



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**ENGENHARIA METABÓLICA DE *ZYMO MONAS MOBILIS* PARA A PRODUÇÃO  
DE ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DE XILOSE**

Christiane Ribeiro Janner Herrera

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres

**BRASÍLIA**  
**SETEMBRO/2021**

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Engenharia Metabólica de *Zymomonas mobilis* para a Produção de Ácidos Orgânicos a partir de Xilose**

Christiane Ribeiro Janner Herrera  
Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular.

Brasília, 2021

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres, com apoio financeiro do CNPq.

**Banca Examinadora**

Professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres  
Universidade de Brasília  
Presidente da Banca

Professora Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes  
Universidade de Brasília  
Examinadora Interna

Dr. Elibio Leopoldo Rech Filho  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Examinador Externo

Professora Dra. Eloane Malvessi  
Universidade de Caxias do Sul  
Examinadora Externa

Professor Dr. Ricardo Henrique Krüger  
Universidade de Brasília  
Membro Suplente

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de realizar meus sonhos, pela força para trilhar este caminho e pelo crescimento acadêmico e pessoal.

Ao meu marido e melhor amigo Paulo, por todas as ajudas e por estar sempre presente, mesmo que a um oceano, literalmente, de distância.

Aos meus pais Nidia e Nilvo e minha irmã Juliana, pelo apoio incondicional e incentivo na busca dos meus sonhos.

Ao professor Fernando Araripe Torres pela oportunidade e por acreditar em mim, pelo apoio, ajuda e disponibilidade sempre que necessário.

À professora Janice De Marco pelos ensinamentos dados com muita paciência e por sempre estar disponível a ajudar.

À professora Lídia Maria Pepe de Moraes, não só pela participação na banca, como também pelos ensinamentos compartilhados ao longo da execução deste trabalho.

Aos amigos de laboratório, Ana Laura, Carmen, Cecília, Francisco, Igor, Pedro, Roberta e Tiago, que sempre estiveram dispostos a ajudar. Às amigas Vanessa e Yasmin pelos momentos de descontração e fondues da Cacau Show e à Viviane, que nunca deixou de me ajudar neste caminho científico. Ao João Ricardo e à Clara pelo auxílio indispensável nas fermentações realizadas na Embrapa.

Aos técnicos da BioMol, Thompson e José, sem os quais seria muito mais difícil a realização de qualquer trabalho.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e por oferecer melhorias ao meu trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram e me ajudaram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*Assim, permanecem agora estes três:*

*a fé, a esperança e o amor.*

*O maior deles, porém, é o amor.*

1Co 13:13

## Sumário

Lista de Figuras .....	i
Lista de Tabelas .....	v
Lista de Abreviaturas e Símbolos .....	vi
Resumo .....	vii
Abstract.....	viii
1. Introdução .....	1
1.1 A biomassa lignocelulósica .....	2
1.2 Metabolismo da xilose.....	5
1.3 Ácidos orgânicos .....	6
1.4 Ácido itacônico.....	8
1.5 Ácido xilônico .....	12
1.6 A bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> .....	14
1.6.1 Características gerais e breve histórico .....	14
1.6.2 Metabolismo central de <i>Z. mobilis</i> .....	17
1.6.3 Cadeia respiratória.....	21
1.6.4 Genoma de <i>Z. mobilis</i> .....	24
1.6.5 Tolerância de <i>Z. mobilis</i> a inibidores em hidrolisados lignocelulósicos ..	25
1.6.6 Aplicações biotecnológicas de <i>Z. mobilis</i> .....	26
2. Objetivos.....	30
2.1 Objetivo Geral .....	30
2.2 Objetivos Específicos .....	30
3. Estratégia Experimental.....	31
4. Materiais e Métodos.....	32
4.1 Micro-organismos.....	32
4.2 Genes heterólogos expressos em <i>Z. mobilis</i> .....	32
4.3 Meios de cultura e cultivo celular.....	34

4.4	Soluções.....	35
4.5	Enzimas de restrição.....	37
4.6	Vetores.....	37
4.7	Amplificação de DNA por PCR.....	41
4.8	Preparo de células bacterianas competentes.....	47
4.9	Construção de plasmídeos e transformação de <i>E. coli</i> .....	47
4.10	Transformação de <i>Z. mobilis</i> por eletroporação.....	50
4.11	Teste de tolerância e consumo de ácido itacônico.....	51
4.12	Teste de produção de ácido xilônico e seleção de linhagens.....	51
4.13	. Produção de ácido xilônico em batelada.....	52
4.14	Cálculos de produtividade, rendimento e taxa de crescimento específico.....	53
4.15	Métodos analíticos.....	53
5.	Resultados e Discussão.....	54
	Capítulo I.....	55
5.1	Produção de ácido itacônico por <i>Z. mobilis</i> .....	55
	5.1.1 Testes de tolerância e consumo de ácido itacônico.....	55
	5.1.2 Construção de vetores integrativos e de expressão para <i>Z. mobilis</i> .....	57
	5.1.3 Integração no genoma de <i>Z. mobilis</i> .....	62
	5.1.4 Testes de produção de ácido itacônico.....	65
	Capítulo II.....	70
5.2	Produção de ácido xilônico por <i>Z. mobilis</i> .....	70
	5.2.1 Construção de vetores de expressão para os genes XDH.....	70
	5.2.2 Produção de ácido xilônico por <i>Z. mobilis</i> expressando genes XDH.....	73
5.3	Coexpressão dos genes XDH e XL.....	77
5.4	Construção dos cassetes de deleção e vetores de expressão.....	81
5.5	Deleções gênicas.....	84
5.6	Produção de ácido xilônico pelas linhagens deletadas.....	87

5.7	Produção de ácido xilônico por fermentação em batelada simples .....	88
5.8	Uso de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em fermentação em batelada .....	90
5.9	Clonagem do transportador <i>xylE</i> .....	92
5.10	Avaliação do transportador <i>xylE</i> na produção de ácido xilônico .....	99
6.	Conclusões e Perspectivas .....	104
7.	Referências Bibliográficas .....	106
8.	Apêndices.....	121
8.1	Mapas de restrição dos vetores de expressão dos genes XDH.....	121
8.2	Mapas de restrição dos vetores de expressão contendo o gene <i>xylE</i> .....	124
8.3	Artigo publicado – Resultados apresentados no Capítulo II .....	125

## Lista de Figuras

Figura 1. Demanda de petróleo (direita) e gás natural (esquerda) em 2017 por setor.....	1
Figura 2. Desenho esquemático da estrutura do material lignocelulósico. ....	4
Figura 3. Produtos químicos que podem ser produzidos a partir da engenharia metabólica de micro-organismos para utilização de xilose. ....	4
Figura 4. Metabolismo da xilose pelas vias de oxirredução (em verde) e isomerização (em vermelho).....	5
Figura 5. Representação das vias de Dahms (em roxo - A) e Weimberg (em azul - B).....	6
Figura 6. Estrutura química do ácido itacônico.....	8
Figura 7. Via metabólica da produção de ácido itacônico em <i>A. terreus</i> . ....	9
Figura 8. Via Entner-Doudoroff em <i>Z. mobilis</i> . ....	18
Figura 9. Estratégia experimental adotada para o presente trabalho. ....	31
Figura 10. Mapa de restrição do vetor pBBR1MCS1, utilizado para a expressão gênica em <i>Z. mobilis</i> . ....	38
Figura 11. Mapa de restrição do vetor pPCV, utilizado para a construção de cassetes de deleção para <i>Z. mobilis</i> . ....	38
Figura 12. Crescimento de <i>Z. mobilis</i> na presença de diferentes concentrações de ácido itacônico. ....	55
Figura 13. Teste de consumo de ácido itacônico por <i>Z. mobilis</i> . ....	57
Figura 14. Amplificação dos fragmentos para construção dos cassetes de deleção.....	58
Figura 15. Amplificação do cassete de deleção do gene ZMO0976 contendo o Operon X.....	60
Figura 16. Amplificação do cassete de deleção do gene ZMO1237 contendo o Operon T. ....	60
Figura 17. Confirmação da clonagem do cassete de deleção do gene ZMO0976 contendo o Operon X. ....	61

Figura 18. Confirmação da clonagem do cassete de deleção do gene ZMO1237 contendo o Operon T.....	61
Figura 19. Confirmação da clonagem do gene <i>CAD1</i> no vetor pBBR1MCS2..	62
Figura 20. Amplificação do <i>operon recET</i> a partir do genoma de <i>E. coli</i> .....	64
Figura 21. Confirmação da clonagem do <i>operon recET</i> no vetor pBBR1MSC1.....	64
Figura 22. PCR de colônia de transformantes de <i>Z. mobilis</i> contendo o <i>operon recET</i> .....	65
Figura 23. PCR de colônia de transformantes de <i>Z. mobilis</i> contendo gene <i>CAD1</i> .....	66
Figura 24. Amplificação do promotor pBAD juntamente com o gene <i>araC</i> .....	67
Figura 25. Confirmação da clonagem do gene <i>CAD1</i> sob controle do promotor pBAD no vetor pBBR1MSC1. ....	67
Figura 26. PCR de colônia de transformantes de <i>Z. mobilis</i> contendo gene <i>CAD1</i> sob controle do promotor pBAD.....	67
Figura 27. Amplificação dos genes XDH.....	71
Figura 28. Confirmação das clonagens dos genes XDH no vetor pBBR1MCS1.....	72
Figura 29. Mapa de restrição do vetor pB1-XDH CC.....	72
Figura 30. PCR de colônia de transformantes de <i>Z. mobilis</i> contendo os genes XDH. ....	73
Figura 31. Produção de ácido xilônico por <i>Z. mobilis</i> expressando diferentes genes XDH ....	74
Figura 32. Produção de ácido xilônico (círculo azul escuro) e consumo de xilose (losango azul claro) pela linhagem de ZM4 BX ao longo do tempo. ....	75
Figura 33. Mapa de restrição do vetor pB1-BXL (A) e confirmação da sua construção (B)...	78
Figura 34. PCR de colônia de transformantes de <i>Z. mobilis</i> contendo o <i>operon</i> com os genes BX e XL. ....	78
Figura 35. Comparativo da produção de ácido xilônico entre as linhagens ZM4 BX (círculos verdes), ZM4 BXL (triângulos azuis) e ZM4 C- (quadrados cinzas).....	79

Figura 36. Comparação do crescimento das linhagens ZM4 BX e ZM4 BXL em glicose ou glicose com xilose. ....	80
Figura 37. Confirmação da construção do vetor pV- $\Delta$ 0976 contendo o cassete de deleção para o gene ZMO0976.....	82
Figura 38. Confirmação da construção do vetor pV- $\Delta$ 1237 contendo o cassete de deleção para o gene ZMO1237.....	83
Figura 39. Confirmação da construção do vetor pB1-CreA para expressão da recombinase Cre. ....	83
Figura 40. Confirmação da deleção do gene ZMO0976 e remoção da marca de seleção.....	84
Figura 41. Confirmação da deleção do gene ZMO1237 e remoção da marca de seleção.....	85
Figura 42. Confirmação da deleção do gene ZMO1237 na linhagem ZMa e remoção da marca de deleção. ....	86
Figura 43. Crescimento das linhagens deletadas em meio contendo espectinomicina. ....	87
Figura 44. Produção de ácido xilônico pelas linhagens modificadas de <i>Z. mobilis</i> expressando o gene BX.....	88
Figura 45. Perfil fermentativo das linhagens ZMa BX e ZMa C-.....	89
Figura 46. Perfil fermentativo da linhagem ZMa BX em meio contendo hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. ....	90
Figura 47. Cromatogramas das amostras fermentativas de <i>Z. mobilis</i> mostrando o decréscimo no pico referente ao furfural. ....	91
Figura 48. Amplificação e PCR de sobreposição do gene <i>xylE</i> . ....	93
Figura 49. Confirmação da clonagem do gene <i>xylE</i> no vetor pBBR1MCS2. ....	93
Figura 50. Estrutura tridimensional do bolso de ligação ao substrato do transportador XylE ligado à glicose. ....	94
Figura 51. Confirmação da clonagem do gene <i>xylE</i> mutado no vetor pBBR1MCS2. ....	95

Figura 52. Amplificação dos fragmentos do gene <i>xylE</i> e confirmação da sua clonagem. ....	96
Figura 53. Amplificação das versões do gene <i>xylE</i> .....	97
Figura 54. Mapa de restrição do vetor pB1-BX <i>xylE</i> contendo o <i>operon</i> com o gene BX e <i>xylE</i> selvagem.....	98
Figura 55. Confirmação da clonagem das diferentes versões do gene <i>xylE</i> no vetor pB1-XDH BX.....	98
Figura 56. PCR de colônia dos transformantes contendo o <i>operon</i> com o gene BX e variantes do gene <i>xylE</i> .....	99
Figura 57. Produção de ácido xilônico pelas linhagens coexpressando o gene BX e <i>xylE</i> (A) e seu crescimento (B). ....	100
Figura 58. Crescimento das linhagens coexpressando o gene BX e <i>xylE</i> em meio contendo apenas glicose (A) e glicose e xilose (B).....	100
Figura 59. Consumo de glicose por ZMa BX e pelas linhagens coexpressando o gene BX e <i>xylE</i> . ....	102
Figura 60. Alinhamento das sequências genéticas das diferentes versões do gene <i>xylE</i> .....	103
Figura 61. Alinhamento das sequências genéticas das diferentes versões do gene <i>xylE</i> .....	103

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Micro-organismos geneticamente modificados para a produção de ácido xilônico. 14	
Tabela 2. Linhagens de <i>E. coli</i> utilizadas neste trabalho.....	32
Tabela 3. Genes XDH expressos em <i>Z. mobilis</i> . .....	33
Tabela 4. Antibióticos utilizados neste trabalho.....	36
Tabela 5. Plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho. ....	39
Tabela 6. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a construção dos vetores contendo os genes XDH e <i>CAD1</i> . .....	42
Tabela 7. Sequências de oligonucleotídeos utilizados para a construção dos vetores contendo o gene <i>xylE</i> .....	44
Tabela 8. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a construção dos vetores contendo os cassetes de deleção com ou sem os <i>operons</i> de metabolismo de xilose, os genes <i>recE</i> , <i>recT</i> e <i>cre</i> e para confirmações. ....	45
Tabela 9. Taxas de crescimento específicas e tempo de duplicação de <i>Z. mobilis</i> em meio contendo ácido itacônico. ....	56
Tabela 10. Produção e produtividade de ácido xilônico alcançado por <i>Z. mobilis</i> expressando diferentes genes XDH.....	74
Tabela 11. Comparativo da produtividade volumétrica alcançada por micro-organismos modificados para a produção de ácido xilônico. ....	76
Tabela 12. Produção de ácido xilônico, produtividade e rendimento alcançados pelas linhagens modificadas de <i>Z. mobilis</i> expressando o gene BX após 24 h de cultivo. ....	88

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

µm	micrometros
CAD	<i>cis</i> -aconitato descarboxilase
ED	Entner-Doudoroff
Mb	megabase
OD <sub>600</sub>	densidade óptica em 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i> (janela aberta de leitura)
m/v	peso por volume
pb	pares de base
rpm	rotações por minuto
TCA	ciclo do ácido tricarboxílico
XDH	xilose desidrogenase
XL	xilonolactona

## Resumo

Os ácidos orgânicos apresentam potencial de substituir produtos petroquímicos e oferecem grupamentos funcionais para a sua conversão em materiais de alto valor agregado. Exemplos incluem os ácidos itacônico e xilônico, que foram escolhidos dentre 30 blocos de construção selecionados por um relatório do NREL (*National Resource Energy Laboratory*), ambos apresentando importantes aplicações na indústria química. Organismos procarióticos já foram modificados para a produção destes dois ácidos orgânicos, demonstrando, assim, o potencial da sua produção por rota biotecnológica. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de linhagens de *Zymomonas mobilis* capazes de produzir ácido itacônico e xilônico a partir de xilose, cuja utilização é relevante para a valorização da biomassa lignocelulósica. Para a utilização da xilose como fonte de carbono para a produção de ácido itacônico, a integração dos genes de metabolização da xilose *xylA*, *xylB*, *tktA* e *talB* era necessária, contudo, isto não foi possível. Ainda, a expressão do gene *CAD1*, codificador da enzima chave na produção de ácido itacônico *cis*-aconitato descarboxilase, não levou à produção deste ácido por *Z. mobilis*. Em contrapartida, *Z. mobilis* foi capaz de produzir ácido xilônico. Primeiramente, foram avaliados sete genes codificadores da enzima XDH (xilose desidrogenase), tendo sido selecionado o gene correspondente de *Paraburkholderia xenovorans*, o qual levou a uma produtividade volumétrica de  $1,85 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , aproximadamente 93% maior do que aquela apresentada quando *Z. mobilis* expressou o gene de *Caulobacter crescentus*, o mais utilizado na literatura para a engenharia de linhagens produtoras de ácido xilônico. Após a deleção do gene da xilose redutase, *Z. mobilis* foi capaz de produzir  $56,44 \pm 1,93 \text{ g L}^{-1}$  de ácido xilônico a partir de  $54,27 \pm 0,26 \text{ g L}^{-1}$  de xilose em biorreator, com rendimento de  $1,08 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{AX}} \text{ g}_{\text{X}}^{-1}$ , o que representa 97,3% do máximo teórico para este bioprocessos. Esta linhagem também foi avaliada na fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, o que resultou na produção de  $11,13 \text{ g L}^{-1}$  de ácido xilônico a partir de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de xilose. Na tentativa de melhorar ainda mais este processo, foi expresso o gene *xylE* de *Escherichia coli*, codificador para um transportador de xilose. Contudo, as linhagens expressando este transportador tiveram seu crescimento prejudicado e uma menor produção de ácido xilônico. Os resultados aqui apresentados demonstram que *Z. mobilis* pode ser considerada como uma potencial plataforma de produção de ácidos orgânicos utilizando a biomassa lignocelulósica como fonte de carbono, estando dentro do contexto de biorrefinarias.

