

# Efeito da superexpressão do fator de transcrição HAA1 em *Komagataella phaffii* produtora de ácido xilônico

Mariana Jardim Pedrosa<sup>1</sup>, Letícia Maria Mallmann Ferreira<sup>2</sup>, Bárbara Gomes Paes<sup>3</sup>, Diogo Keiji Nakai<sup>4</sup>, João Ricardo Moreira de Almeida<sup>5</sup>

## Resumo

A biomassa lignocelulósica se apresenta como uma matéria-prima promissora para produção de compostos químicos de base renovável. Porém a plena utilização dos açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos exige microrganismos capazes de tolerar os compostos inibidores presentes neles. Dentre os compostos inibidores, destaca-se o ácido acético, o qual pode inibir completamente o metabolismo microbiano. Visando à produção de ácido xilônico (AX) a partir de hidrolisados lignocelulósicos, foi construída uma linhagem de *Komagataella phaffii* expressando a enzima xilose desidrogenase (XDH) – Kp-XDH. Para aumentar a tolerância dessa linhagem a ácido acético e, possivelmente, ao AX, foi superexpresso na levedura o fator de transcrição HAA1 – Kp-XDH-HAA1. Uma terceira linhagem expressa somente o HAA1 – Kp-HAA1 e não é capaz de produzir AX porque não possui a enzima XDH. Este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da superexpressão de Haa1 na produção de AX. Para tanto, o desempenho das três linhagens de *K. phaffii* contendo XDH, Haa1, XDH-Haa1 foi comparado em diferentes condições de cultivo com a adição de ácido acético e em reciclo de suas células. Os resultados demonstram que o fator de transcrição promove aumento da tolerância da levedura ao ácido acético, sendo que a sua melhor produção de ácido xilônico é em concentrações de 2 g/L de ácido acético. Além disso, o reciclo das células pode ser uma importante chave para o aumento da produção de ácido xilônico, já que as linhagens de levedura se adaptam ao meio de cultivo.

**Termos para indexação:** *Komagataella phaffii*, biomassa lignocelulósica, ácido acético, ácido xilônico, xilose.

## Introdução

O uso de energias renováveis se torna cada vez mais necessário na vida dos seres humanos por causa da diminuição de fontes não renováveis a cada ano. No Brasil, 43,2% da matriz energética advém de energias renováveis (Weber et al., 2018). Por isso, produtos e subprodutos gerados a partir de biomassas para produção de biocombustíveis estão sendo cada vez mais utilizados e criados. A biomassa lignocelulósica pode ser utilizada para obtenção de álcoois (Bull, 1994), precursores de biopolímeros (Govil et al., 2020), ácidos orgânicos, e outros compostos. O ácido xilônico é um ácido orgânico que pode ser utilizado como aditivo de cimento (Byon-Wa et al., 2006), plastificante (Jin et al., 2022) e para obtenção de etilenoglicol (Zhanget al., 2020).

A biomassa lignocelulósica é formada, principalmente, por celulose, hemicelulose e lignina (Junmeng et al., 2017). Apesar de ser um composto de ampla acessibilidade, existem desafios para

<sup>1</sup> Graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília, mariana.pedrosa@colaborador.embrapa.br

<sup>2</sup> Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, leticiamallmann.bio@gmail.com

<sup>3</sup> Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, barbaragpaes@gmail.com

<sup>4</sup> Engenheiro de bioprocessos e biotecnologista, mestre em Ciências Mecânicas, Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

<sup>5</sup> Biólogo, professor, doutor em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

sua utilização, como a obtenção de organismos capazes de tolerar produtos do hidrolisado, como o ácido acético, e que são capazes de metabolizar pentoses e hexoses (Ferreira, 2022). Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar se linhagens geneticamente modificadas para produção de ácido xilônico podem ter melhor desempenho quando superexpressando o fator de transcrição HAA1 – *Kp*-HAA1. Para tanto, utilizou-se de *Komagataella phaffii* para expressar dois genes de interesse, o Haa1 e o XDH\_HL. Posteriormente, esses dois genes foram inseridos em uma mesma linhagem *kp*XDH-Haa1. Essas ações possuem como objetivo a criação de uma linhagem que resiste aos ácidos fracos, o que é o papel do gene Haa1, e que, ao mesmo tempo, possui uma maior produtividade de conversão da xilose, por meio do gene XDH. Dessa forma, neste trabalho, o desempenho dessas linhagens de *K. phaffii* foi avaliado em diferentes condições de processo, como a presença e ausência de ácido acético, no reciclo de células e em meio contendo hidrolisado lignocelulósico.

