quanto aos promotores, a linhagem ENO-GCW14-XDH apresentou rendimento de conversão de xilose em AX 13,9% superior à ENO-GAP-XDH em 72 h (0,41 vs 0,36 g/g). Os resultados demonstram que tanto a escolha do sítio de integração genômica quanto do promotor impactam significativamente a produção de AX, constituindo estratégias promissoras para otimização da produção heteróloga em *K. phaffii*. Para melhor avaliar a produção de AX, as linhagens serão cultivadas em biorreator. Adicionalmente, será implementada a expressão de um transportador de xilose de *Saitoella complicata*, previamente caracterizado pelo grupo, que apresenta maior afinidade por xilose em relação à glicose. Esta estratégia visa aprimorar o aproveitamento de hidrolisados lignocelulósicos através da co-fermentação de açúcares.

Palavras-chave: Xilose; Biotecnologia industrial; Metabolismo microbiano; Expressão heteróloga; Leveduras recombinantes.

Referências

- AHMAD, E.; JÄGER, N.; APFELBACHER, A.; DASCHNER, R.; HORNING, A.; PANT, K. K. Integrated thermo-catalytic reforming of residual sugarcane bagasse in a laboratory scale reactor. **Fuel Processing Technology**, v. 171, p. 277–286, mar. 2018.
- CARNEIRO, C. V. G. C.; SERRA, L. A.; PACHECO, T. F.; FERREIRA, L. M. M.; DE ALMEIDA, J. R. M. Advances in *Komagataella phaffii* Engineering for the Production of Renewable Chemicals and Proteins. **Fermentation**, 8(11), 575, 2022.
- HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 262, p. 310–318, ago. 2018.
- KASSAYE, S.; PANT, K. K.; JAIN, S. Hydrolysis of cellulosic bamboo biomass into reducing sugars via a combined alkaline solution and ionic liquid pretreatment steps. **Renewable Energy**, v. 104, p. 177–184, abr. 2017.
- KUMAR, R.; STREZOV, V.; WELDEKIDAN, H.; HE, J.; SINGH, S.; KAN, T.; DASTJERDI, B. Lignocellulose biomass pyrolysis for bio-oil production: A review of biomass pre-treatment methods for production of drop-in fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 123, p. 109763, maio 2020.
- RAMOS, T. G. S.; JUSTEN, F.; CARNEIRO, C. V. G. C.; DE ALMEIDA, J. R. M. Xylonic acid production by recombinant *Komagataella phaffii* strains engineered with newly identified xylose dehydrogenases. **Bioresource Technology Reports**, 16, 100854, 2021.
- XENOPOULOS, E.; IOANNIS GIANNIKAKIS, I.; CHATZIFRAGKOU, A.; KOUTINAS, A.; PAPANIKOLAOU, S. Lipid Production by Yeasts Growing on Commercial Xylose in Submerged Cultures with Process Water Being Partially Replaced by Olive Mill Wastewaters. **Processes**, v. 8, n. 7, p. 819, 11 jul. 2020.
- ZOGLAMI, A.; PAËS, G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, 18 dez. 2019.