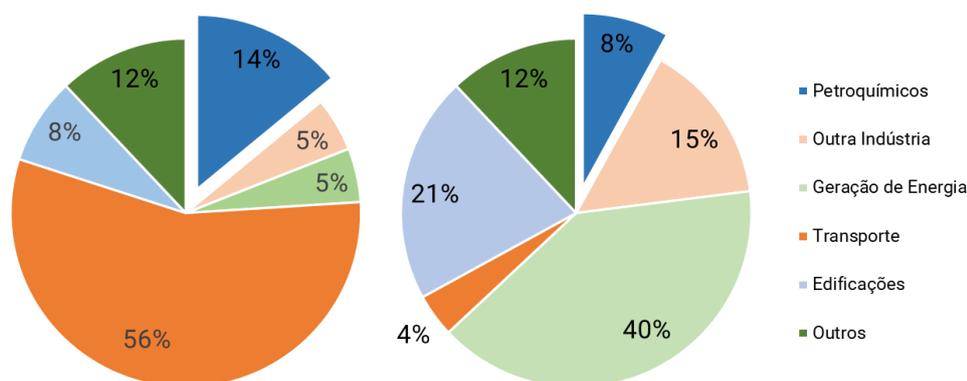
## Abstract

Organic acids can replace petrochemical products and provide functional groups that can be used in its conversion into high value materials. Examples include itaconic and xylonic acids, which were chosen as the top 30 high value chemicals by a NREL report and both present important applications in chemical industry. Prokaryotic organisms have already been engineered for the production of these two organic acids, thus showing the viability of the biotechnological route for their production. This way, the aim of this work was the development of *Zymomonas mobilis* strains capable of producing itaconic and xylonic acids from xylose, whose utilization is of utmost importance in lignocellulosic biomass valorization. In order to utilize xylose as carbon source for the production of itaconic acid, it was necessary to integrate the genes from xylose pathway (*xylA*, *xylB*, *tktA*, *talB*). However, this integration was not possible probably due to the large size of the integration cassettes. The expression of the *CAD1* gene, coding for the key enzyme of itaconic acid production *cis*-aconitate decarboxylase, did not lead to the production of the aforementioned acid in *Z. mobilis*. In contrast, *Z. mobilis* was able to produce xylonic acid. Firstly, seven coding genes for the enzyme XDH (xylose dehydrogenase) were evaluated, and the corresponding gene from *Paraburkholderia xenovorans* was selected. The expression of this gene led to a volumetric productivity of  $1.85 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , an increasing of approximately 93% compared to the strain expressing XDH gene from *Caulobacter crescentus*, the most utilized enzyme for metabolic engineering of microorganisms for xylonic acid production. After the deletion of xylose reductase gene in *Z. mobilis*, the engineered strain was able to produce  $56.44 \pm 1.93 \text{ g L}^{-1}$  xylonic acid from  $54.27 \pm 0.26 \text{ g L}^{-1}$  xylose in bioreactor, reaching a yield of  $1.08 \pm 0.02 \text{ g}_{\text{AX}} \text{ g}_{\text{X}}^{-1}$ , which represents 97,3% of the theoretical maximum for this bioprocess. This strain was also evaluated in the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate, which resulted in the production of  $11.13 \text{ g L}^{-1}$  xylonic acid from  $10 \text{ g L}^{-1}$  xylose. In the attempt of further increasing the production of xylonic acid in this process, the coding gene for xylose transporter, *xylE*, from *Escherichia coli* was expressed in *Z. mobilis*. However, the strain expressing this transporter had its growth impaired and showed a smaller xylonic acid production compared to the strain without the transporter. The results of this work reveal that *Z. mobilis* can be regarded as a potential platform for the organic acid production using lignocellulosic biomass as a carbon source in the context of biorefineries.

## 1. Introdução

A sociedade atual tornou-se dependente de produtos químicos. Estes produtos, derivados de petroquímicos, estão presentes e são fundamentais nos mais variados aspectos do estilo de vida moderno. Os dois maiores produtos da indústria química são os plásticos, grupo de materiais que mais crescem no mundo, e os fertilizantes, que sustentam praticamente metade da produção de alimentos do planeta (IEA - *International Energy Agency*, 2018). Demonstra-se assim, a importância desta indústria para a sociedade.

Contudo, a indústria química também é o setor que mais consome energia, sendo também o terceiro maior setor na emissão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Além disso, a manufatura de petroquímicos e seus derivados consomem uma quantidade crescente do petróleo e gás natural mundial. Em 2017, aproximadamente 14% (13 milhões de barris por dia) do petróleo e 8% do gás natural (300 bilhões de metros cúbicos) foram utilizados por este setor (IEA - *International Energy Agency*, 2018) (Figura 1). Observa-se que a segunda maior demanda por petróleo, após o setor de transportes, é da indústria petroquímica. Já para o gás natural, esta conta com 8% após os setores de geração de energia e de aquecimento de espaços e água em edificações, porém ainda demandando o dobro que o setor inteiro de transportes (IEA - *International Energy Agency*, 2018). Ressalta-se que estas proporções incluem a energia despendida por esta indústria e também o material utilizado como matéria-prima.



**Figura 1. Demanda de petróleo (direita) e gás natural (esquerda) em 2017 por setor.** Modificado de IEA - *International Energy Agency*, 2018.

Revela-se, assim, que a indústria química ainda é dependente de matérias-primas provenientes de recursos fósseis, que não são renováveis e que contribuem para o aumento da emissão de CO<sub>2</sub> e para a mudança climática global. O uso de recursos fósseis, além de trazer danos ambientais, está submetido a problemas relacionados à depleção destas reservas. Um destes problemas é o aumento dos custos de produção à medida que as reservas são exauridas,

uma vez que são utilizadas tecnologias mais caras para a exploração e extração de recursos menos atrativos, além da segurança das reservas, uma preocupação originada principalmente em regiões politicamente instáveis (GOLDEMBERG, 2007). Nesse sentido, os protocolos de Kyoto e Paris respaldam uma demanda da própria sociedade de combater a mudança climática, incentivando a utilização não só de combustíveis limpos e renováveis, mas também de vias sustentáveis para a produção de químicos (RAMOS; DUQUE, 2019).

Ainda, os ácidos orgânicos, especialmente os ácidos carboxílicos, podem ser substitutos para produtos químicos, já tendo sido aplicados amplamente nas indústrias alimentícia e farmacêutica (LIU *et al.*, 2017). Eles podem ser utilizados como *building blocks* (blocos de construção), sendo que seu papel como plataformas para a produção de químicos vem aumentando à medida que podem substituir produtos baseados no petróleo, que são insustentáveis a longo prazo (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2014).

Além disso, aumentaram nos últimos anos o interesse e as atividades comerciais de produção de químicos a partir de biomassa renovável por fermentação de micro-organismos. A manufatura desses químicos é mais compatível com o cuidado com o meio ambiente e pode substituir aqueles que são manufaturados a partir de matérias-primas baseadas em petróleo (WANG *et al.*, 2016). Assim, a fonte de matéria-prima alternativa para a atual indústria petroquímica seria baseada na biomassa vegetal, a única fonte de carbono orgânico sustentável da Terra (RAMOS; DUQUE, 2019).

### **1.1 A biomassa lignocelulósica**

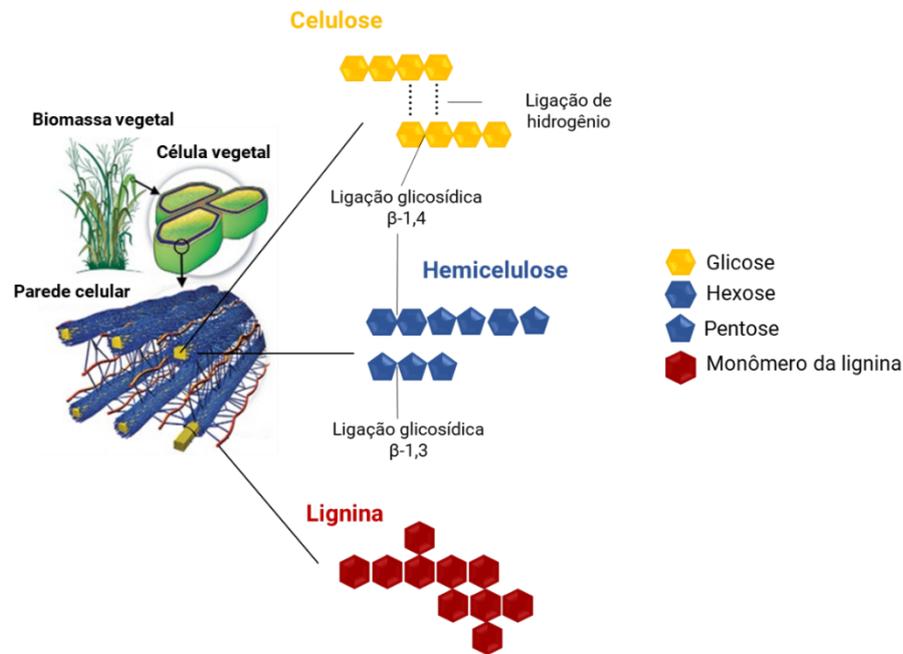
A biomassa é definida, segundo a Agência Internacional de Energia, como qualquer matéria orgânica que provém de fontes biogênicas e está disponível de forma renovável. Estas fontes incluem a biomassa vegetal originada de florestas e plantios agrícolas, sendo esta composta por celulose, hemicelulose e lignina. A composição bioquímica relativa varia de acordo com a espécie da planta (AHORSU; MEDINA; CONSTANTÍ, 2018). No caso do bagaço de cana-de-açúcar, resíduo produzido abundantemente no Brasil, a celulose compõe de 40 a 45% do material lignocelulósico, a hemicelulose compõe 30 a 35% e a lignina, 20 a 30% (BARUAH *et al.*, 2018).

A transformação de biomassa lignocelulósica, a qual pode ser composta por resíduos agrícolas e florestais, em produtos de alto valor agregado traz vantagens ambientais ao evitar o aumento da poluição uma vez que substitui uma produção baseada em recursos fósseis. Também traz vantagens econômicas, uma vez que sendo resíduos, não há competição com a

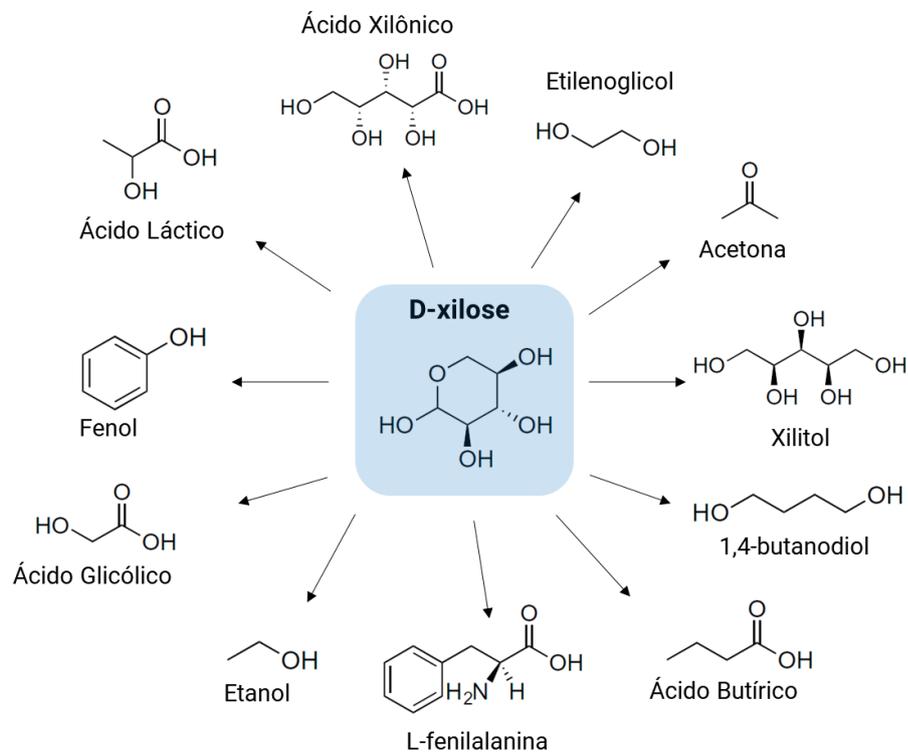
produção de alimentos, além de ser uma matéria prima de baixo custo que pode ser produzida de forma abundante e sustentável (DESSIE *et al.*, 2020). Ademais, sua utilização permite o desenvolvimento de biorrefinarias, cujo conceito é justamente o processamento sustentável de biomassa em uma variedade de produtos comercializáveis e de energia (IEA - *International Energy Agency*, 2012).

A porção celulolítica da biomassa lignocelulósica é composta exclusivamente por resíduos de glicose conectados de forma linear por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, as quais fornecem a sua estrutura compacta e cristalina, resistente à hidrólise. A hemicelulose, segundo maior componente do material lignocelulósico, possui composição variada, que consiste em pequenas cadeias de polissacarídeos variados como xilana, galactomanana, arabinoxilana, glicomanana e xiloglucana conectadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 ou  $\beta$ -1,3. Em contraste com a celulose, a hemicelulose possui uma estrutura amorfa e randômica que pode facilmente ser hidrolisada por ácidos e bases diluídos, assim como por uma variedade de hemicelulases (ARISTIDOU; PENTTILÄ, 2000; BARUAH *et al.*, 2018). Já a lignina forma uma barreira protetora, ligando-se covalentemente às cadeias de celulose e hemicelulose, o que aumenta a recalcitrância da biomassa lignocelulósica. É uma estrutura tridimensional complexa que consiste em unidades de fenil-propano que podem variar de acordo com o grupamento metoxílico presente no anel aromático. As três unidades básicas que constituem o polímero de lignina são o álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (BARUAH *et al.*, 2018). Um desenho esquemático da estrutura da biomassa lignocelulósica está presente na Figura 2.

Ademais, o açúcar mais abundante da hemicelulose é a xilose, sendo esta pentose o segundo açúcar de maior abundância na natureza (ARISTIDOU; PENTTILÄ, 2000), de forma que é um dos maiores alvos para sua utilização por vias fermentativas. Além disso, muitos estudos focaram a conversão da xilose principalmente em etanol e xilitol. Porém, outros produtos de alto valor agregado podem ser obtidos por meio da utilização da xilose, incluindo aminoácidos, químicos e plásticos alternativos (Figura 3). Por exemplo, esta pentose foi utilizada como substrato para a produção de 1,4-butanodiol (TAI *et al.*, 2016) e etilenoglicol (WANG *et al.*, 2018). Contudo, a utilização microbiana da xilose para a produção de produtos como o etanol ainda não é comercialmente viável (MCCLINTOCK; ZHANG, 2017). Assim, esforços devem ser feitos para que a hemicelulose, composta majoritariamente por xilose, seja também aproveitada como matéria prima renovável para a produção de compostos de interesse industrial.



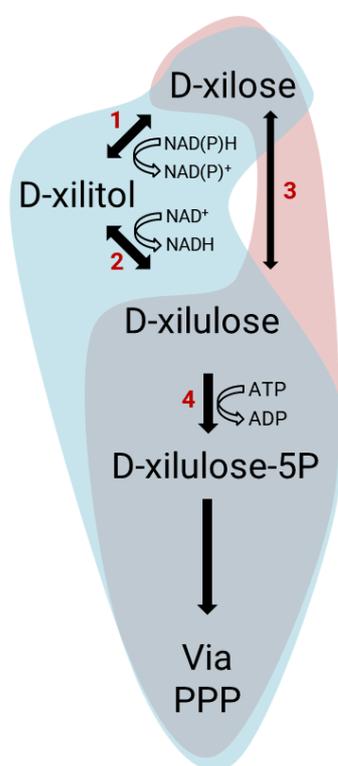
**Figura 2. Desenho esquemático da estrutura do material lignocelulósico.** Modificado de RITTER, 2008.



**Figura 3. Produtos químicos que podem ser produzidos a partir da engenharia metabólica de micro-organismos para utilização de xilose.** Modificado de MCCLINTOCK; ZHANG, 2017.

## 1.2 Metabolismo da xilose

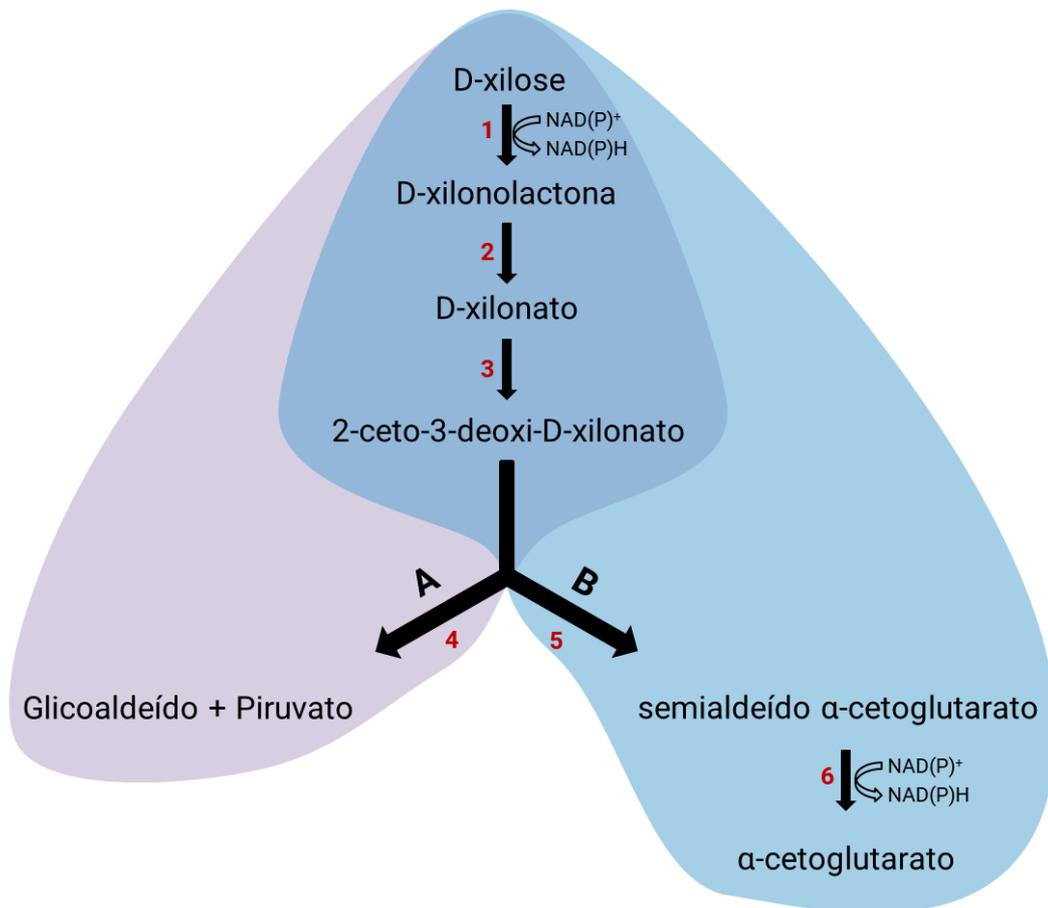
A fermentação de xilose nos micro-organismos é encontrada tanto em bactérias quanto em fungos. Em geral, a metabolização da xilose a xilulose ocorre por meio de duas vias distintas: a via de um passo, catalisada pela enzima xilose isomerase (XI), típica de bactérias; e a via de dois passos, catalisada pelas enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), geralmente encontrada em leveduras. Após, a xilulose é fosforilada pela enzima xiluloquinase (XK) a xilulose-5-fosfato, a qual é catabolizada pela via das pentoses fosfato (PPP) (Figura 4) e subsequentemente pelas vias glicolíticas Embden–Meyerhof–Parnas ou Entner-Doudoroff, no caso da bactéria *Zymomonas mobilis* (ARISTIDOU; PENTTILÄ, 2000).