## Materiais e métodos

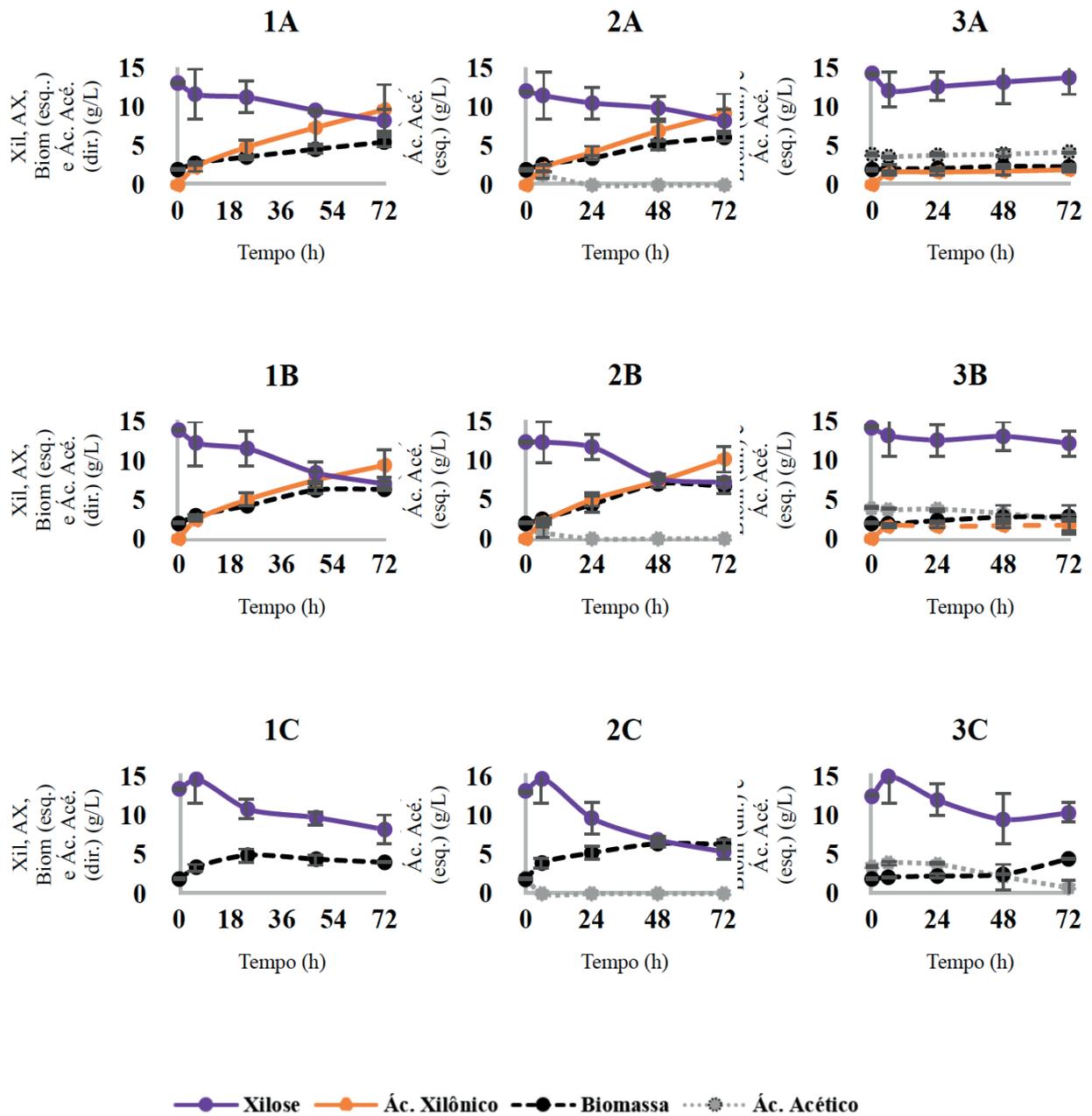
Este trabalho utiliza as linhagens *Kp*-HAA1 (Paes, 2021), *Kp*-XDH (Ramos et al., 2021) e *Kp*-XDH-HAA1 (Ferreira, 2022).

