

Engenharia genética para aumento da tolerância a inibidores de hidrolisados lignocelulósicos em *Komagataella phaffii*

Brandalise E F⁽¹⁾, Duarte L T⁽²⁾, Almeida J R M⁽³⁾

⁽¹⁾Bolsista, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF. ⁽²⁾Analista, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF. ⁽³⁾Pesquisador, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

Resumo - Os carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica podem ser usados como fonte de carbono por microrganismos para produzir produtos químicos renováveis. Os processos de pré-tratamento e hidrólise da biomassa levam a liberação de açúcares, mas também acarretam na formação e liberação de compostos que inibem o metabolismo microbiano, incluindo furfural, 5-hidroxi-metil-furfural (HMF) e ácido acético. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi validar genes potencialmente envolvidos na resposta da levedura *K. phaffii* à estes inibidores e obter cepas com maior tolerância a hidrolisados lignocelulósicos. Para isso, genes-alvo foram selecionados a partir de análises de transcriptoma de *K. phaffii* na presença dos inibidores. Três genes foram clonados no vetor de expressão na levedura sob controle do promotor constitutivo pPGK no vetor pKLD. O plasmídeo pKLD sem qualquer gene clonado foi utilizado para obtenção de uma cepa controle. Três cepas recombinantes foram avaliadas quanto à tolerância ao HMF, furfural e ácido acético. Em cada inibidor, pelo menos duas cepas apresentaram tolerância superior à controle. Um dos genes conferiu maior resistência a todos os inibidores. Assim, cepas de *K. phaffii* com maior tolerância aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico foram obtidas pela validação de novos genes.

Palavras-chave: Bioprocessos; Leveduras; Metabolismo microbiano.

Referências

ALMEIDA, J. R. M.; BERTILSSON, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; GORSICH, S.; LINDÉN, G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied microbiology and biotechnology** 82.4 (2009a): 625-638.

BRANDT, B. A.; JANSEN, T.; GÖRGENS, J. F.; VAN ZYL, W. H. Overcoming lignocellulose-derived microbial inhibitors: advancing the *Saccharomyces cerevisiae* resistance toolbox. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining** 13.6 (2019): 1520-1536.

HENRIQUES, S. F.; MIRA, N. P.; SÁ-CORREIA, I. Genome-wide search for candidate genes for yeast robustness improvement against formic acid reveals novel susceptibility (Trk1 and positive regulators) and resistance (Haa1-regulon) determinants. **Biotechnology for biofuels**, [S.L.], v. 10, n. 1, 19 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-017-0781-5>.

JONSSOM, L. J.; BJORN, A.; NILS-OLOF, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for biofuels** 6.1 (2013): 1-10.

ØSTBY H.; HANSEN, L. D.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H.; VÁRNAJ, A. Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives [Internet]. Vol. 47, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Springer International Publishing; 2020. 623–657 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02301-8>.

PAES, B. G.; STEINDORFF, A. S.; FORMIGHIERI, E. F.; PEREIRA, I. S.; ALMEIDA, J. R. M. Physiological characterization and transcriptome analysis of *Pichia pastoris* reveals its response to lignocellulose-derived inhibitors. **AMB Express** 11.1 (2021b): 1-15.

RASMUSSEN, H.; SORENSER, H.R.; MEYER, A. S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**, n. 385, 2014. 45-57.