**Figura 4. Metabolismo da xilose pelas vias de oxirredução (em verde) e isomerização (em vermelho). PPP: via das pentoses-fosfato. 1: xilose redutase; 2: xilitol desidrogenase; 3: xilose isomerase; 4: xiluloquinase.**

Além destas duas vias, há uma via alternativa que foi descrita pela primeira vez em 1961 por Weimberg na bactéria *Pseudomonas fragi* (WEIMBERG, 1961). Nesta, a xilose é oxidada a xilonolactona pela enzima xilose desidrogenase (XDH). A xilonolactona, por sua vez, é deslactonizada a ácido xilônico. Em seguida, ocorre uma desidratação a ácido 2-ceto-3-

deoxi-xilônico, sendo este convertido em semialdeído  $\alpha$ -cetogluturato, que, por fim, é convertido em ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Ainda, há outra via que compartilha os mesmos intermediários da via de Weimberg até ácido 2-ceto-3-deoxi-xilônico, denominada via de Dahms (DAHMS, 1974). Contudo, nesta via, este intermediário é convertido a glicolaldeído e piruvato. Estas duas vias estão representadas na Figura 5.



**Figura 5. Representação das vias de Dahms (em roxo - A) e Weimberg (em azul - B).** 1: xilose desidrogenase; 2: xilonolactonase (XL) (pode ser espontânea); 3: xilonato desidratase; 4: 2-ceto-3-deoxi-xilonato aldolase; 5: 2-ceto-3-deoxi-xilonato desidratase; 6: semialdeído  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase.

### 1.3 Ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos são compostos orgânicos com propriedades acídicas, sendo os mais comuns os ácidos carboxílicos, cuja acidez provém de seu grupamento carboxílico (-COOH). Eles também representam produtos biotecnológicos bem estabelecidos, cujas primeiras produções datam de 1823 (ácido acético) e 1913 (ácido cítrico) (BECKER *et al.*, 2015), sendo

que a introdução da produção de ácido cítrico por fermentação microbiana marca a fundação deste modo de produção em escala industrial para a manufatura de químicos (CHEN; NIELSEN, 2016). Eles também constituem um grupo chave entre os químicos denominados blocos de construção, uma vez que, devido a seus grupos funcionais, são úteis como materiais primários na indústria química (SAUER *et al.*, 2007). Além disso, sua produção por meio da fermentação microbiana traz a vantagem de substituir polímeros insustentáveis baseados em petróleo por aqueles produzidos a partir de biomassa (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2014).

As aplicações industriais dos ácidos orgânicos incluem seu uso na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, têxtil, além da sua utilização em detergentes e polímeros (LIU *et al.*, 2017). Outros exemplos de ácidos orgânicos utilizados na indústria química incluem os ácidos propiônico, butírico, láctico, málico, adípico, itacônico, succínico e fumárico. Tradicionalmente, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* são os micro-organismos de escolha para a produção de tais compostos, contudo, outros micro-organismos não convencionais têm emergido como hospedeiros adequados para a produção de ácidos carboxílicos de acordo com as necessidades industriais (LI *et al.*, 2020).

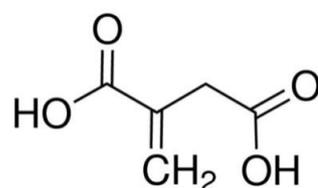
Além disso, o interesse em ácidos orgânicos derivados de açúcares aumentou recentemente como parte de um esforço em se desenvolver biorrefinarias para a produção de químicos para substituir aqueles atualmente derivados de petróleo. Há três classes de ácidos de açúcares: aldônicos, aldáricos e urônicos. Ácidos aldônicos são obtidos pela oxidação do grupamento aldeído terminal de uma aldose a ácido carboxílico, enquanto que os urônicos são formados pela oxidação do grupamento hidroxila terminal em ácido carboxílico. Ácidos aldáricos são gerados pela oxidação de ambos os grupamentos aldeído e hidroxila, gerando um ácido dicarboxílico (MEHTIÖ *et al.*, 2016). Como a produção destes ácidos é realizada diretamente de açúcares, a biomassa lignocelulósica é uma matéria prima conveniente para este tipo de bioprocessos, sendo o ácido xilônico um deles.

Neste trabalho, buscou-se a produção dos ácidos orgânicos itacônico e xilônico, os quais estão detalhados a seguir. Ambos os ácidos foram selecionados em um relatório realizado pelo NREL (*National Renewable Energy Laboratory*) como potenciais blocos de construção que podem ser produzidos a partir de açúcares (WERPY; PETERSEN, 2004).

#### 1.4 Ácido itacônico

Em 1836, a formação de um novo ácido a partir da destilação do ácido cítrico foi relatada (BAUP, 1836), sendo este novo ácido nomeado de “*citricic acid*”. Quatro anos após, foi demonstrado que a descarboxilação do ácido aconítico leva à sua conversão neste mesmo novo ácido, sendo este denominado de ácido itacônico (TURNER, 1840), que representa um anagrama de ácido aconítico (CORDES; MICHELUCCI; HILLER, 2015). Já em 1931, Kinoshita (KINOSHITA, 1931) descreveu pela primeira vez a produção de ácido itacônico *in vivo* a partir do fungo *Aspergillus itaconicus*, sendo que em 1939, Calam (CALAM; OXFORD; RAISTRICK, 1939) relatou a produção de ácido itacônico em quantidades consideráveis pelo fungo *Aspergillus terreus*, o qual é hoje a escolha dominante para a produção em escala comercial deste composto (CUNHA DA CRUZ; MACHADO DE CASTRO; CAMPORESE SÉRVULO, 2018).

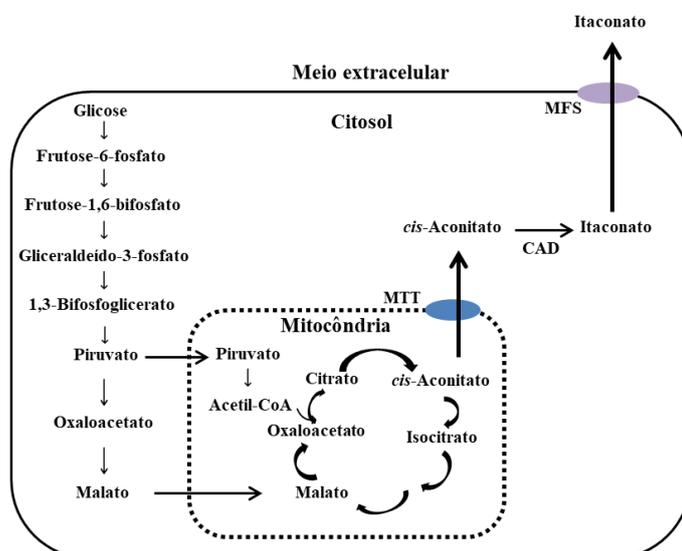
O ácido itacônico é um ácido dicarboxílico insaturado de cinco carbonos (Figura 6) que tem ocorrência natural. Este composto constitui uma importante plataforma química, com uma ampla variedade de aplicações potenciais, podendo ser utilizado para substituir vários químicos produzidos a partir do petróleo, como o ácido acrílico, o que reduziria assim, a dependência deste recurso fóssil (EL-IMAM; CHENYU, 2014).



**Figura 6. Estrutura química do ácido itacônico.** Fórmula molecular: C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>.

Em 2014, foram produzidas aproximadamente 51.000 toneladas de ácido itacônico mundialmente, sendo a China a principal produtora. Estima-se que seu mercado atinja cerca de US\$ 126 milhões, o que corresponde a um preço de US\$ 2,50 por quilograma (STEIGER *et al.*, 2017). Contudo, este valor ainda é muito alto, uma vez que para ser competitivo com produtos derivados de petróleo, seu valor deveria ser menor que US\$ 0,55/kg. Assim, há a necessidade de melhorar sua produtividade, sendo que para ser economicamente competitivo, a produtividade mínima deve ser 2,5 g/L/h (WERPY; PETERSEN, 2004). Dessa forma, desde a descoberta das vias metabólicas e dos genes envolvidos na produção de ácido itacônico em *A. terreus*, muitos estudos estão sendo realizados para melhorar tanto a produção nativa como a heteróloga (STEIGER *et al.*, 2017).

A via metabólica pela qual o ácido itacônico é produzido em *A. terreus* foi proposta ainda em 1957 (BENTLEY; THIESSEN, 1957) por meio de estudos com glicose marcada com C<sup>14</sup>. Sua síntese se inicia com um açúcar, como a glicose, e sua produção ocorre via ciclo do ácido cítrico. Para entrar neste, o piruvato, produto da quebra da glicose, necessita ser descarboxilado em acetil-CoA, cujo grupamento acetil é transferido para o oxaloacetato, formando o citrato. Este é então convertido em isocitrato pela enzima aconitase, em uma reação que possui um intermediário chamado de *cis*-aconitato. Este é o substrato da enzima *cis*-aconitato descarboxilase (CAD), que ao descarboxilar o *cis*-aconitato forma o produto ácido itacônico. Um desenho esquemático desta via está apresentado na Figura 7. Esta via foi confirmada por outros experimentos com substratos marcados com C<sup>13</sup> e C<sup>14</sup> em 1995 (BONNARME *et al.*, 1995).



**Figura 7. Via metabólica da produção de ácido itacônico em *A. terreus*.** MTT: transportador mitocondrial (*mitochondrial tricarboxylic transporter*); MFS: superfamília dos principais facilitadores (*major facilitator superfamily*); CAD: enzima *cis*-aconitato descarboxilase. Modificado de HUANG *et al.*, 2014.

Diversos estudos buscando a otimização da produção nativa de ácido itacônico por *A. terreus* foram realizados. Em um deles, uma versão truncada do gene *pfkA* (6-fosfofruto-1-quinase) de *Aspergillus niger* foi expressa em *A. terreus*, o que levou ao aumento da produtividade de ácido itacônico em 18% em relação à linhagem parental (TEVŽ; BENČINA; LEGIŠA, 2010). Além disso, um dos problemas relacionados à produção deste composto em *A. terreus* é a influência do suprimento de oxigênio, visto que uma pequena interrupção na

oxigenação diminui o rendimento do produto. Buscando aliviar esse efeito durante uma pequena interrupção, Lin *et al.* (2004) expressaram uma hemoglobulina neste fungo, o que levou a uma menor queda na produção de ácido itacônico quando a aeração foi interrompida por 20 min, tendo decaído 38% comparado com uma queda de 54% na linhagem que não expressava hemoglobulina. Mais recentemente, a produção de ácido itacônico atingiu 160 g L<sup>-1</sup> utilizando o fungo *A. terreus* em modo de fermentação submersa, titulação comparável com a produção industrial de ácido cítrico (KRULL *et al.*, 2017).

Apesar da via metabólica e da enzima envolvida na produção de ácido itacônico serem conhecidas, a sequência do gene codificador da CAD permaneceu desconhecida até 2008. Para obter esta sequência, Kanamasa *et al.* (2008) buscaram genes em bancos de dados que codificassem as sequências da região N-terminal da proteína CAD e de quatro regiões internas, já conhecidas. Dessa forma, os autores conseguiram identificar a sequência do gene *CADI* de *A. terreus*, que possui 1529 pb codificando para uma proteína de 490 resíduos de aminoácidos interrompida por um único íntron de 56 pb (KANAMASA *et al.*, 2008). A identificação desta sequência permitiu a expressão heteróloga deste gene, proporcionando o desenvolvimento de linhagens de outros micro-organismos produtores de ácido itacônico.

Um destes micro-organismos foi o fungo *A. niger*, que foi unicamente transformado com o gene codificador da enzima CAD de *A. terreus*, o que levou à produção de cerca de 0,7 g L<sup>-1</sup> de ácido itacônico (LI *et al.*, 2012). Outras linhagens em desenvolvimento para a produção de ácido itacônico de forma heteróloga foram baseadas na bactéria *E. coli*. O gene *CADI* de *A. terreus* foi clonado nesta bactéria pela primeira vez em um estudo que buscou identificar genes importantes para a biossíntese de ácido itacônico por meio de uma abordagem transcriptômica (LI *et al.*, 2011). Um dos transcritos encontrados codificava para a enzima CAD, sendo então este gene clonado em um vetor de expressão de *E. coli*. Após a transformação, células induzidas com IPTG foram capazes de produzir 83 mg L<sup>-1</sup> de ácido itacônico em meio complexo (LB suplementado com glicose) com crescimento durante a noite.

Buscando otimizar esta produção em *E. coli*, foi realizada a deleção dos genes *icd* (isocitrato desidrogenase) e *aceA* (isocitrato liase) (OKAMOTO *et al.*, 2014). A linhagem com o gene *icd* deletado foi capaz de produzir 346,3 mg L<sup>-1</sup> de ácido itacônico após 78 h de crescimento em meio LB suplementado com glicose. O amido também foi utilizado como fonte de carbono por uma linhagem de *E. coli* amilolítica e expressando o gene *CADI*

(OKAMOTO *et al.*, 2015), sendo esta capaz de produzir 150 mg L<sup>-1</sup> de ácido itacônico após 69 h de crescimento.

Além da expressão do gene *CADI* de *A. terreus*, também se buscou a expressão de outros genes para otimizar a produção de ácido itacônico em *E. coli*. Um estudo (VUORISTO *et al.*, 2015) mostrou que a expressão dos genes *gltA* (citrato sintase) e *acnA* (aconitase A) de *Corynebacterium glutamicum*, com a simultânea deleção dos genes *ldhA* (lactato desidrogenase) e *pta* (fosfato acetiltransferase), resultou na produção de 690 mg L<sup>-1</sup> de ácido itacônico em 72 h.

Mais recentemente, por meio de modelos em *software*, foi desenvolvida uma linhagem de *E. coli* deletada para os genes *aceA*, *sucCD* (succinil-CoA transferase), *pykA* (piruvato quinase II), *pykF* (piruvato quinase I) e *pta*, e expressando os genes *CADI* de *A. terreus* e *gltA* de *C. glutamicum* (HARDER; BETTENBROCK; KLAMT, 2016). Esta linhagem foi capaz de produzir 2,27 g L<sup>-1</sup> de ácido itacônico após 48 h. Outra estratégia utilizada juntamente com a deleção do gene *icd*, foi a superexpressão dos genes nativos de *E. coli* *acnB* (aconitase B), *gltA* e *ppc* (fosfoenolpiruvato carboxilase) com a concomitante expressão do gene *pyc* de *C. glutamicum* (CHANG *et al.*, 2017). A linhagem resultante foi capaz de produzir 18 g L<sup>-1</sup> de ácido itacônico a partir de glicose, 20 g L<sup>-1</sup> a partir de xilose e 22 g L<sup>-1</sup> a partir de glicerol como fontes únicas de carbono em meio TB (*Terrific Broth*), utilizando frascos aletados durante três dias de cultivo.

Outro organismo procarioto modificado para a produção de ácido itacônico é a bactéria *C. glutamicum*. O gene *CADI* de *A. terreus* foi expresso neste micro-organismo, sendo induzido por IPTG (OTTEN; BROCKER; BOTT, 2015). Após 72 h, 1,4 ± 0,3 mM de ácido itacônico foi produzido, sendo esta produção melhorada após fusionar a CAD com a proteína MalE (*maltose-binding protein*) de *E. coli*, resultando em 3,6 ± 0,8 mM de ácido itacônico. Outra modificação realizada neste estudo foi a diminuição da atividade da isocitrato desidrogenase ao trocar o códon de iniciação do gene *icd* por GTG ou TTG, o que levou à produção de até 59,8 ± 4,7 mM de ácido itacônico em condições limitantes de nitrogênio. Mostra-se assim o potencial de se utilizar um micro-organismo procarioto para a produção de ácido itacônico, sendo necessário realizar modificações genéticas adequadas para o desenvolvimento de uma linhagem eficiente.

Como mencionado, o ácido itacônico possui uma ampla variedade de aplicações industriais. Ele pode ser aplicado como um novo monômero em diversos produtos, nos quais ele confere características ao produto final que o fazem superior aos substitutos

convencionais. Produtos finais comuns da polimerização do ácido itacônico incluem o ácido poliitacônico e a borracha de butadieno estireno, sendo esta feita da polimerização de estireno, butadieno e ácido itacônico. Ademais, este pode substituir o ácido acrílico na produção de polímeros superabsorventes com propriedades melhoradas. Já o ácido poliitacônico pode substituir o tripolifosfato de sódio utilizado em detergentes. Além disso, o ácido itacônico é também utilizado na manufatura de tintas de emulsão, nas quais ele melhora a adesão da tinta. Ainda, quando 5% de ácido itacônico são adicionados a resinas acrílicas, esta adquire a habilidade de segurar tintas de impressão (EL-IMAM; CHENYU, 2014).

Demonstra-se assim que o ácido itacônico representa um importante químico para a indústria em diversas atividades, sendo fundamental a melhoria da sua produtividade para ser um composto economicamente competitivo. Além disso, sendo uma molécula passível de produção a partir de açúcares, a biomassa lignocelulósica pode ser utilizada como fonte de matéria-prima, tornando-o um composto de produção renovável.

### **1.5 Ácido xilônico**

Como mencionado, ácidos orgânicos são blocos de construção chaves na indústria química, possuindo uma ampla variedade de aplicações e mercado para a sua comercialização (YIN *et al.*, 2015). Em um relatório realizado pelo NREL (*National Renewable Energy Laboratory*), foram selecionados 30 potenciais blocos de construção que poderiam ser produzidos a partir de material lignocelulósico, dentre os quais estava o ácido xilônico (WERPY; PETERSEN, 2004).

O primeiro relato acerca da produção de ácido xilônico em micro-organismos ocorreu ainda em 1898 (BERTRAND, 1898), no qual o autor reportou a oxidação da xilose em um ácido monobásico pela bactéria descrita posteriormente como sendo *Acetobacter xylinum* (LOCKWOOD; NELSON, 1946). Já no século XX, a produção de ácido xilônico foi relatada em várias espécies fúngicas e bacterianas. Em 1946, Lockwood (LOCKWOOD; NELSON, 1946) descreveu a oxidação da xilose a ácido xilônico em várias bactérias do gênero *Pseudomonas*, sendo esta a primeira vez que a atividade da xilose desidrogenase foi reportada. Em 1961, a via de Weimberg de oxidação de xilose a  $\alpha$ -cetogluturato foi descrita pela primeira vez na bactéria *P. fragi* (WEIMBERG, 1961). Ainda na década de 1960, a produção de ácido xilônico foi reportada em *Pullularia pullulans* (atualmente, *Aureobasidium pulullans*) (KIESSLING; LINDBERG; MCKAY, 1962) e em *Pichia quercibus* (SUZUKI; ONISHI, 1967). Além disso, outras bactérias também foram descritas como produtoras de

ácido xilônico, como a *Micrococcus sp.* (OHSUGI; TOCHIKURA; OGATA, 1970) e *Enterobacter cloacae* (ISHIZAKI *et al.*, 1973).

O ácido xilônico é um ácido aldônico proveniente da oxidação do grupamento aldeído da xilose e possui uma variedade de aplicações. Nas indústrias farmacêutica e cosmética, este ácido orgânico pode ser utilizado como um aditivo em produtos anti-idade para melhorar a penetração deste na pele (GUPTA, 2009), como um agente antimicrobiano (PUJOS; JIJAKLI, 2014) e na absorção e retenção de vitamina C (MARKHAM, 1992). Ele também é precursor de 1,2,4-butanotriol (NIU; MOLEFE; FROST, 2003) e pode ser utilizado como dispersante em cimento (Chun *et al.*, 2006) assim como catalisador para reações orgânicas (MA *et al.*, 2016). De forma geral, o ácido xilônico é uma alternativa ao uso do ácido glicônico, tendo a vantagem de não competir com a indústria alimentícia para a sua produção (TOIVARI *et al.*, 2012a).