Foram utilizados meios de cultura YPD ágar, YPD, YPX, YPDX e hidrolisado de cana, além de tampão ftalato de potássio para tamponar o pH dos meios de cultura em 5,5. O meio YPD constitui-se de extrato de levedura 1% (peso/vol), peptona 2% (peso/vol) e glicose 20 g/L. Para o meio sólido, foi acrescentado ágar bacteriológico a 2% (peso/vol). No meio YPX, a glicose do YPD foi substituída por xilose 20 g/L. Para o meio com hidrolisado, foi utilizado 20% desse composto diluído em água destilada.

Para a avaliação do desempenho das linhagens, a linhagem desejada foi inoculada em 30 mL de YPD como pré-inóculo. Após o crescimento desse pré-inóculo em um *shaker* durante 12 horas, 200 rpm e 28 °C, inocularam-se as leveduras em 40 mL do meio de cultura desejado em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Então, os frascos foram incubados nas mesmas condições anteriores. A cada 24 horas, era medida a densidade óptica a 600 nm em um espectrofotômetro (OD600) e amostras de sobrenadante do meio eram coletadas para análises de cromatografia líquida de alta eficiência.

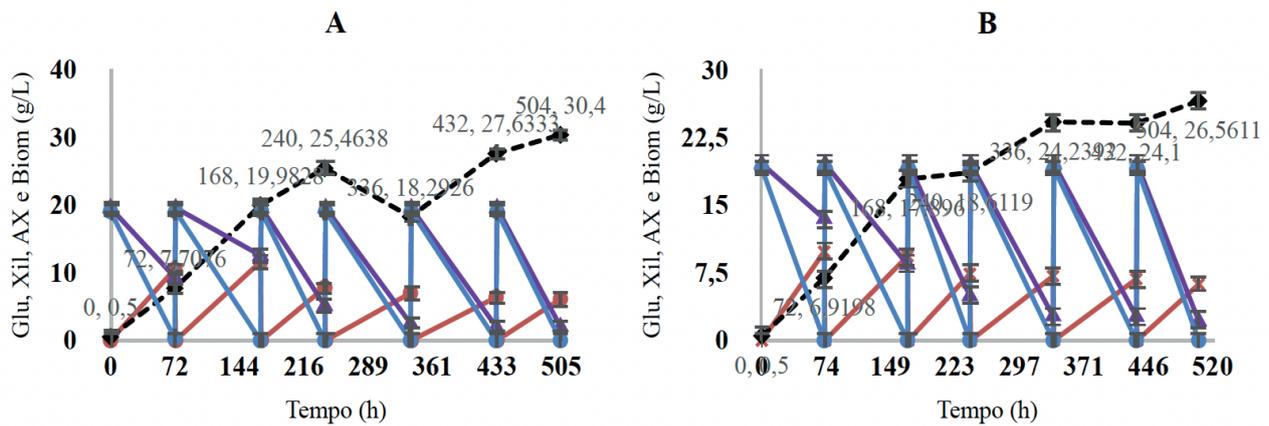
## Resultados e discussão

O efeito da expressão do fator de transcrição HAA1 na tolerância ao ácido acético e na produção de AX foi avaliado pelo cultivo das linhagens *Kp*-XDH, *Kp*-HAA1 e *Kp*-XDH-HAA1 em meio YPX suplementado com 0, 2 g/L e 4 g/L de ácido acético (AA). Os resultados do experimento demonstram que o comportamento das três linhagens é parecido em concentrações de 0 g/L e 2 g/L, exceto pela maior velocidade no consumo de AA pelas linhagens superexpressando HAA1 (Figura 1). O mesmo padrão foi observado no meio com 4 g/L de AA (Figura 2), em que o crescimento celular da levedura foi bastante reprimido. Em relação ao consumo dos 15 g/L de xilose acrescidos no começo do experimento para produção do ácido xilônico, durante o experimento, a linhagem recombinante *Kp*-XDH-HAA1 consumiu melhor a xilose nas concentrações de 0 g/L e 2 g/L do que a linhagem *Kp*-XDH, conseqüentemente, a produção de ácido xilônico teve seu maior desempenho nessa linhagem recombinante.



**Figura 1.** Perfil fermentativo em meio YPX + AA 0 g/L (1), 2 g/L (2) e 4 g/L (3) usando as linhagens *Kp*-XDH (A), *Kp*-XDH-HAA1 (B) *Kp*-HAA1 (C). Experimento realizado em triplicata e dados médios e desvio padrão plotados.