Na década de 1980, a produção de ácido xilônico começou a despertar interesse por sua similaridade com o ácido glicônico e a possibilidade de se utilizar a fração hemicelulósica da biomassa vegetal como substrato. Em 1986, (BUCHERT *et al.*, 1986) testaram 11 linhagens de micro-organismos para a produção de ácido xilônico, sendo 10 bactérias e uma levedura. Para *P. fragi* (ATCC 4973), o rendimento do ácido foi de 92%, com produtividade de 1,4 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Em 1988, este mesmo autor utilizou hidrolisado hemicelulósico para a produção de ácido xilônico, comparando as espécies *P. fragi* e *Gluconobacter oxydans* (BUCHERT; PULS; POUTANEN, 1988). Este último apresentou uma produtividade maior (2,5 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, contra 1,4 de *P. fragi*) em xilose pura, sendo utilizado para a produção em hidrolisado contendo 25 g L<sup>-1</sup> de xilose. Nestas condições, *G. oxydans* produziu 43% em relação ao máximo teórico de ácido xilônico, ilustrando os problemas de se utilizar hidrolisado devido à presença de inibidores.

Posteriormente, outros micro-organismos foram modificados para a produção heteróloga de ácido xilônico. O primeiro deles foi a levedura *S. cerevisiae*, cuja produtividade alcançada durante o bioprocessamento foi de 36 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (TOIVARI *et al.*, 2010) com a expressão do gene *xyd1* de *Trichoderma reesei*. Esta mesma levedura também foi modificada para expressar os genes *xylB* e *xylC* de *Caulobacter crescentus* (TOIVARI *et al.*, 2012b), sendo o gene *xylB* de *C. crescentus* o mais comumente utilizado para o desenvolvimento de linhagens recombinantes produtoras de ácido xilônico. O gene *xylC* codifica para a enzima xilonolactonase (XL). Neste último estudo, foi obtida uma produtividade volumétrica de 240 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> com a levedura *S. cerevisiae* expressando os dois genes. Outros micro-organismos

modificados para a produção de ácido xilônico incluem as leveduras *Kluyveromyces lactis* (NYGÅRD *et al.*, 2011) e *Pichia kudriavzevii* (TOIVARI *et al.*, 2013) e as bactérias *E. coli* (LIU *et al.*, 2012; CAO *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2019) e *C. glutamicum* (YIM *et al.*, 2017). A Tabela 1 apresenta estas linhagens modificadas com as produtividades e rendimentos obtidos na produção de ácido xilônico.

**Tabela 1.** Micro-organismos geneticamente modificados para a produção de ácido xilônico.

Micro-organismo	Genes expressos	Produtividade (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Rendimento (g <sub>AX</sub> /g <sub>X</sub> )	Referência
<i>S. cerevisiae</i>	<i>xyd1</i> ( <i>T. reesei</i> )	0,036	0,40	TOIVARI <i>et al.</i> , 2010
<i>K. lactis</i>	<i>xyd1</i> ( <i>T. reesei</i> )	0,160	0,60	NYGÅRD <i>et al.</i> , 2011
<i>S. cerevisiae</i>	<i>xylB</i> ( <i>C. crescentus</i> ) <i>xylC</i> ( <i>C. crescentus</i> )	0,230 0,240 com <i>xylC</i>	0,80	TOIVARI <i>et al.</i> , 2012b
<i>E. coli</i>	<i>xylB</i> ( <i>C. crescentus</i> )	1,090	0,98	LIU <i>et al.</i> , 2012
<i>P. kudriavzevii</i>	<i>xylB</i> ( <i>C. crescentus</i> )	1,400	1,00	TOIVARI <i>et al.</i> , 2013
<i>E. coli</i>	<i>xylB</i> + <i>xylC</i> ( <i>C. crescentus</i> )	1,800	0,88	CAO <i>et al.</i> , 2013
<i>C. glutamicum</i>	<i>xylB</i> + <i>xylC</i> ( <i>C. crescentus</i> ) <i>xylE</i> ( <i>E. coli</i> )	1,020	1,04	YIM <i>et al.</i> , 2017
<i>E. coli</i>	<i>xylB</i> + <i>xylC</i> ( <i>C. crescentus</i> )	1,800	1,09	ZHANG <i>et al.</i> , 2019

## 1.6 A bactéria *Zymomonas mobilis*

### 1.6.1 Características gerais e breve histórico

*Zymomonas mobilis* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bacilos com comprimento de 2 a 6 µm e largura de 1 a 1,4 µm que não é capaz de formar esporos; se móveis, possuem de 1 a 4 flagelos lofotríquios; anaeróbica facultativa, tolerando oxigênio; e

fermenta glicose e frutose a quantidades quase equimolares de etanol e CO<sub>2</sub> (SWINGS; DE LEY, 1977). Pertence à família *Sphingomonadaceae* (KOSAKO *et al.*, 2000) da classe Alphaproteobacteria.

Sua descoberta ocorreu no início do século XX, com sua primeira descrição datando de 1912. Nesta época havia uma demanda comercial por cidras doces ao invés da bebida seca, cujos fabricantes encontraram dificuldades na manufatura uma vez que as cidras doces desenvolviam o que foi chamado de doença da cidra (*cider sickness*) (SWINGS; DE LEY, 1977). Este fenômeno foi estudado extensivamente pela primeira vez por Barker e Hillier (BARKER; HILLIER, 1912), cujos primeiros sintomas observados eram a formação de espuma e abundante produção de gás. Posteriormente, a cidra se tornava turva até o material se depositar na base e nas paredes do recipiente. O micro-organismo contaminante mudava o aroma e o sabor da cidra, reduzindo sua doçura. Barker e Hillier foram capazes de isolar este micro-organismo, revelando ser uma bactéria anaeróbia facultativa em forma de bastonete com o comprimento aproximado de 2 µm e largura de 1 µm, sendo capaz de fermentar glicose a etanol e dióxido de carbono (BARKER; HILLIER, 1912). Este é o primeiro relato conhecido do gênero *Zymomonas*.

Embora a real descoberta deste novo gênero tenha sido de Barker e Hillier, eles não identificaram taxonomicamente o micro-organismo causador da doença da cidra. Sua classificação veio anos mais tarde quando Lindner descobriu, em 1924, a bactéria responsável pela fermentação da seiva de agave (*Agave americana*) na produção de pulque no México. Ele a descreveu como sendo capaz de fermentar sacarose, frutose e glicose a etanol, dióxido de carbono e um pouco de ácido láctico, sendo maltose e lactose não fermentáveis, chamando-a de *Thermobacterium mobile*. Em 1931, ela foi renomeada para *Pseudomonas linderi* por Kluyver e Hoppenbrouwers e mais uma vez para *Zymomonas mobile*, em 1936, por Kluyver e van Neil (CARR; PASSMORE, 1971; SWINGS; DE LEY, 1977).

Em 1937, Shimwell (SHIMWELL, 1937) descreveu um novo tipo de doença em cerveja, isolando o micro-organismo causador e classificando-o como *Achromobacter anaerobium*, sendo na época, a pior doença de cerveja causada por bactéria já descrita. Em 1950, este mesmo autor (SHIMWELL, 1950), insatisfeito com sua prévia classificação deste micro-organismo, propôs a criação de um novo gênero, chamando-o agora de *Saccharomonas anaerobia*. Este autor ainda propôs a reclassificação do micro-organismo chamado de *Pseudomonas linderi* para *Saccharomonas linderi*.

Millis (MILLIS, 1956) estudou extensivamente o micro-organismo causador da doença da cidra, comparando duas linhagens deste com a *Saccharomonas anaerobia* (*Achromobacter anaerobium*) e com a *Zymomonas mobile* (*Pseudomonas linderi*, *Saccharomonas linderi*). A autora concluiu que todos os três organismos são intimamente relacionados, devendo pertencer ao mesmo gênero, propondo que este deveria ser *Zymomonas*, que possuiria duas espécies: *Z. mobilis* (isolado de Lindner) e *Z. anaerobia* (isolado de Shimwell e da doença da cidra, sendo esta última a subespécie *Z. anaerobia* var. *pomaceae*).

Uma das principais justificativas para a separação entre as duas espécies, *Z. mobilis* e *Z. anaerobia*, era a capacidade da primeira metabolizar também sacarose, enquanto a segunda não era capaz. Porém, em um estudo realizado com cervejas (DADDS; MARTIN; CARR, 1973), no qual os autores isolaram linhagens de *Z. mobilis* e *Z. anaerobia*, foi possível a indução do uso de sacarose por *Z. anaerobia*, gerando dúvidas se realmente haveria uma distinção entre as duas espécies. Assim, foi realizado um estudo comparativo (DE LEY; SWINGS, 1976) de 138 características fenotípicas de 38 linhagens de *Zymomonas* isoladas de diversas origens. Baseados nestas características, os autores concluíram que *Z. anaerobia* não era necessária como uma espécie separada. Dessa forma, eles propuseram somente uma espécie com duas subespécies: 1) *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* (sinônimos: *Thermobacterium mobile*, *Pseudomonas linderi*, *Saccharomonas linderi*, *Zymomonas mobile*, *Achromobacterium anaerobium*, *Saccharomonas anaerobia*, *Zymomonas anaerobia* var. *anaerobia*); e 2) *Zymomonas mobilis* subsp. *pomaceae* (sinônimos: micro-organismo da doença da cidra de Barker e Hillier (1912) e *Zymomonas anaerobia* var. *pomaceae*).

Mais recentemente, linhagens de *Z. mobilis* foram isoladas de cidras francesas com sintomas da doença da cidra (COTON *et al.*, 2006). O alinhamento das sequências de regiões espaçadoras intergênicas entre os genes de rRNA 16S e 23S de *Z. mobilis* subsp. *mobilis*, *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* e dos isolados franceses mostrou a presença de três grupos distintos, correspondentes às duas subespécies já conhecidas e mais um para as linhagens obtidas da cidra francesa. Este resultado, juntamente com outras características fenotípicas, levou os autores a proporem uma nova subespécie, a *Zymomonas mobilis* subsp. *francensis*. Dessa forma, atualmente, *Z. mobilis* é a única espécie do gênero *Zymomonas*, sendo conhecidas as três subespécies citadas.

Além das fontes mencionadas, linhagens de *Z. mobilis* foram isoladas principalmente de seivas de plantas ricas em carboidratos em habitats tropicais e subtropicais, locais onde

eram utilizadas para a fermentação destas seivas. Exemplos incluem seiva de *Arenga pinnata* (uma palmácea) na Indonésia, seiva de plantas dos gêneros *Elaeis* e *Raphia* no Zaire (atualmente República Democrática do Congo) e na Nigéria e ainda em caldo de cana-de-açúcar no nordeste brasileiro. Na Europa, *Z. mobilis* foi encontrada como contaminante de cidras e cervejas, como mencionado (SWINGS; DE LEY, 1977). Assim, foram isoladas linhagens como a ZM1 (ATCC10988) e a ZM6 (ATCC 29191), as quais foram amplamente empregadas em estudos acerca da biologia básica de *Z. mobilis*, na caracterização de genes e proteínas e em estudos sobre seu metabolismo e transporte. A ZM6 também é bastante utilizada na produção nativa de ácidos aldônicos como os ácidos glicônico e lactobiônico (MALVESSI *et al.*, 2013) e também de sorbitol (BARROS *et al.*, 2006), sendo uma linhagem superior para a produção de levana (DESINIOTIS *et al.*, 2012).

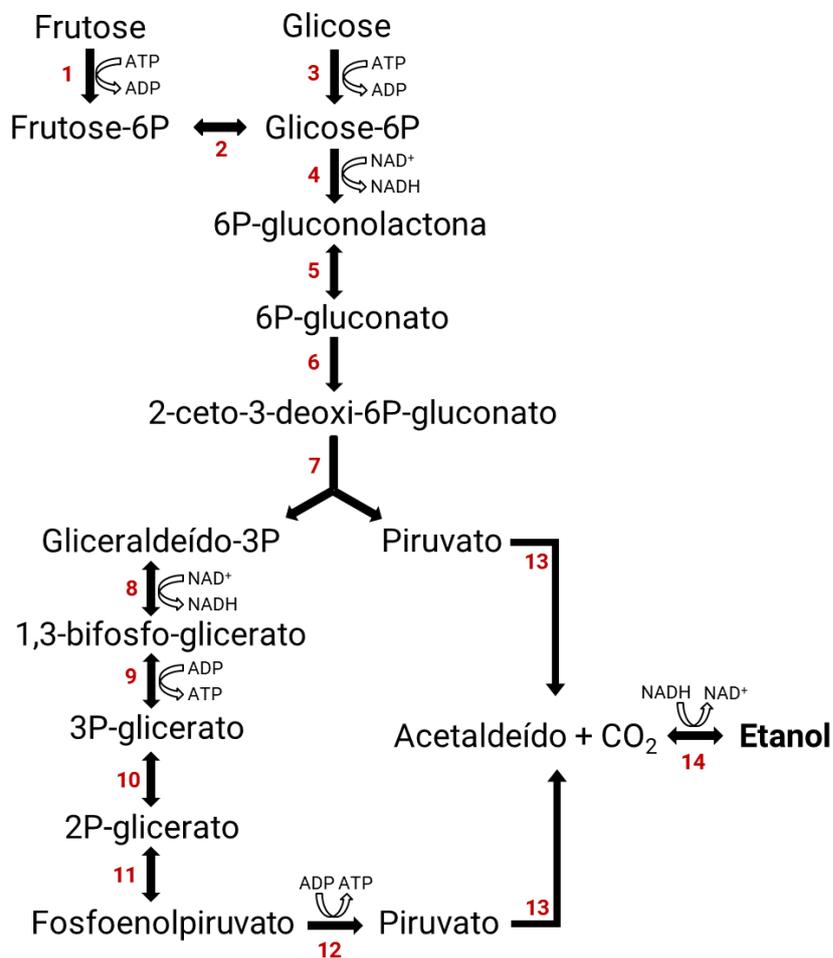
De particular interesse, está a linhagem CP4 (NRRL B-14023), isolada em 1970 por Gonçalves de Lima em Recife a partir de caldo de cana-de-açúcar fermentado. Esta linhagem foi distribuída mundialmente para diversos laboratórios (FALCÃO DE MORAIS *et al.*, 1993), sendo bastante utilizada em estudos de produção de etanol e para expandir a utilização de substratos por essa bactéria, como o uso da xilose (ZHANG *et al.*, 1995) e de manose (WEISSER; KRÄMER; SPRENGER, 1996).

Após a distribuição da linhagem CP4, notou-se que havia um equívoco relacionado à nomenclatura dessas culturas. A comparação de cinco culturas de laboratórios diferentes, porém recebidas da mesma fonte, mostrou que quatro das culturas de CP4 possuíam perfil plasmidial e padrões de digestão idênticos. Contudo, descobriu-se que uma delas diferia das demais, sendo esta denominada ZM4 (ATCC 31821) (YABLONSKY *et al.*, 1988). A linhagem ZM4 demonstrou maiores taxas específicas de crescimento e de produção de etanol, assim como maior tolerância ao etanol quando comparada com a linhagem ZM1 (ATCC 10988) (LEE *et al.*, 1980), sendo hoje amplamente utilizada em estudos de produção de etanol e engenharia metabólica.

### **1.6.2 Metabolismo central de *Z. mobilis***

Atualmente, *Z. mobilis* tem demonstrado potencial para a produção industrial de etanol e de outros produtos de alto valor agregado. Devido ao seu alto rendimento de etanol, esta bactéria chamou a atenção desde cedo dos cientistas, que buscaram elucidar a formação deste álcool em *Z. mobilis*, concluindo que esta ocorria por uma via distinta da via glicolítica clássica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (GIBBS; DEMOSS, 1951). Esta via distinta é a via

Entner-Doudoroff (ED) (ENTNER; DOUDOROFF, 1952) (Figura 8), na qual uma molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de piruvato por meio da formação de 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato como intermediário chave. O funcionamento desta via em *Z. mobilis* foi confirmado tanto por estudos com  $C^{14}$  (GIBBS; DEMOSS, 1954) quanto por evidências enzimáticas (DAWES; RIBBONS; LARGE, 1966), sendo demonstradas as atividades das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase, etanol desidrogenase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexoquinase, glucoquinase e piruvato descarboxilase. A glicose pode ser metabolizada somente pela via ED em *Z. mobilis*, uma vez que não há gene codificador para a enzima 6-fosfofrutoquinase em seu genoma (SEO *et al.*, 2005).



**Figura 8. Via Entner-Doudoroff em *Z. mobilis*.** 1: frutoquinase; 2: glicose-6P isomerase; 3: glucoquinase; 4: glicose-6P desidrogenase; 5: gluconolactona hidrolase; 6: fosfogluconato desidratase; 7: 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolase; 8: gliceraldeído-3P desidrogenase; 9: fosfoglicerato quinase; 10: fosfoglicerato mutase; 11: enolase; 12: piruvato quinase; 13: piruvato descarboxilase; 14: álcool desidrogenase.

A via ED foi descoberta em 1952 em *Pseudomonas saccharophila* (ENTNER; DOUDOROFF, 1952), sendo considerada por algum tempo uma via restrita a algumas bactérias Gram-negativas. Contudo, hoje já se sabe que ela está presente em diversos grupos de organismos, incluindo bactérias, arqueias e eucariotos (CONWAY, 1992). Ela é uma alternativa à via glicolítica EMP, cujas reações envolvem a clivagem de 2-ceto-3-deoxi-6-fosfato-gluconato para gerar gliceraldeído-3-fosfato e piruvato ao invés da clivagem de frutose-1,6-bifosfato em gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato. As reações que envolvem a conversão de gliceraldeído-3-fosfato a piruvato são comuns às duas vias. Devido à formação de apenas uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato, a via ED gera apenas 1 mol de ATP por mol de glicose ao invés de 2 mols de ATP gerados pela via EMP, sendo possivelmente uma via glicolítica menos eficiente e assim, mais primitiva evolutivamente (CONWAY, 1992).

Embora o metabolismo central de *Z. mobilis* seja composto por uma via energeticamente menos eficiente do que a via EMP, esta bactéria é capaz de manter um rápido fluxo de carbono, facilitado pelo alto nível de expressão das enzimas da via glicolítica, que compõem cerca de 50% do total de proteínas solúveis da célula (CONWAY, 1992). De fato, *Z. mobilis* possui taxas específicas de absorção de açúcares e de produção de etanol de três a quatro vezes mais rápidas do que de leveduras, levando a um alto rendimento de etanol e baixo rendimento celular (ROGERS *et al.*, 1982). Somente de 2 a 3% da glicose metabolizada é assimilada na forma de biomassa (BELAÏCH; SENEZ, 1965). Esta característica de baixo crescimento celular de *Z. mobilis* a torna uma excelente candidata para a síntese de produtos de interesse industrial, uma vez que não há muito desvio de carbono para a produção de células.

O alto rendimento de etanol e baixo crescimento celular são explicados pelo crescimento desacoplado apresentado por *Z. mobilis*, fenômeno no qual há um rápido catabolismo não relacionado com a síntese de biomassa celular (BELAÏCH; SENEZ, 1965). Em combinação, o baixo rendimento de ATP da via ED juntamente com a alta expressão das enzimas fermentativas ajudam a explicar a alta taxa metabólica de *Z. mobilis*, de forma que esta produza ATP em uma taxa específica consideravelmente maior do que a encontrada em leveduras (KALNENIEKS, 2006). O fato desta alta taxa de síntese de ATP não estar relacionada com a formação de biomassa juntamente com a sua alta taxa catabólica apontam para a presença de reações que utilizam ATP desacopladas do crescimento celular, sendo que a candidata mais provável para reciclar o excesso de ATP é a  $F_0F_1$ -ATPase (KALNENIEKS,

2006), cuja atividade está presente tanto em condições aeróbicas, competindo com a biossíntese de ATP, quanto em condições anaeróbicas (RUTKIS *et al.*, 2014). Assim, sua atividade pode ser parcialmente responsável pelo crescimento desacoplado, uma vez que a rápida produção de ADP estimularia a glicólise e assim a produção de etanol (REYES; SCOPES, 1991). As reações de consumo de ATP exercem controle sobre o fluxo da via ED e a taxa de consumo de glicose. Ao fornecer ADP para a glicólise, a ATPase dependente de H<sup>+</sup> contribui para o alto fluxo glicolítico da via ED (RUTKIS *et al.*, 2014).

Contudo, a atividade desta ATPase não dissipa a energia, mas sim a converte em uma força próton-motiva ( $\Delta p$ ) transmembrana. Já foi demonstrado que a quebra de ATP por uma F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase está acoplada a um ciclo fútil de prótons na bactéria *Streptococcus bovis*, outro exemplo de crescimento desacoplado (COOK; RUSSELL, 1994). Este princípio também poderia estar presente em *Z. mobilis*, porém estudos ainda são necessários para esclarecer a questão do gradiente de prótons nesta bactéria (KALNENIEKS, 2006).

Uma hipótese pode estar relacionada aos produtos do seu metabolismo, sendo o etanol e o dióxido de carbono os mais abundantes metabólitos. Embora o etanol acumulado durante a fermentação por *Z. mobilis* cause um vazamento de íons e pequenas moléculas pela membrana, incluindo prótons, ele não pode ser a causa do crescimento desacoplado, uma vez que a dissipação de energia também ocorre na ausência de etanol no meio (KALNENIEKS, 2006). A maior parte do CO<sub>2</sub> produzido deixa a célula por difusão passiva, mas parte dele pode ficar no citoplasma sofrendo hidratação catalisada pela anidrase carbônica com a formação de ácido carbônico. Este por sua vez é dissociado no ânion bicarbonato e em um próton. A exportação deste ânion bicarbonato seria uma forma eficiente de reduzir o gradiente de pH transmembrana, uma vez que um próton ficaria dentro da célula (KALNENIEKS, 2006). Este fenômeno pode estar relacionado ao crescimento desacoplado, e embora seja suportado pela presença de anidrase carbônica no genoma de *Z. mobilis* (SEO *et al.*, 2005), também necessita de mais estudos para ser confirmado.

Outra característica dessa bactéria é seu incompleto ciclo do ácido tricarbóxico (TCA), que funciona como duas ramificações (BRINGER-MEYER; SAHM, 1989), o que foi confirmado por estudos com <sup>13</sup>C (DE GRAAF *et al.*, 1999). De fato, não há em seu genoma genes para as enzimas  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e malato desidrogenase (SEO *et al.*, 2005), sendo que o TCA em *Z. mobilis* deve funcionar apenas para prover precursores para as reações de biossíntese (KALNENIEKS, 2006). Ainda, a via de pentoses fosfato também é incompleta uma vez que não há atividade de transaldolase (FELDMANN; SAHM;

SPRENGER, 1992), sendo que a maioria dos genes desta via não estão presentes no genoma (SEO *et al.*, 2005). Seu incompleto TCA traz o potencial do redirecionamento do seu metabolismo, por meio de deleção de genes, para produtos de alto valor agregado ao invés de produzir os produtos finais nativos de *Z. mobilis* como lactato e etanol (ROGERS *et al.*, 2007).

### 1.6.3 Cadeia respiratória

Sabe-se que *Z. mobilis* apresenta uma cadeia respiratória constitutiva (BELAÏCH; SENEZ, 1965; STROHDEICHER *et al.*, 1990), embora haja controvérsias acerca do metabolismo aeróbico deste micro-organismo. O fato de que a aeração do meio pode levar a um menor crescimento do que em anaerobiose juntamente com sua incapacidade de crescer em substratos não fermentáveis, seria um argumento de que *Z. mobilis* não apresenta uma fosforilação oxidativa funcional (KALNENIEKS *et al.*, 1993).

Contudo, em estudos com células famintas, a adição de etanol em culturas aeradas leva a produção de ATP. Ainda, vesículas de membrana apresentam atividade de fosforilação oxidativa, concluindo que *Z. mobilis* possui capacidade de gerar energia de forma aeróbica, havendo a hipótese de que o baixo crescimento e a aparente falta de fosforilação oxidativa em *Z. mobilis* em culturas aeradas pode ser devido ao acúmulo de acetaldeído (KALNENIEKS *et al.*, 1993). Este é intermediário da produção de etanol por *Z. mobilis* (Figura 8), e sua conversão a partir de etanol gera NADH, o qual pode ser utilizado pela cadeia respiratória. O acetaldeído é um composto inibitório para crescimento desta bactéria em concentrações tão baixas quanto 0,05% (p/p) (WECKER; ZALL, 1987), o que explicaria o baixo crescimento em condições de aerobiose. Além disso, a aparente falta de fosforilação oxidativa em culturas aeradas pode ser causada pela atividade hidrolítica de ATP pela ATPase dependente de H<sup>+</sup> (RUTKIS *et al.*, 2014), como mencionado.

*Z. mobilis* possui uma cadeia respiratória ramificada (KALNENIEKS *et al.*, 1998), consistindo de uma NADH desidrogenase tipo II, uma coenzima Q10 e uma terminal oxidase citocromo *bd* como os maiores carreadores de elétrons (KALNENIEKS; BALODITE; RUTKIS, 2019). Atividades enzimáticas de glicose desidrogenase e lactato desidrogenase também são encontradas em preparados de membrana (SOOTSUWAN *et al.*, 2008), que doam elétrons para a Q10, sendo que ainda há outros constituintes não identificados. Além disso, esta bactéria apresenta maiores taxas de respiração e de consumo de O<sub>2</sub> que outros micro-organismos como *E. coli* e *S. cerevisiae*, sendo que a composição da sua cadeia

respiratória implicaria uma alta taxa de conversão de energia através do transporte de elétrons (KALNENIEKS, 2006). Estes fatos resultariam em maior rendimento celular em culturas aeróbicas do que anaeróbicas, porém sua produção de energia, como visto, não está voltada para o crescimento, sendo que este não é a única função na qual a cadeia respiratória de uma bactéria pode estar envolvida (POOLE; COOK, 2000). Assim, embora tenha uma alta capacidade respiratória, *Z. mobilis* não utiliza sua cadeia respiratória para fornecer energia para crescimento aeróbico da maneira típica de micro-organismos aeróbicos e anaeróbicos facultativos (STRAZDINA *et al.*, 2012).

Dessa forma, buscou-se elucidar qual seria o papel fisiológico da cadeia respiratória em *Z. mobilis*. É possível que sua rápida, embora energeticamente ineficiente cadeia respiratória, ajude a prevenir o estresse oxidativo em culturas com crescimento aeróbico (STRAZDINA *et al.*, 2012). Também já foi relatado que a cadeia respiratória de *Z. mobilis* tem a função de manter uma baixa taxa NADH/NAD<sup>+</sup> quando as células são expostas a estresses ambientais como salinidade (HAYASHI *et al.*, 2015). Uma vez que a via ED requer muito NAD<sup>+</sup> nas reações catalisadas pelas enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, a manutenção de uma baixa taxa NADH/NAD<sup>+</sup> é crítica para o crescimento e produção de etanol em *Z. mobilis*. A NADH desidrogenase da cadeia respiratória diminui a taxa NADH/NAD<sup>+</sup> pela oxidação de NADH acumulado causado pelo estresse salino (HAYASHI *et al.*, 2015).

Outros autores também discutem a interação da respiração com a via ED na diminuição da taxa NADH/NAD<sup>+</sup> intracelular, de forma que a remoção de equivalentes redutores pela cadeia respiratória de *Z. mobilis* aceleraria o catabolismo fermentativo, aumentando a taxa de consumo de glicose (RUTKIS *et al.*, 2016). Esta aceleração do fluxo na via ED é uma nova faceta ao papel fisiológico da respiração em *Z. mobilis* (RUTKIS *et al.*, 2016). Assim, apesar de *Z. mobilis* não utilizar a respiração para crescer, a presença de uma cadeia respiratória ativa implica que a respiração é vantajosa em algum momento do seu ciclo de vida, podendo este ser quando células famintas têm acesso a um pouco de glicose e a velocidade do influxo da glicose determina sua chance de sobrevivência (RUTKIS *et al.*, 2016).

Além disso, sabe-se que a formação de flocos por micro-organismos auxilia na sua resistência a moléculas danosas no meio. Foi visto que a floculação em *Z. mobilis* é requerida para a viabilidade celular em meio mínimo aerado, sugerindo uma proteção contra algum aspecto do metabolismo aeróbico. A enzima NADH desidrogenase é importante para a

sobrevivência em meio mínimo aeróbico, relevando um papel fisiológico para esta enzima. Assim, a respiração aeróbica seria importante para a sobrevivência em meios naturais que são deficientes de fatores protetivos como os encontrados em meios complexos de laboratório (JONES-BURRAGE; KREMER; MCKINLAY, 2019).

Ainda há outras hipóteses para a função da fosforilação oxidativa em *Z. mobilis*. Uma delas relata que a fosforilação oxidativa pode ser uma fonte de energia para a fase estacionária do crescimento, quando o açúcar presente no meio acabou e há acúmulo de etanol. A lenta oxidação deste metabólito pode ser parte do ciclo natural de *Z. mobilis*. Ademais, a produção de acetaldeído para inibir o crescimento de outros micro-organismos também é uma ideia, assim como a produção de etanol o é em condições anaeróbicas. Além disso, a presença de fosforilação oxidativa em *Z. mobilis* pode ser um resquício evolutivo. A cadeia respiratória pode também ter uma função protetiva, importante para a fixação de nitrogênio. (KALNENIEKS, 2006). De fato, mais recentemente descobriu-se que *Z. mobilis* é capaz de fixar N<sub>2</sub>, sendo que o crescimento na presença deste aumentou a produtividade específica de etanol. O carbono e os elétrons necessários para o processo de fixação de nitrogênio foram desviados da biossíntese, levando à diminuição do rendimento de biomassa. Os autores discutem que a limitação de nitrogênio imposta pela fixação de N<sub>2</sub> leva a um desacoplamento ainda maior entre a glicólise e as reações de biossíntese (KREMER *et al.*, 2015).

Além disso, haveria uma coordenação entre a respiração e produção de etanol em *Z. mobilis*. Em condições aeróbicas, parte do NADH produzido pela via ED é oxidado pela cadeia respiratória, competindo com a enzima álcool desidrogenase (ADH) por este cofator, o que leva a um aumento de produção de acetaldeído e diminuição na produção de etanol nestas condições (KALNENIEKS, 2006). *Z. mobilis* possui duas enzimas ADH, ADH I, que se liga a zinco, e ADH II, que se liga a ferro (NEALE *et al.*, 1986). Se ambas as ADH catalisassem simultaneamente a síntese de etanol, a atividade da cadeia respiratória seria ineficiente para competir com a produção de etanol, uma vez que a velocidade máxima das ADH são maiores e apresentam K<sub>m</sub> menores para NADH do que a NADH oxidase da cadeia respiratória. No entanto, as isoenzimas operam em direções contrárias, uma vez que a ADH I é responsável por metade da sua atividade fisiológica (redução do acetaldeído) e ADH II conta por 90% da atividade de oxidar o etanol (NEALE *et al.*, 1986), hipótese suportada pela incapacidade de células com o gene *adhB* (ADH II) deletado oxidar etanol (KALNENIEKS *et al.*, 2006). Contudo, são necessários mais estudos para elucidar a coordenação entre respiração e produção de etanol em *Z. mobilis* (KALNENIEKS, 2006).

#### 1.6.4 Genoma de *Z. mobilis*

ZM4 foi a primeira linhagem de *Z. mobilis* a ter seu genoma sequenciado (SEO *et al.*, 2005), tendo sua anotação atualizada nos anos 2009 (YANG *et al.*, 2009a) e 2018 (YANG *et al.*, 2018). Neste período, outras linhagens selvagens também tiveram seus genomas sequenciados, como a NCIMB 11163 (KOUVELIS *et al.*, 2009), a ATCC 10988 (ZM1) (PAPPAS *et al.*, 2011), a ATCC 29192 (pertencente à subespécie *Z. mobilis* subsp. *pomaceae*) (KOUVELIS *et al.*, 2011), a ATCC 29191 (ZM6) (DESINIOTIS *et al.*, 2012), a CP4 (KOUVELIS *et al.*, 2014) e a NRRL B-1960 (CHACON-VARGAS *et al.*, 2017). As sequências genômicas de linhagens derivadas ou recombinantes também foram publicadas, como a da linhagem NRRL B-12526, proveniente da ZM1, (CHEN *et al.*, 2018) e as linhagens capazes de utilizar xilose 8b e 2032 (YANG *et al.*, 2018), derivadas da ZM4.

O pangenoma de *Z. mobilis*, que compreende o conjunto de genes de todas as linhagens de uma espécie, possui 1945 genes, incluindo 1428 genes essenciais e 517 genes acessórios, dentre estes 507 genes dispensáveis e 10 genes únicos de alguma linhagem. Os genes essenciais estão relacionados ao metabolismo de carboidratos, replicação, transcrição e tradução (CHEN *et al.*, 2018). Ainda, a análise comparativa de oito linhagens (ZM4, CP4, ZM1, NRRL B-12526, ZM6, NRRL B-1960, NCIMB 11163 e ATCC 29192) revelou que elas compartilham um esqueleto cromossômico conservado, sendo que ZM4, NRRL-12526, CP4, NCIMB 1163 e NRRL B-1960 possuem 98% de identidade em toda sequência genômica. Plasmídeos e repetições CRISPR muito similares foram detectadas nessas linhagens (CHEN *et al.*, 2018).

A anotação da linhagem ZM4 mais recente relata que esta possui um genoma de 2,059 Mb, que é 2392 pb maior que a anotação anterior. Esta inserção resultou na adição de duas ORFs ao genoma desta linhagem. Ainda, ZM4 possui quatro plasmídeos que estão em baixo número de cópias (~1 cópia por célula), mas que podem sofrer um pequeno aumento a depender das condições de cultivo. Seus tamanhos variam de 32 kb a 39 kb e contêm um total de 150 genes relacionados com sistemas de restrição, genes de fagos, sistemas de toxina-antitoxina e transportadores associados a membrana, incluindo bombas de efluxo. Estas últimas podem desempenhar algum papel na tolerância a inibidores presentes em hidrolisados de biomassa lignocelulósica (YANG *et al.*, 2018).

### 1.6.5 Tolerância de *Z. mobilis* a inibidores em hidrolisados lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica representa uma relevante fonte de matéria prima para a manufatura de produtos de alto valor agregado de forma renovável. Contudo, sua utilização envolve uma etapa de pré-tratamento necessário devido à recalcitrância intrínseca deste material. Por meio dele, a recalcitrância do material lignocelulósico é rompida, resultando na quebra da lignina, degradação da hemicelulose e redução da polimerização e cristalinidade da celulose (BARUAH *et al.*, 2018). Muitos tipos de pré-tratamento foram desenvolvidos, podendo ser eles físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos, sendo que a utilização de um ou de outro depende do tipo de biomassa lignocelulósica empregada, uma vez que a composição de lignina, celulose e hemicelulose varia de uma espécie para outra. A desvantagem da utilização de pré-tratamentos é a geração de compostos inibitórios como furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácidos fenólicos e aldeídos. (BARUAH *et al.*, 2018). Assim, embora o pré-tratamento seja necessário para tornar os carboidratos mais disponíveis para hidrólise enzimática e fermentação, o hidrolisado resultante contém substâncias inibitórias, apresentando efeitos negativos na função da membrana celular, crescimento e glicólise dos micro-organismos. Devido a estes efeitos inibitórios na produtividade e na formação do produto final, os inibidores podem ser um fator limitante na viabilidade da conversão da biomassa em produtos de alto valor agregado (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004).

Os produtos formados pelo pré-tratamento dependem tanto da biomassa quanto das condições do pré-tratamento, como temperatura, tempo, pressão, pH, condições redox e adição de catalisadores. Produtos da degradação de açúcares como furfural (proveniente das pentoses) e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF - proveniente das hexoses) são formados em altas concentrações durante condições ácidas severas de pré-tratamento. Além disso, o ácido acético é ubíquo em hidrolisados hemicelulósicos. Ácidos hidroxicarboxílicos como ácido glicólico e láctico são produtos de degradação comuns em condições alcalinas. O ácido fórmico é um produto proveniente da degradação dos carboidratos e lignina, enquanto que o ácido levulínico é formado pela degradação do 5-HMF. Compostos fenólicos são formados pela solubilização e clivagem hidrolítica ou oxidativa da lignina, e incluem o 4-hidroxibenzaldeído, o ácido 4-hidroxibenzoico, a vanilina, o álcool dihidroxiconiferílico, o aldeído coniferílico, o seringaldeído e o ácido serínico (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004).

Dessa forma, a tolerância aos inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos é um relevante fenótipo a ser considerado ao utilizar esta matéria prima na fermentação

microbiana. Neste sentido, linhagens mais tolerantes derivadas da ZM4 já foram desenvolvidas. Por meio de mutagênese, a ZM4 foi alterada de forma a ser mais tolerante ao acetato, dando origem à linhagem Ac<sup>R</sup> (JOACHIMSTHAL *et al.*, 1998). Adaptação em meio contendo ácido acético também foi utilizada para a geração de linhagens tolerantes, como é o caso da ZM6014 (CHEN *et al.*, 2012). Por meio desta mesma estratégia, outras linhagens foram isoladas, a ZMA7-2 e ZMF3-3, tolerantes a ácido acético e furfural, respectivamente (SHUI *et al.*, 2015). Utilizando mutagênese e *genome shuffling*, também foram obtidas as linhagens 532 e 533, as quais são mais resistentes a ácido acético e furfural (WANG *et al.*, 2019).