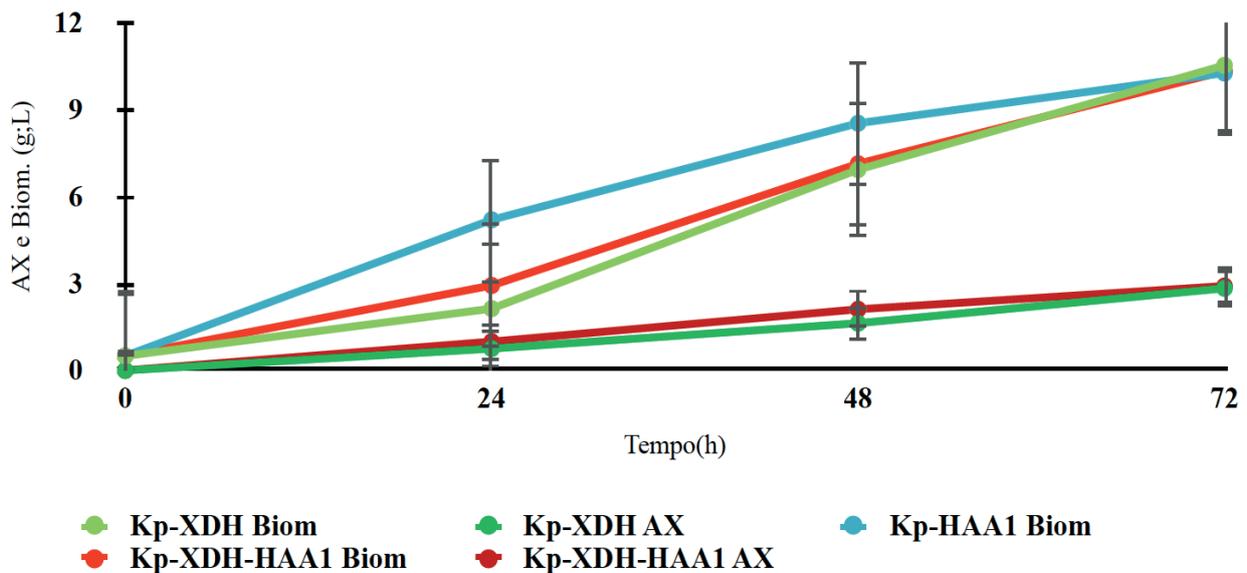
Na concentração de 4 g/L, como havia uma grande condição de estresse, o crescimento celular foi quase inexistente, com uma pequena ênfase na linhagem *Kp*-HAA1 que conseguiu resistir mais a esse composto. Também houve menor produção de ácido xilônico. As linhagens *Kp*-XDH e *Kp*-XDH-Haa1 produziram 9,16 g/L e 10,18 g/L de AX na presença de 2 g/L de AA, enquanto, na presença de 4 g/L de AA, produziram somente 1,93 g/L e 1,76 g/L de AX.



**Figura 2.** Perfil fermentativo em meio YPDx das linhagens Kp-XDH (A) e Kp-XDH-HAA1 (B). Experimento realizado em triplicata e os valores médios são apresentados.

Para o reciclo das células, todas as células eram coletadas do meio por centrifugação e transferidas para um novo meio a cada ciclo. Conforme esperado, os resultados demonstram que a cada reciclo novo a biomassa das linhagens era maior (Figura 2). Consequentemente, com um maior número de células, a quantidade de xilose colocada no meio (10 g/L) foi consumida completamente a cada reciclo. A glicose foi consumida em sua totalidade rapidamente pelas linhagens. Não se observaram diferenças significativas na produção de AX pelas duas linhagens ao longo do experimento (Figura 2). Com base nos resultados, nota-se que a quantidade de xilose pode ter sido limitante para se observar variações na produção de AX, e um novo experimento com concentrações crescente de xilose deve ser realizado.

Finalmente, comparou-se o desempenho das linhagens na presença de hidrolisado de cana. Os resultados demonstram que a linhagem Kp-HAA1 atingiu maior biomassa celular (Figura 3). As linhagens Kp-XDH e Kp-XDH-Haa1 demonstraram perfil semelhante tanto no crescimento celular quanto na produção de AX (Figura 3).



**Figura 3.** Perfil fermentativo em meio hidrolisado lignocelulósico (20%). Experimento realizado em triplicata e os valores médios são apresentados.

## Conclusão

De acordo com as informações discutidas anteriormente, a superexpressão do fator de transcrição HAA1 favorece a resposta de *K. phaffii* ao ácido acético tanto em meio sintético quanto em hidrolisado de biomassa, permitindo melhor crescimento e assimilação desse composto mais rapidamente.