Por meio de abordagens transcriptômicas, é possível analisar o perfil de expressão sob determinadas condições de estresse, sendo estes dados valiosos para o entendimento dos mecanismos moleculares relacionados à tolerância em determinada condição e para a engenharia metabólica visando ao desenvolvimento de linhagens tolerantes. Neste sentido, alguns estudos buscando investigar o transcriptoma de *Z. mobilis* na presença de inibidores presentes em hidrolisado de biomassa lignocelulósica, como furfural (HE *et al.*, 2012) e aldeídos fenólicos (YI *et al.*, 2015) foram realizados, sendo encontrados diversos genes com a expressão alterada. Em geral, são encontrados “*up-regulados*” genes codificadores de redutases, possivelmente responsáveis pela conversão destes inibidores em compostos menos inibitórios, e genes codificadores de transportadores, responsáveis pelo o efluxo de substâncias tóxicas. Estes genes podem ser alvo para a engenharia metabólica de *Z. mobilis* objetivando a construção de linhagens mais tolerantes aos inibidores presentes em hidrolisado de biomassa lignocelulósica.

### **1.6.6 Aplicações biotecnológicas de *Z. mobilis***

Conforme mencionado, *Z. mobilis* demonstra potencial para a sua aplicação como plataforma para a produção de etanol e de outros produtos de alto valor agregado, apresentando vantagens como não necessitar da adição controlada de oxigênio para manter a viabilidade celular; alta tolerância ao etanol, podendo chegar a 16% (v/v); seu pequeno genoma, o que facilita sua manipulação genética, sendo que linhagens resistentes aos compostos inibitórios encontrados em hidrolisados derivados de biomassa lignocelulósica já foram isolados a partir deste material (ROGERS *et al.*, 2007), podendo este ser utilizado como fonte de carbono. Além disso, como discutido, linhagens ainda mais resistentes já foram desenvolvidas, demonstrando a possibilidade de utilizar este tipo de material por *Z. mobilis*.

Apesar destas vantagens, sua utilização ainda é restrita pelo fato de ter uma limitada utilização de substratos, uma vez que *Z. mobilis* só é capaz de utilizar as hexoses glicose, frutose e sacarose (ROGERS *et al.*, 2007), sendo que a capacidade de metabolizar pentoses é de particular importância na utilização de biomassa lignocelulósica, uma vez que a degradação da hemicelulose libera estes açúcares. Assim, linhagens recombinantes já foram desenvolvidas para aumentar a variedade de substratos utilizados. Para o desenvolvimento de uma linhagem capaz de fermentar xilose, ZHANG *et al.* (1995) expressou os genes de *E. coli* *xylA* (xilose isomerase), *xylB* (xiluluquinase), *tktA* (transcetolase) e *talB* (transaldolase) em *Z. mobilis*, tornando esta capaz de crescer em xilose como única fonte de carbono e de produzir etanol a partir desta. Em uma mistura de glicose e xilose, ambos os açúcares foram fermentados, sendo um marco no desenvolvimento de um bioprocessos que envolve a cofermentação mista de açúcares. Além disso, uma linhagem de *Z. mobilis* capaz de fermentar arabinose foi também desenvolvida (DEANDA *et al.*, 1996), sendo a linhagem recombinante capaz de produzir etanol a partir de arabinose com rendimento de 98% do máximo teórico relativo à quantidade de açúcar consumido. Anos após estes trabalhos pioneiros, a estratégia de adaptação metabólica foi utilizada para melhorar a fermentação de xilose em linhagens modificadas. A linhagem adaptada foi capaz de fermentar mais rapidamente a xilose, tendo uma menor formação de xilitol, uma maior tolerância a este composto e uma maior atividade da xilose isomerase (AGRAWAL; MAO; CHEN, 2011).

O desenvolvimento de linhagens para a utilização de celulose por *Z. mobilis* também foi almejado. Endoglicanases de *Cellulomonas uda* (MISAWA; OKAMOTO; NAKAMURA, 1988), *Pseudomonas fluorescens* (LEJEUNE; EVELEIGH; COLSON, 1988), *Bacillus subtilis* (YOON; PACK, 1988) e *Erwinia chrysanthemi* (BRESTIC-GOACHET *et al.*, 1989) foram expressas com sucesso em *Z. mobilis*, embora tenham atingido uma baixa atividade. Posteriormente, o gene da  $\beta$ -glicosidase de *Ruminococcus albus* (YANASE; NOZAKI; OKAMOTO, 2005) e de *Bacillus polymyxa* (LUO; BAO, 2015) também foram expressos, sendo as linhagens recombinantes capazes de utilizar celobiose. Outras duas endoglicanases de *Acidothermus cellulolyticus* (LINGER; ADNEY; DARZINS, 2010) e *Enterobacter cloacae* (VASAN *et al.*, 2011) também foram expressas, sendo a segunda capaz de produzir etanol a partir de CMC (carboximetilcelulose). Em estudo mais recente, uma glicosil hidrolase com atividade de  $\beta$ -glicosidase de *C. crescentus* foi expressa em *Z. mobilis*, e após adaptação em celobiose, a linhagem recombinante foi capaz de converter 50% da celobiose em glicose em 24 h, sendo esta utilizada para crescimento e produção de etanol

(KURUMBANG *et al.*, 2020). Embora ainda prematuros, estes trabalhos mostram o potencial de *Z. mobilis* de expressar genes celulolíticos e de produzir etanol a partir de substratos celulósicos, sendo que o ápice deste desenvolvimento seria uma linhagem capaz de expressar os três tipos de celulases necessários para degradar o material celulósico (endocelulase, exocelulase e  $\beta$ -glicosidase) de forma a realmente utilizar a celulose como fonte de carbono. Além disso, um sistema de secreção de amilase também já foi desenvolvido em *Z. mobilis* possibilitando a utilização de substratos amiláceos para a produção de etanol (WU *et al.*, 2014).

Embora muitos estudos tenham focado no desenvolvimento de linhagens que explorem a alta capacidade de *Z. mobilis* na produção de etanol, esta bactéria também apresenta características interessantes para a produção de outros produtos de alto valor agregado, como a alta taxa de consumo de açúcares e um TCA incompleto, como já mencionado, podendo este ser redirecionado para a produção de outras moléculas que não o etanol e lactato. Por exemplo, *Z. mobilis* já foi modificada para a produção de  $\beta$ -caroteno (MISAWA; YAMANO; IKENAGA, 1991) e dos combustíveis 2,3-butanediol (YANG *et al.*, 2016) e isobutanol (QIU *et al.*, 2020). Também com o interesse de desviar o metabolismo de *Z. mobilis* do etanol para outros produtos de alto valor agregado, o gene *pdC* foi deletado, sendo a linhagem resultante capaz de produzir maiores quantidades de succinato, um ácido dicarboxílico intermediário do ciclo do ácido cítrico com aplicações industriais importantes (SEO *et al.*, 2009). De fato, por meio da análise *in silico* da rede metabólica de *Z. mobilis*, foi relatado que o *pdC* é um dos alvos de deleção para o aumento de produção deste composto (LEE *et al.*, 2010).

Além disso, a produção nativa de outros compostos de interesse também já foi explorada em *Z. mobilis*. A presença da enzima levanasacarase nesta bactéria leva à produção do polímero de frutose levana, sendo que a deleção do gene *sacC* permite a sua produção em níveis ainda maiores (SENTHILKUMAR *et al.*, 2004). Ela também já foi cogitada para a fermentação de massas na indústria alimentícia em substituição à levedura *S. cerevisiae* (MUSATTI *et al.*, 2018). Ademais, *Z. mobilis* possui uma enzima única denominada glicose-frutose oxidoredutase (GFOR), cuja atividade é capaz de converter glicose e frutose em gliconolactona e sorbitol, respectivamente (ZACHARIOU; SCOPES, 1986). Ainda, a gliconolactona é espontaneamente convertida em ácido glicônico, de forma que a simultânea produção destes dois compostos, o ácido glicônico e sorbitol, já foi realizada utilizando *Z. mobilis* (FERRAZ; BORGES; ALVES, 2000; SILVA-MARTINEZ *et al.*, 1998; SILVEIRA

*et al.*, 1999). Misturas de frutose e de diferentes aldoses (glicose, maltose, galactose e lactose) também foram avaliadas na produção dos seus respectivos ácidos orgânicos, sendo alcançadas produções de 0,64, 0,57, 0,51 e 0,51 mol L<sup>-1</sup> respectivamente (MALVESSI *et al.*, 2013). Devido à importância do ácido lactobiônico nas indústrias farmacêutica e cosmética, a produção deste ácido foi investigada em células imobilizadas de *Z. mobilis*, sendo alcançada uma conversão de 510 mol L<sup>-1</sup> de ácido lactobiônico, cujo processo apresenta potencial para a produção em escala industrial (CARRA *et al.*, 2020). Demonstra-se assim, o potencial de *Z. mobilis* na produção de ácidos orgânicos.

Dessa forma, devido às possibilidades de expandir os substratos utilizáveis por *Z. mobilis*, de gerar de mutantes tolerantes a diversos compostos e de converter o metabolismo para produtos de alto valor agregado, *Z. mobilis* demonstra potencial para tornar-se uma plataforma para a produção de materiais de interesse industrial.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

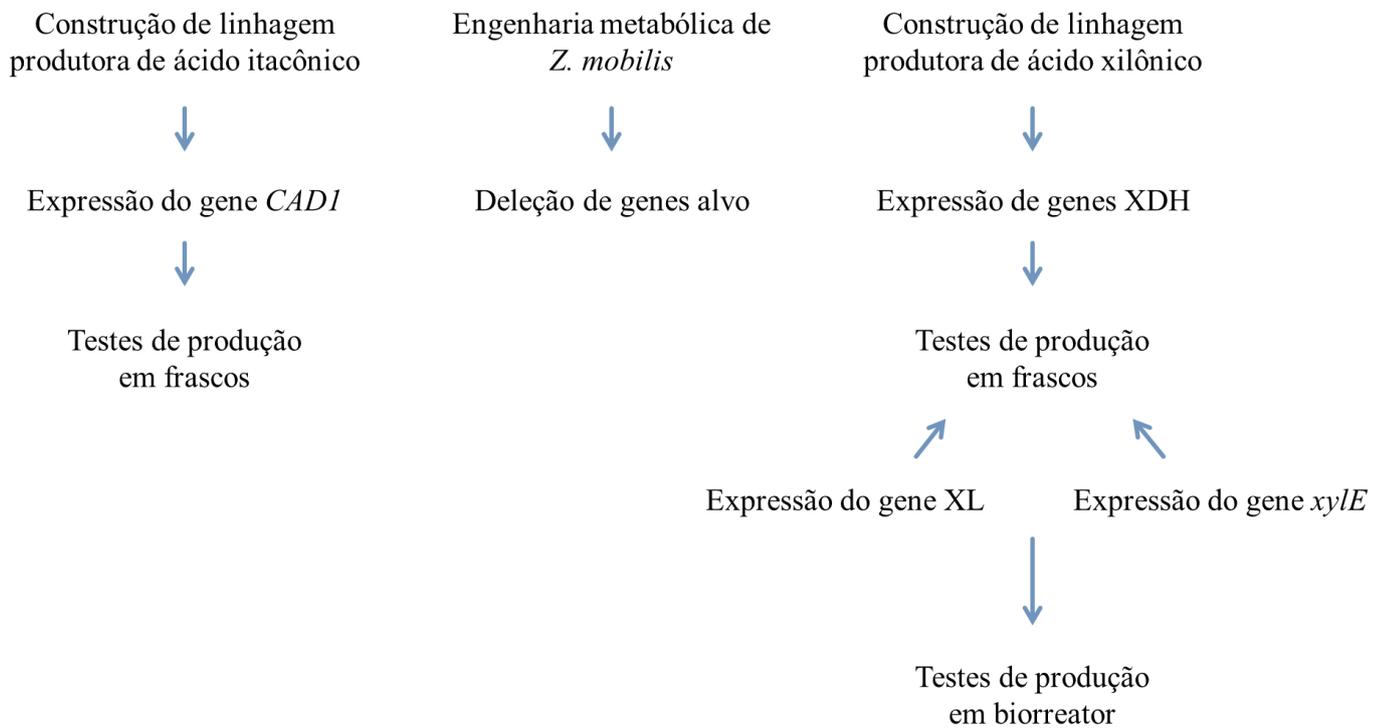
Realizar a engenharia metabólica de *Zymomonas mobilis* para o desenvolvimento de linhagens produtoras de ácidos orgânicos utilizando xilose como substrato.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 1) Expressar o gene *CAD1* em *Z. mobilis* e avaliar a produção de ácido itacônico a partir de xilose;
- 2) Testar a funcionalidade de diferentes genes *XDH* em *Z. mobilis* para a produção de ácido xilônico a partir de xilose;
- 3) Realizar a deleção dos genes *ZMO0976* e *ZMO1237*;
- 4) Expressar o transportador *xyIE* e derivados mutantes;
- 5) Avaliar a produção de ácido xilônico na linhagem resultante;
- 6) Avaliar a produção de ácido xilônico a partir de xilose e hidrolisado de cana-de-açúcar em biorreator.

### 3. Estratégia Experimental

A estratégia para a execução deste trabalho está apresentada na Figura 9.



**Figura 9. Estratégia experimental adotada para o presente trabalho.**

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Micro-organismos

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Z. mobilis*, linhagem ZM4 (ATCC 31821). Para as etapas de clonagem molecular, foi empregada a bactéria *E. coli*, cujas linhagens utilizadas e seus respectivos genótipos estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Linhagens de *E. coli* utilizadas neste trabalho

Linhagem	Genótipo	Utilização
DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR</i> 17( $r_k^-$ , $m_k^+$ ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\lambda^-$	Clonagem de DNA
XL10-Gold	Tet <sup>r</sup> $\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup> Z</i> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ]	Clonagem de DNA
DH10B	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL nupG</i> $\lambda^-$	Clonagem de DNA
JM110	<i>rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) [F' <i>traD36 proAB lacI<sup>q</sup> Z</i> $\Delta$ M15]	Desmetilação de plasmídeos

### 4.2 Genes heterólogos expressos em *Z. mobilis*

Em estudo anterior, genes putativos codificadores de XDH foram identificados por meio da construção de uma árvore filogenética feita a partir de dois genes já conhecidos e utilizados na literatura: *xylB* de *C. crescentus* e *xyd1* de *T. reesei* (ALMEIDA *et al.*, 2019). Além da avaliação destes dois genes em *Z. mobilis*, outros cinco identificados pelo estudo citado foram escolhidos para expressão heteróloga nesta bactéria. Assim, os genes XDH expressos em *Z. mobilis* estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Genes XDH expressos em *Z. mobilis*.

Referência da Proteína	Proteína Codificada	Micro-organismo de origem
WP_013270350.1	D-xilose 1-desidrogenase	<i>Brevundimonas subvibrioides</i>
WP_019016846.1	oxirredutase da família SDR <sup>a</sup>	<i>Halomonas lutea</i>
WP_010918706.1	D-xilose 1-desidrogenase	<i>Caulobacter crescentus</i>
WP_009605364.1	oxirredutase da família SDR <sup>a</sup>	alfaproteobactéria não classificada
ABE37211.1	D-xilose 1-desidrogenase	<i>Paraburkholderia xenovorans</i>
XP_006961719.1	D-xilose 1-desidrogenase	<i>Trichoderma reesei</i>
XP_007915223.1	NADP: D-xilose desidrogenase putativa	<i>Phaeoacremonium minimum</i>

<sup>a</sup> Família SDR: desidrogenases ou redutases de cadeia curta

A fim de facilitar o entendimento, neste trabalho foi utilizada a seguinte nomenclatura para os genes: BS para a XDH de *B. subvibrioides*, HL para a XDH de *H. lutea*, CC para a XDH de *C. crescentus*, AP para a XDH de alfaproteobactéria não identificada, BX para a XDH de *P. xenovorans*, TR para a XDH de *T. reesei* e TM para a XDH de *P. minimum*. Os genes foram sintetizados pela empresa GenOne, sendo disponibilizados clonados em vetores pMA-T.

Outros genes também expressos em *Z. mobilis* foram sintetizados pela empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*), sendo eles: o gene *CAD1* (referência *GenBank* AB326105.1), codificador da enzima *cis*-aconitato descarboxilase, de *A. terreus*; o gene *Bxe\_C1362* (referência *GenBank* ABE37210.1), codificador da enzima xilonolactonase, de *P. xenovorans*; e o gene *xylE* (referência *GenBank* CAD6020582.1), codificador de um transportador de xilose, de *E. coli*, este portando as mutações Q175A e G388A.

### 4.3 Meios de cultura e cultivo celular

Os meios de cultura utilizados para o cultivo de *E. coli* estão descritos a seguir.

- **Meio LB (*Luria-Bertani*):**

Peptona de caseína	1,0% (m/v)
NaCl	1,0% (m/v)
Extrato de levedura	0,5% (m/v)

O pH foi ajustado para 7,2 com adição de NaOH.

- **Meio SOB (*Super Optimal Broth*):**

Triptona	2,00% (m/v)
Extrato de levedura	0,50% (m/v)
NaCl	0,06% (m/v)
KCl	0,05% (m/v)
MgCl <sub>2</sub>	10 mmol/L
MgSO <sub>4</sub>	10 mmol/L

As soluções de MgCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub> foram esterilizadas separadamente por filtração em membrana de 0,22 µm e adicionadas ao meio previamente ao uso.

Para o meio sólido, foi adicionado ágar a 1,5% (m/v). As temperaturas de incubação foram de 37 °C ou 30 °C, conforme explicado no tópico 4.9. O crescimento em meio líquido ocorreu com rotação de 200 rpm.

Para o cultivo de *Z. mobilis*, foi utilizado o meio RM:

Glicose	2,0% (m/v)
Extrato de levedura	1,0% (m/v)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0,1% (m/v)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1% (m/v)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2% (m/v)

O pH foi ajustado para 6,0 com adição de KOH.

Para meio sólido, foi adicionado ágar a 1,5% (m/v). A temperatura de incubação foi de 30 °C. O crescimento em meio líquido ocorreu com rotação de 200 rpm.

Todos os meios de cultura utilizados foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 min previamente à sua utilização.

#### 4.4 Soluções

Para o preparo de células de *E. coli* competentes, foram utilizadas as seguintes soluções:

- **Tampão de transformação I:**

RbCl	1,20% (m/v)
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,99% (m/v)
Acetato de Potássio	0,03 mol/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,15% (m/v)
Glicerol	15,00% (m/v)

O pH da solução foi ajustado para 5,8 com ácido acético 0,2 M, sendo esta esterilizada por filtração com membrana de 0,22 µm.

- **Tampão de transformação II:**

MOPS	0,02 mol/L
RbCl	1,20% (m/v)
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,10% (m/v)
Glicerol	15,00% (m/v)

O pH da solução foi ajustado para 6,8 com NaOH, sendo esta esterilizada por filtração com membrana de 0,22 µm.

Os antibióticos utilizados durante as etapas de seleção de transformantes de *E. coli* e *Z. mobilis* estão listados na Tabela 4 com suas respectivas concentrações a depender do micro-organismo utilizado.

**Tabela 4.** Antibióticos utilizados neste trabalho.

Antibiótico	Concentração de uso ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>E. coli</i>	<i>Z. mobilis</i>
Cloranfenicol	30	100
Espectinomicina	50	200
Ampicilina	100	-
Canamicina	50	350

Os antibióticos foram preparados em H<sub>2</sub>O MilliQ, com exceção do cloranfenicol que foi preparado em etanol absoluto. Todos os antibióticos foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Para a extração de plasmídeos por lise alcalina a partir de *E. coli*, foram utilizadas as seguintes soluções:

• **Solução I:**

Tris-HCl (pH 8,0)	1,0 mmol/L
EDTA	0,1 mmol/L

• **Solução II:**

NaOH	0,2 mol/L
SDS	1,0% (m/v)

• **Solução III:**

Acetato de sódio	3 mol/L
Ácido acético	2 mol/L

O pH desta solução foi ajustado para 5,0.

A análise de fragmentos de DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando-se para coloração brometo de etídio (solução de uso de 200 µg/mL) ou SybrGold (Invitrogen<sup>TM</sup> – utilizado de acordo com as instruções do fabricante). O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Acetato EDTA (TAE), cuja composição 50X é: Tris-Acetato 2 M e EDTA 50 mM (pH 8,0). Já o tampão de amostra foi preparado da seguinte maneira (6X): glicerol (30% v/v) e azul de bromofenol ou xileno cianol (0,25% m/v). Os marcadores de massa molecular utilizados foram: 2-Log DNA Ladder (NEB), 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), 1 kb Ladder (Sinapse), 1 kb DNA Ladder (NEB) e 1 kb DNA Ladder (Promega).

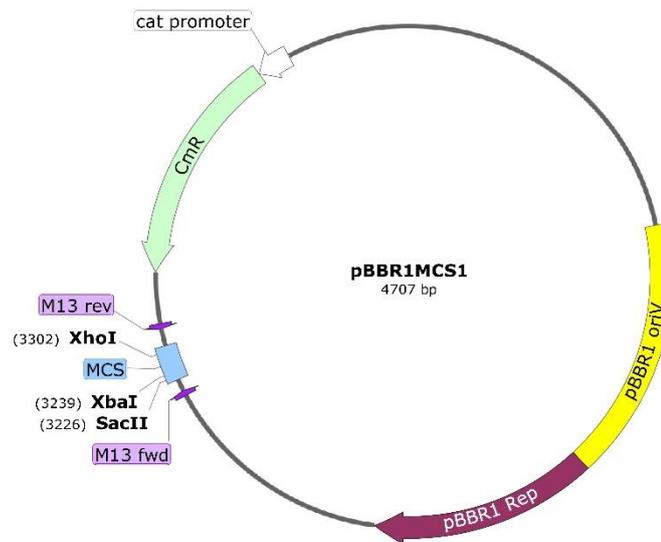
#### **4.5 Enzimas de restrição**

Para os procedimentos de clonagem molecular e confirmação das clonagens, as moléculas de DNA foram digeridas com as seguintes enzimas de restrição: NdeI (NEB ou Thermo Scientific), BglII (NEB), SacII (NEB), XhoI (Jena Biosciences), BamHI (Jena Biosciences), EcoRV (NEB), SacI (NEB ou Promega), KpnI (NEB), XbaI (Roche), HpaI (NEB), XcmI (NEB), EcoRI (NEB), SphI (NEB), SalI (NEB) e NcoI (NEB ou Promega), as quais foram utilizadas de acordo com as especificações dos fabricantes.

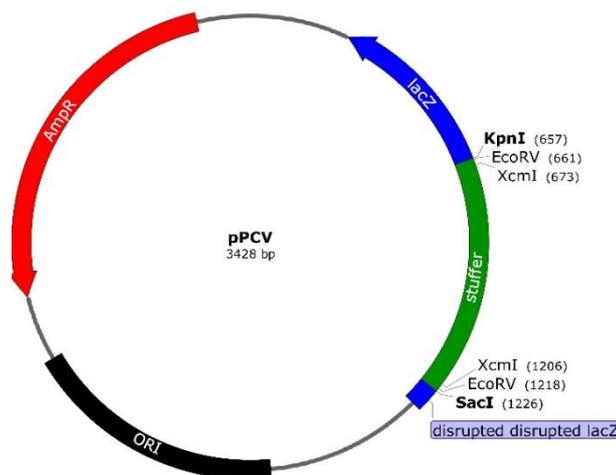
#### **4.6 Vetores**

Para a clonagem dos genes a serem expressos em *Z. mobilis*, foram utilizados os vetores da série pBBR1MCS (KOVACH *et al.*, 1995), sendo empregados o pBBR1MCS1, cuja marca de resistência a antibiótico é cloranfenicol e o pBBR1MCS2, cuja marca de resistência a antibiótico é canamicina. Ambos os vetores apresentam as mesmas características, diferindo apenas no gene de resistência. Sua origem de replicação é promíscua, sendo funcional tanto em *E. coli* quanto em *Z. mobilis*. O mapa de restrição do vetor pBBR1MCS1 está apresentado na Figura 10. Além disso, o vetor pBBR1MCS1 já havia sido modificado para conter o promotor e o terminador do gene nativo de *Z. mobilis pdc* (ZMO1360) entre os sítios de restrição XbaI e XhoI. Já o vetor pBBR1MCS2 foi modificado neste trabalho para conter as mesmas regiões regulatórias utilizando os sítios de restrição SacII e XhoI.

Para a construção dos cassetes de deleção, o esqueleto do vetor pPCV (JANNER *et al.*, 2013) (Figura 11) foi utilizado. Embora sua origem de replicação seja funcional em *E. coli*, ela não possibilita sua replicação em *Z. mobilis*, sendo então um vetor suicida neste micro-organismo. Esta característica permite que os transformantes tenham o DNA de interesse integrado no seu genoma. Os cassetes de deleção foram clonados entre os sítios de restrição SacI e KpnI. A Tabela 5 contém todos os plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho.



**Figura 10.** Mapa de restrição do vetor pBBR1MCS1, utilizado para a expressão gênica em *Z. mobilis*.



**Figura 11.** Mapa de restrição do vetor pPCV, utilizado para a construção de cassetes de deleção para *Z. mobilis*.

**Tabela 5.** Plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho.

<b>Plasmídeo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência</b>
pBBR1MCS1	Vetor utilizado para a expressão de genes em <i>Z. mobilis</i> ; Cm <sup>R</sup>	(KOVACH <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS2	Vetor utilizado para a expressão de genes em <i>Z. mobilis</i> ; Kan <sup>R</sup>	(KOVACH <i>et al.</i> , 1995)
pPCV	Vetor utilizado para a construção dos cassetes de deleção.	(JANNER <i>et al.</i> , 2013)
pB1-XDH BS	pBBR1MCS1 contendo o gene XDH BS para expressão.	Este trabalho.
pB1-XDH HL	pBBR1MCS1 contendo o gene XDH HL para expressão.	Este trabalho.
pB1-XDH CC	pBBR1MCS1 contendo o gene XDH CC para expressão.	Este trabalho.
pB1-XDH AP	pBBR1MCS1 contendo o gene XDH AP para expressão.	Este trabalho.
pB1-XDH BX	pBBR1MCS1 contendo o gene XDH BX para expressão.	Este trabalho.
pB1-XDH TR	pBBR1MCS1 contendo o gene XDH TR para expressão.	Este trabalho.
pB1-XDH TM	pBBR1MCS1 contendo o gene XDH TM para expressão.	Este trabalho.
pB1-CreA	pBBR1MCS1 contendo o gene da Cre recombinase para expressão.	Este trabalho.
pB1-recET	pBBR1MCS1 contendo os genes <i>recE</i> e <i>recT</i> para expressão.	Este trabalho.

**Tabela 5.** Continuação.

<b>Plasmídeo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência</b>
pB1-BXL	pBBR1MCS1 contendo os genes XDH BX e XL para expressão.	Este trabalho.
pB2-CAD1	pBBR1MCS2 contendo o gene <i>CAD1</i> para expressão.	Este trabalho.
pB1-pBADcad1	pBBR1MCS1 contendo o gene <i>CAD1</i> para expressão induzida por arabinose.	Este trabalho.
pB2-xylE	pBBR1MCS2 contendo o gene da <i>xylE</i> selvagem para expressão.	Este trabalho.
pB2-xylE175	pBBR1MCS2 contendo o gene da <i>xylE</i> mutado para expressão.	Este trabalho.
pB2-xylE388	pBBR1MCS2 contendo o gene da <i>xylE</i> mutado para expressão.	Este trabalho.
pB2-xylEM	pBBR1MCS2 contendo o gene da <i>xylE</i> mutado para expressão.	Este trabalho.
pB1-BX xylE	pBBR1MCS1 contendo os genes BX e <i>xylE</i> selvagem para expressão.	Este trabalho.
pB1-BX xylE175	pBBR1MCS1 contendo os genes BX e <i>xylE</i> mutado para expressão.	Este trabalho.
pB1-BX xylE388	pBBR1MCS1 contendo os genes BX e <i>xylE</i> mutado para expressão.	Este trabalho.
pB1-BX xylEM	pBBR1MCS1 contendo os genes BX e <i>xylE</i> mutado para expressão.	Este trabalho.
pV-Δ0976X	pPCV contendo o cassete de deleção do gene ZMO0976 e o operon com os genes <i>xylA</i> e <i>xylB</i> de <i>E. coli</i> .	Este trabalho.

**Tabela 5.** Continuação

<b>Plasmídeo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência</b>
pV- $\Delta$ 1237T	pPCV contendo o cassete de deleção do gene ZMO1237 e o operon com os genes <i>talB</i> e <i>tktA</i> de <i>E. coli</i> .	Este trabalho.
pV- $\Delta$ 0976	pPCV contendo o cassete de deleção do gene ZMO0976.	Este trabalho.
pV- $\Delta$ 1237	pPCV contendo o cassete de deleção do gene ZMO1237.	Este trabalho.

#### 4.7 Amplificação de DNA por PCR

Os *primers* utilizados para as reações de PCR realizadas neste trabalho estão listados nas Tabelas 6, 7 e 8. As amplificações de genes e de regiões de homologia com o genoma de *Z. mobilis* foram realizadas utilizando-se as enzimas *iProof High-Fidelity DNA Polymerase* (Bio-Rad), *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific), *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB) ou *Taq DNA Polymerase* (NEB). Já as reações de PCR confirmatórias foram realizadas utilizando-se as polimerases *Taq DNA Polymerase* recombinante (Invitrogen), *Taq DNA Polymerase* recombinante (Thermo Scientific) ou *MyTaq Mix* (Bioline). Todas as enzimas foram utilizadas de acordo com as instruções do fabricante.

A construção dos vetores contendo os genes *XDH* e *recE* e *recT* envolveu suas amplificações de maneira a possuírem homologia com o vetor pBBR1MSC1 contendo o promotor e terminador do gene *pdc* digerido com as enzimas *NdeI* e *BglII*. A amplificação dos genes *recE* e *recT* foi realizada a partir do genoma da linhagem DH10B de *E. coli*, assim como amplificação do gene *xylE* selvagem. Para a montagem do vetor contendo este último, também foram amplificadas as regiões promotora e terminadora do gene *pdc* do genoma de *Z. mobilis*. Estes fragmentos foram amplificados de maneira a possuírem homologia com o vetor pBBR1MCS2 digerido com as enzimas *SacII* e *XhoI*, assim como uns com os outros para montagem do plasmídeo. A construção dos vetores contendo os *operons* do gene *BX* com diferentes versões do gene *xylE* também se deu por meio de suas amplificações de forma a terem regiões de homologia com o vetor pB1-XDH BX digerido com *BglII*.

Para a montagem do vetor contendo o gene *CAD1* sob controle do promotor pBAD, os fragmentos necessários (gene *CAD1* e promotor pBAD juntamente com a região codificadora

da proteína araC) foram amplificados para conterem regiões de homologia um com o outro e com o vetor pBBR1MCS1 contendo o promotor e terminador do gene *pdC* digerido com as enzimas XbaI e BglII. Da mesma maneira, os fragmentos necessários para a construção dos cassetes de deleção dos genes *ZMO0976* e *ZMO1237* contendo ou não os *operons* de metabolismo de xilose também foram amplificados de maneira a terem homologia uns com os outros assim como com o vetor pPCV digerido com SacI e KpnI.

**Tabela 6.** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a construção dos vetores contendo os genes *XDH* e *CAD1*.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>
XDH BS-F	ACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAAGCATATGATGTCCGGTGCTGT TTACCC
XDH BS-R	GCCTTAAGCTCTAAGTTTATTTAAAAAAGATCTTTATCTCCAACCAGC GTCAACGA
XDH HL-F	AGTGTTTTGAATATATGGAGTAAGCATATGATGACTCACCCATCTGCT AGATAC
XDH HL-R	CTTAAGCTCTAAGTTTATTTAAAAAAGATCTTTAACCCCAACCACCAT CAACTG
XDH CC-F	ACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAAGCATATGATGTCCTCTGCTAT CTACCCATCC
XDH CC-R	TCGCCTTAAGCTCTAAGTTTATTTAAAAAAGATCTTTATCTCCAACCA GCGTCAATCC
XDH AP-F	ACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAAGCATATGATGGTTAACGCTG GTAACAGAACTGG
XDH AP-R	TCGCCTTAAGCTCTAAGTTTATTTAAAAAAGATCTTTAAACCCAACCA CCGTCAACGATG
XDH BX-F	ACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAAGCATATGATGTACTTGTTGTC CTACCCAGAGC

**Tabela 6.** Continuação.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>
XDH BX-R	TCGCCTTAAGCTCTAAGTTTATTTAAAAAAGATCTTTATTCACCGTACC AACCAGCGTC
XDH TR-F	ACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAAGCATATGATGGCTTCTGGTAA CCCATAC
XDH TR-R	TCGCCTTAAGCTCTAAGTTTATTTAAAAAAGATCTTTACTGGTTACCAG TGTTCAATG
XDH TM-F	ACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAAGCATATGATGGCTCCATACAC TGCTAAG
XDH TM-R	TCGCCTTAAGCTCTAAGTTTATTTAAAAAAGATCTTTACTTTCTACCAG TGTTCAATGG
araC-pBAD-F	GGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGATTATGACA ACTTGACGGCTAC
araC-pBAD-R	CACCGGATTTTGC GTTACTGTGCGGCTGATTGCTTTGTCATCAGTAGAGA GTTGCGATAAAAAG
cad1-pBAD-F	GCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGATGACAAA GCAATCAGCCGAC
cad1-pBAD-R	GCTTTTCGCCTTAAGCTCTAAGTTTATTTAAAAAAGATCTTTAAACAAG AGGAGATTTTACAGGAC

**Tabela 7.** Sequências de oligonucleotídeos utilizados para a construção dos vetores contendo o gene *xylE*.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>
<i>xylE</i> -F	CCTGATTCAGACATAGTGTGTTTTGAATATATGGAGTAAGCACATATGATG AATACCCAGTATAATTCCAG
<i>xylE</i> -R	GGCTTTTCGCCTTAAGCTCTAAGTTTATTTAAAAAGGATCCTTACAGCGT AGCAGTTTGTTG
pPDC <i>xylE</i> -F	GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGCGGT ATAATATCTGTAACAG
pPDC <i>xylE</i> -R	GAAAATATATAACTGGAATTATACTGGGTATTCATCATATGTGCTTACT CCATATATTCAAAAC
tPDC <i>xylE</i> -F	ACCGGAAACGAAGAAAACACAACAAACTGCTACGCTGTAAGGATCCTT TTTAAATAAACTTAGAGCTTAAGG
tPDC <i>xylE</i> -R	CCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGTT CTTTTTATCGGTCAAGAG
Frag1 <i>xylE</i> -R	TCCGACAATAATGGTCTGCAACAGCGCGATATCCGTGCTGGCCCCCAGC GTTTT
Frag2 <i>xylE</i> -F	GTGTTCAAACGCTGGGGGCCAGCACGGATATCGCGCTGTTGCAGACC ATTATT
<i>xylE</i> op-F	CTGGTTGGTACGGTGAATAACGGCTAACTGTGCAGTCCGTTGGCCCCGT TATCGGTAGCGATACCGGGCATTGTTTTTAAAGGAACGATCGATATGAATA CCCAGTATAATTCCA
<i>xylE</i> op-R	TTAAGCTCTAAGTTTATTTAAAAAAGATCTTTACAGCGTAGCAGTTTGTT

**Tabela 8.** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a construção dos vetores contendo os cassetes de deleção com ou sem os *operons* de metabolismo de xilose, os genes *recE*, *recT* e *cre* e para confirmações.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>
UP-pV-F	CTATAGGGCGAATTGGGTACCCGCCATCCAAAAAATGG
UP-Res-R	ACGAAGTTATCAGAAACTCTCCACATTTTTTAAAAAAG
UPxr-R	CATGATATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATCAGAAACTC TCCACATTTT
Res-UP-F	AGAGTTTCTGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACG
Res-DW-R	ATATCCGCTCGGATCCATAACTTCGTATAGCATAACATTATACG
Resxr-F	CAAACAGGGGTCTTTTTTAAAAAATGTGGAGAGTTTCTGATAACTTCG TATAATGTATGCTATAC
Resxr-R	CAAACATCATTACGATAGGATTCGGGTTGTTGATCGAACATAACTTCG TATAGCATACA
DW-Res-F	ACGAAGTTATGGATCCGAGCGGATATAAAACAAGC
DW <sub>xr</sub> -F	GGTAGATATGGAGATCGTTATGAAAACCTCAAAGACTGTGGAGCGGAT ATAAAACAAGC
DW-pV-R	AGGGAACAAAAGCTGGAGCTCTAATATGTTGGCTTGGGTG
Op-xr-F	AAGGATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTTTCGATCA ACAACCCGAAT
Op-xr-R	CCCTGTCTTGCGACAGTGACGGCTTGTTTTATATCCGCTCCACAGTCTTT GAGGTTTTCA
UPl <sub>dh</sub> -F	GCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGAAAGATCG TACTTCCTTA
UPl <sub>dh</sub> -R	CATGATATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATAGACACCCT CTTGAAAAG

**Tabela 8.** Continuação.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>
Resldh-F	CATATCTTTTTTCTTCAAAAACTTTTCAAGAGGGTGTCTATAACTTCG TATAATGTATGCTATAC
Spcl dh-R	GATCATTATGATCTTCAAAAGGTTAATTGTCGCTTGTCTAATAACTTC GTATAGCATACA
Resldh-R	CAAAACATCATTACGATAGGATTCGGGTTGTTGATCGAACATAACTTC GTATAGCATACA
DWldh_Spc-F	AAGGATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGACAAG CGACAATTAACC
DWldh-F	TCGGCGACCTTTTTTATTACCTTGATAATGTCCGTTTGCGTAGACAAG CGACAATTAAC
Dwldh-R	CGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCAAATAC GCCTAAAAAAGTT
Op-tal-F	AAGGATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTTTCGATC AACAACCCGAAT
Op-tal-R	GATCATTATGATCTTCAAAAGGTTAATTGTCGCTTGTCTACGCAAACG GACATTATCAAG
UP-F	CTATCAGTCGTCCCTTATATGGTCT
DW-R	CTCCTTTTGGGTGCGGCG
Cldh-F	TCGTTAAGCATCTGTGCGAAA
Cldh-R	GATTACGATCCAGAAAGTTATAAAAAC
Spec-F	GGCGGTTTTTCATGGCTTGTT
Spec-R	GTCGTTGATCAAAGCTCGCC
Cre-F	AGATCTCTAATCGCCATCTTCCAGCAG

**Tabela 8.** Continuação.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>
Cre-R	CATATGATGTCCAATTTACTGACCGTACACCAAAT
ZMET-F	TTGAATATATGGAGTAAGCATATGATGGATCCCGTAATCGTAGAAGACA
ZMET-R	CTCTAAGTTTATTAAAAAAGATCTCTATTCTCTGAATTATCGATTACAC

#### **4.8 Preparo de células bacterianas competentes**

As linhagens DH5 $\alpha$ , XL10-Gold, DH10B e JM110 foram utilizadas para os procedimentos de clonagem e desmetilação, como indicado na Tabela 2. Para o preparo de células competentes, estas foram retiradas de um estoque armazenado a -80 °C, estriadas em placas de meio LB e incubadas a 37 °C por um período de 16 a 18 h. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio SOB e submetida à agitação de 200 rpm a 37 °C por 16 horas. Dois mililitros deste pré-inóculo foram inoculados em 100 mL de meio SOB e incubados a 37 °C sob agitação de 200 rpm por aproximadamente uma hora até atingir OD<sub>600</sub> de 0,3. Após o crescimento, a cultura foi resfriada em banho de água-gelo com etanol por 15 min, sendo então as células coletadas por centrifugação a 3000 x g por cinco minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em 32 mL de tampão de transformação I e incubadas em banho de água-gelo com etanol por 15 min. A cultura foi novamente coletada sob as mesmas condições e ressuspensa em 4 mL de tampão de transformação II. Foram feitas alíquotas de 100  $\mu$ L, as quais foram armazenadas em freezer a -80 °C para uso posterior.