A linhagem recombinante *Kp*-XDH-Haa1 se apresentou como a mais eficiente para produzir ácido xilônico na presença de 2 g/L ácido acético. A concentração de 4 g/L mostrou o pior resultado em comparação com o controle sem ácido acético porque foi a que produziu as menores quantidades de ácido xilônico e biomassa, apesar disso, demonstrou que a linhagem *Kp*-HAA1 é a mais resistente em condições extremas.

Mesmo com a falta de glicose no meio de cultivo, uma quantidade considerável de, aproximadamente, 10 g/L de ácido xilônico foi produzido, demonstrando que talvez não seja necessário o uso de glicose, inicialmente, no meio para produção do ácido xilônico, já que essas linhagens de leveduras conseguem sobreviver e produzir o ácido xilônico assimilando apenas a xilose do meio.

Por último, não foi encontrada diferença significativa no cultivo em hidrolisado, exceto pelo fato de a linhagem *Kp*-HAA1 ter crescido um pouco melhor que as demais linhagens.

## Referências bibliográficas

- BULL, S. R. Renewable alternative fuels: alcohol production from lignocellulosic biomass. **Renewable Energy**, v. 5, Part. II, p. 799-806, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0960-1481\(94\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0960-1481(94)90091-4)
- CAI, J.; HE, Y.; YU, X.; BANKS, S. W.; YANG, Y.; ZHANG, X.; YU, Y.; LIU, R.; BRIDGWATER, A. V. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 309-322, 2017. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.072>. Acesso em: 27 jul. 2023.
- CHUN, B. W. The development of cement and concrete additive. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 131, p. 645-658. Mar., 2006. DOI: <https://doi.org/10.1385/ABAB:131:1:645>.
- FERREIRA, L. M. M. **Expressão do fator de transcrição Haa1 em *Komagataella phaffii***: efeito na tolerância a ácido acético e na produção de ácido xilônico. 2022. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2022. Disponível em: <http://icts.unb.br/jspui/handle/10482/46136>. Acesso em: 27 jul. 2023.
- GOVIL, T.; JIA, W.; DIPAYAN, S.; TRIPATHI, A.; RAUNIYAR, S.; SALEM, D. R.; RAJESH, K. S. Lignocellulosic feedstock: a review of a sustainable platform for cleaner production of nature's plastics. **Journal of Cleaner Production**, v. 270, p. 2-10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122521>.
- JIN, D.; MA, J.; LI, Y.; JIAO, G.; LIU, K.; SUN, S.; ZHOU, J.; SUN, R. Development of the synthesis and applications of xylonic acid: a mini-review. **Fuel**, v. 314, p. 1-10, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122773>.
- PAES, B. G. **Molecular and physiological responses of *Pichia pastoris* to lignocellulosic hydrolysate components**. 2021. 130 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2021. Disponível em: [http://icts.unb.br/jspui/bitstream/10482/42011/1/2021\\_B%C3%A1rbaraGomesPaes.pdf](http://icts.unb.br/jspui/bitstream/10482/42011/1/2021_B%C3%A1rbaraGomesPaes.pdf). Acesso em: 27 jul. 2023.
- RAMOS, T. G. S. JUSTEN, F.; CARNEIRO, C. V. G. C.; HONORATO, V. M.; FRANCO, P. F.; VIEIRA, F. S.; TRICHEZ, D.; RODRIGUES, C. M. R.; ALMEIDA, J. R.M. Xylonic acid production by recombinant *Komagataella phaffii* strains engineered with newly identified xylose dehydrogenases. **Bioresource Technology Reports**, v. 16, p. 100825, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100825>.
- WEBER, N. DE A. B.; ROCHA, B. P. DA; SCHNEIDER, P. S.; DAEMME, L. C.; PENTEADO NETO, R. DE A. Energy and emission impacts of liquid fueled engines compared to electric motors for small size motorcycles based on the Brazilian scenario. **Energy**, v. 168, p. 70-79, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.11.051>
- ZHANG, Z.; YANG, Y.; WANG, Y.; GU, J.; LU, X.; LIAO, X.; SHI, J.; KIM, C. H.; LYE, G.; BAGANZ, F.; HAO, J. Ethylene glycol and glycolic acid production from xylonic acid by *Enterobacter cloacae*. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 89, p. 1-16, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01347-8>