#### **4.9 Construção de plasmídeos e transformação de *E. coli***

Os plasmídeos contendo os diferentes genes XDH e *recET* foram construídos por meio da clonagem destes como fragmento NdeI e BglIII no vetor PBBR1MSC1 digerido com as mesmas enzimas de restrição e já contendo o promotor e terminador do gene *pdv*. As clonagens foram realizadas utilizando-se o *mix* de enzimas *NEBuilder HiFi DNA Assembly* (NEB) ou *In-Fusion HD EcoDry* (Clontech), cujas reações foram utilizadas para transformar células da linhagem DH5 $\alpha$ . Para tanto, as alíquotas de células competentes foram retiradas do freezer -80 °C e incubadas em gelo por cinco minutos. Após, foi adicionado o DNA, sendo a mistura incubada em gelo por 30 minutos. Em seguida, foi dado o choque térmico a 42 °C por 90 segundos e as células foram recuperadas adicionando-se 900  $\mu$ L de meio LB e incubando-

as por uma hora a 37 °C. Após o período de recuperação, as células foram semeadas em meio LB ágar contendo o antibiótico cloranfenicol para a seleção (30 µg/mL) e incubadas a 37 °C por um período de 16 a 18h.

O vetor contendo o gene *CAD1* foi construído utilizando o *mix* de enzimas *NEBuilder HiFi DNA Assembly* (NEB). Desta forma, o gene foi sintetizado tendo seu códon otimizado para *Z. mobilis*, sendo o fragmento sintetizado de forma a conter o promotor e terminador do gene *pdv* e regiões de homologia com o vetor pBBR1MSC2 digerido com as enzimas *SacII* e *XhoI*. A reação de *assembly* foi utilizada para transformar células XL10-Gold como descrito anteriormente, sendo que o antibiótico utilizado para seleção foi a canamicina. Para a construção do vetor contendo o gene *CAD1* sob controle do promotor pBAD, estes foram amplificados e ligados no vetor pBBR1MCS1 contendo o promotor e terminador do gene *pdv* digerido com as enzimas *XbaI* e *BglIII*, removendo assim o promotor *pdv*, utilizando o *mix* de enzimas *NEBuilder HiFi DNA Assembly* (NEB). Células DH5α foram transformadas como descrito anteriormente e selecionadas em placa contendo cloranfenicol.

Os vetores de integração contendo os cassetes de deleção portando somente o gene de resistência à espectinomicina foram construídos utilizando a técnica de *Gibson Assembly*, também sendo empregado o *mix* de enzimas *NEBuilder HiFi DNA Assembly* (NEB) após a amplificação de todos os fragmentos de DNA necessários para sua clonagem no vetor pPCV digerido com as enzimas *SacI* e *KpnI*. O sistema de montagem foi utilizado para transformar células XL10-Gold, como descrito anteriormente. Já os cassetes de deleção com os *operons* para metabolismo de xilose foram amplificados utilizando a técnica de *overlapping PCR* (OLP – PCR de sobreposição), sendo este fragmento maior contendo todas as sequências de DNA de interesse clonado no vetor pPCV digerido com as enzimas *SacI* e *KpnI* também utilizando o *NEBuilder HiFi DNA Assembly* (NEB). Células da linhagem DH10B (*operon xyl*) ou XL10-Gold (*operon tal*) foram submetidas a uma transformação com modificações. Após o choque térmico, as células foram recuperadas adicionando-se 900 µL de meio LB com 1% de glicose e incubando-se por uma hora a 30 °C. A seleção de transformantes foi realizada em meio LB contendo 1% de glicose e espectinomicina e/ou ampicilina, sendo as placas incubadas a 30 °C por um período de aproximadamente 24 h.

Para a construção do plasmídeo contendo a recombinase Cre, esta foi amplificada de forma a conter os sítios *NdeI* e *BglIII* em suas extremidades, sendo o produto de PCR ligado utilizando a T4 DNA Ligase (USB) ao vetor pBBR1MSC1 já contendo o promotor e terminador do gene *pdv* de *Z. mobilis* digerido com as mesmas enzimas de restrição. Células

DH5 $\alpha$  foram transformadas com 10  $\mu$ L do sistema de ligação da mesma forma descrita anteriormente. Por fim, as células foram semeadas em meio LB contendo cloranfenicol (30  $\mu$ g/mL) para seleção e incubadas a 37 °C. A enzima T4 DNA Ligase (NEB) também foi utilizada para a ligação do gene XL digerido com BglIII no vetor pB1-XDH BX digerido com a mesma enzima e desfosforilado com a enzima *Antarctic Phosphatase* (NEB), dando origem ao vetor pB1-BXL. O sistema de ligação foi utilizado para transformar células DH10B como descrito anteriormente.

A construção do vetor contendo o gene *xylE* envolveu a amplificação deste a partir do genoma de *E. coli* e do promotor e terminador do gene *pdC* de *Z. mobilis*. Após, estes fragmentos foram clonados no vetor pBBR1MCS2 digerido com as enzimas SacII e XhoI utilizando-se o *mix* de enzimas *NEBuilder HiFi DNA Assembly* (NEB), dando origem ao vetor pB2-*xylE*. Células de *E. coli* DH10B competentes também foram submetidas a uma transformação com modificações, conforme descrito anteriormente. A seleção de transformantes foi realizada em meio LB contendo 1% de glicose e canamicina (50  $\mu$ g/mL). Além da versão selvagem do gene *xylE*, uma versão contendo duas mutações foi sintetizada e clonada no vetor pB2-*xylE* digerido com as enzimas NdeI e BamHI, resultando no vetor pB2-*xylEM*. Outras duas versões deste vetor foram construídas substituindo fragmentos do gene pela versão selvagem, de forma a obter genes contendo apenas uma das duas mutações, sendo os vetores chamados de pB2-*xylE*175 e pB2-*xylE*388. Estes vetores foram utilizados como moldes para a amplificação das diferentes versões do gene *xylE* para sua clonagem no vetor pB1-XDH BX digerido com a enzima BglIII, sendo a ligação dos fragmentos realizada com o *mix* de enzimas *NEBuilder HiFi DNA Assembly* (NEB). Células DH10B foram transformadas também de forma modificada como descrito anteriormente.

Para a extração de plasmídeos de *E. coli*, foi utilizado o protocolo descrito por GREEN; SAMBROOK (2012) com modificações. Uma colônia transformante isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB, com posterior incubação a 37 °C por 16 a 18 h sob agitação de 200 rpm. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada a 10000 x g por 5 minutos, sendo as células ressuspensas em 200  $\mu$ L de solução I. A seguir, foram adicionados 360  $\mu$ L de solução II preparada na hora, sendo então a mistura homogeneizada por inversão e incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 300  $\mu$ L de solução III gelada e novamente a mistura foi homogeneizada e incubada em gelo por 5 minutos. Após, a amostra foi centrifugada a 10000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 750  $\mu$ L de isopropanol 100%. A mistura foi homogeneizada

por inversão e centrifugada a 10000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de solução I. A seguir, foram adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M. A mistura foi homogeneizada em vortex, seguindo-se centrifugação a 10000 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 750 µL de etanol 100% gelado. Seguiu-se uma centrifugação a 10000 x g por 5 minutos, a partir da qual o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%. A amostra foi novamente centrifugada a 10000 x g por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. Para a secagem do precipitado, foi utilizado concentrador a vácuo. Após, o precipitado foi ressuspensado em 50 µL de água MilliQ contendo RNase A (100 µg/mL), sendo o DNA armazenado a -20 °C. Alternativamente, o *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) foi utilizado.

Após a confirmação de todas as construções, o DNA foi transformado na linhagem JM110 para desmetilação e posterior transformação de *Z. mobilis*. A partir dessa linhagem, os plasmídeos foram extraídos em larga escala utilizando-se o *kit QIAGEN Plasmid Midi* (Qiagen) de acordo com as orientações do fabricante. Também foi utilizado um protocolo de *midiprep* caseira, o qual foi realizado da seguinte forma: após o crescimento das células em 100 mL de meio LB, estas foram coletadas a 6000 x g por 15 min a 4 °C e ressuspensas em 4 mL de solução I. Foram adicionados 4 mL de solução II e a mistura foi incubada em temperatura ambiente por cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mL de solução III, sendo a amostra incubada em gelo por 15 min. Após este período, esta foi centrifugada por 30 min com rotação de 20000 x g a 4 °C. Ao sobrenadante, foi adicionado cerca de 0,83 volume de clorofane (solução de fenol e clorofórmio na proporção 1:1), sendo a mistura agitada vigorosamente por um minuto para a extração de proteínas. A seguir, a amostra foi centrifugada a 5000 x g por 10 minutos e a fase aquosa contendo o DNA foi transferida para outro tubo. O DNA foi então precipitado utilizando-se 0,75 volume de isopropanol 100% e centrifugando-se a 20000 x g por 30 minutos. Por fim, o precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente por 10 minutos a 20000 x g. O DNA foi secado e ressuspensado em 200 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ contendo 100 µg/mL de RNase A, sendo então armazenado a -20 °C.

#### **4.10 Transformação de *Z. mobilis* por eletroporação**

Uma colônia isolada de uma placa fresca de *Z. mobilis* foi inoculada em 10 mL de meio RM e incubada a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 24 h. Após o crescimento, dois

mililitros deste pré-inóculo foi inoculado em 50 mL de meio RM, sendo a cultura incubada a 30 °C/200 rpm até atingir OD<sub>600</sub> de 0,3. Neste momento, as células foram coletadas a 3000 x g por cinco minutos a 4 °C, sendo estas ressuspensas em 10 mL de glicerol 10% gelado. Em seguida, a cultura foi novamente centrifugada sob as mesmas condições, sendo as células ressuspensas em 500 µL de glicerol 10% gelado. Foram feitas alíquotas de 100 µL, às quais foi adicionado o DNA a ser transformado (aproximadamente um µg para plasmídeos e cinco µg para integração no genoma).

A mistura de células e DNA foi incubada em gelo por 30 minutos. Após, as amostras foram submetidas ao choque elétrico com as seguintes condições: 200 Ω, 25 µF e 2,5 kV (12,5 kV/cm). Imediatamente após o choque, 900 µL de meio RM foram adicionados às células, sendo estas incubadas a 30 °C com agitação de 500 rpm em banho seco por no mínimo duas horas. Posteriormente ao período de recuperação, as células foram semeadas em meio RM contendo o antibiótico adequado e incubadas a 30 °C por 72 a 96 h.

#### **4.11 Teste de tolerância e consumo de ácido itacônico**

Para o teste de tolerância ao itaconato, a bactéria *Z. mobilis* foi cultivada em placa de 12 poços com meio RM contendo as seguintes concentrações de ácido itacônico em g L<sup>-1</sup>: 0, 5, 10, 15 e 20. O ácido itacônico foi previamente neutralizado a pH 6,0 adicionando-se KOH. A análise do crescimento foi realizada no equipamento *Epoch 2 Microplate Spectrophotometer*, com incubação a 30 °C/200 rpm por 24 h, sendo a OD<sub>600</sub> mensurada a cada 30 minutos.

O teste de consumo foi realizado com crescimento em frasco, durante 48 h e incubação a 30 °C/200 rpm. Alíquotas foram coletadas durante o crescimento para análise em HPLC. Para tanto, foi utilizada a coluna ROA-Organic Acid (Phenomenex), com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM como fase móvel, temperatura de 40 °C e fluxo de 0,5 mL/min.

#### **4.12 Teste de produção de ácido xilônico e seleção de linhagens**

Para a produção de ácido xilônico, primeiramente uma colônia isolada de cada linhagem a ser testada foi inoculada em 10 mL de meio RM e submetida a crescimento *overnight* a 30 °C/200 rpm. No dia seguinte, as células foram inoculadas em 100 mL de meio RM de forma que a OD<sub>600</sub> inicial fosse 0,1. Estas células foram cultivadas por 24 h sob as mesmas condições. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 3000 x g por cinco minutos e foram reinoculadas em 25 mL de meio RM contendo 50 g L<sup>-1</sup> de xilose e 5 g L<sup>-1</sup>

(concentrações definidas neste trabalho) de glicose de forma que a OD<sub>600</sub> inicial fosse 7,0. A curva de produção ocorreu por 48h para o caso do teste das XDH, sendo retiradas alíquotas a cada 12 h para análise posterior. No caso do teste das linhagens deletadas e coexpressando o gene da xilonolactonase, a curva ocorreu por 24 h, sendo realizada da mesma forma. Estes testes foram realizados em triplicatas, sendo selecionada a linhagem com melhor desempenho para o prosseguimento do trabalho.

Para os testes realizados com o transportador *xyIE*, uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio RM e submetida a crescimento *overnight* a 30 °C/200 rpm. No dia seguinte, as células foram inoculadas em 25 mL de meio RM contendo 50 g L<sup>-1</sup> de xilose e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose de forma que a OD<sub>600</sub> inicial fosse 0,1, sendo que curva de produção foi estendida até 72h. Os testes foram realizados em triplicatas.

#### **4.13. Produção de ácido xilônico em batelada**

Uma linhagem selecionada foi crescida em meio RM e então inoculada com uma OD<sub>600</sub> de 1,0 em um biorreator de 1 L (Multifors 2, Infors HT) contendo 500 mL de meio RM contendo 50 g L<sup>-1</sup> de xilose e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose. O cultivo ocorreu a 30 °C, pH 6,0 e agitação de 200 rpm, com vazão específica de ar de 0,3 vvm. O pH foi mantido pela adição de KOH 3 M, sendo o experimento conduzido em duplicatas.

Para investigar a habilidade de *Z. mobilis* de utilizar hidrolisado de biomassa lignocelulósica para a produção de ácido xilônico, foi realizada outra fermentação com as mesmas condições descritas acima, porém utilizando um hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Este continha 8,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, 100 g L<sup>-1</sup> de xilose, 20 g L<sup>-1</sup> de acetato, 1 g L<sup>-1</sup> de 5-hidroxiacetilfurfural e 2 g L<sup>-1</sup> de furfural, sendo adicionado na concentração de 10% no seguinte meio definido: 2 g L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio monobásico, 1 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio, 1 g L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio, 0,2 g L<sup>-1</sup> de cloreto de cálcio, 25 mg L<sup>-1</sup> molibdato de sódio, 25 mg L<sup>-1</sup> de sulfato ferroso, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de pantetonato de cálcio, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 0,02 mg L<sup>-1</sup> de biotina e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico (GOODMAN; ROGERS; SKOTNICKI, 1982; YANG *et al.*, 2014b). A solução de vitaminas foi previamente esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm. A glicose foi suplementada de forma a ter a concentração final de 20 g L<sup>-1</sup>.

#### **4.14 Cálculos de produtividade, rendimento e taxa de crescimento específico**

A produtividade volumétrica foi calculada por meio da plotagem da produção de ácido xilônico versus o tempo de cultivo, sendo a inclinação da regressão linear resultante considerada a produtividade volumétrica. O mesmo foi realizado para o cálculo de rendimento, porém sendo plotados a produção de ácido xilônico pela quantidade de xilose consumida. Para ambos os casos, foi considerada a fase exponencial de produção para o cálculo das taxas citadas. De maneira similar, a taxa de crescimento específico foi calculada pela plotagem do logaritmo da densidade celular versus o tempo de cultivo durante a fase de crescimento exponencial, sendo a inclinação da regressão linear resultante assumida como a taxa de crescimento máximo específico.

#### **4.15 Métodos analíticos**

A quantificação de ácido xilônico, xilose e glicose no sobrenadante de cultura foi realizada por meio de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). A coluna utilizada foi a Resex ROA-Organic Acid (300 x 7,8 mm - *Phenomenex*), sendo utilizado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM como fase móvel com fluxo de 0,4 mL/min e temperatura de 55 °C (LIU *et al.*, 2012). Os picos de glicose e xilose foram detectados com um detector de índice de refração (RID-10A), enquanto o ácido xilônico foi detectado e quantificado a partir de um detector de UV/VIS (SPD-20A) em 210 nm. Uma vez que os picos do ácido xilônico e da xilose possuem o mesmo tempo de retenção, quando o primeiro estava presente, a xilose foi calculada de forma indireta por meio da subtração do pico do ácido xilônico (quantificado por UV) da área correspondente deste no pico combinado detectado pelo RID.

## 5. Resultados e Discussão

Para facilitar a compreensão, os resultados e a discussão do presente trabalho foram divididos em dois capítulos. O Capítulo I trata da expressão heteróloga do gene *CADI* para a produção de ácido itacônico por *Z. mobilis*, relatando também a construção de vetores integrativos para esta bactéria e as diferentes estratégias adotadas para a integração de fragmentos de DNA ao seu genoma.

O Capítulo II aborda a expressão de sete diferentes genes codificadores da enzima xilose desidrogenase, sendo selecionado aquele que levou a uma maior produção de ácido xilônico. São descritas também a expressão do gene codificador da enzima xilonolactonase de *P. xenovorans* e as modificações genéticas realizadas em *Z. mobilis* buscando otimizar esta produção. São realizados ainda testes fermentativos em biorreator em meio complexo e utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, e por fim, é descrita a mutagênese realizada no transportador de xilose de *E. coli xylE* com o objetivo de minimizar a competição do transportador com a glicose e assim, melhorar o influxo de xilose.

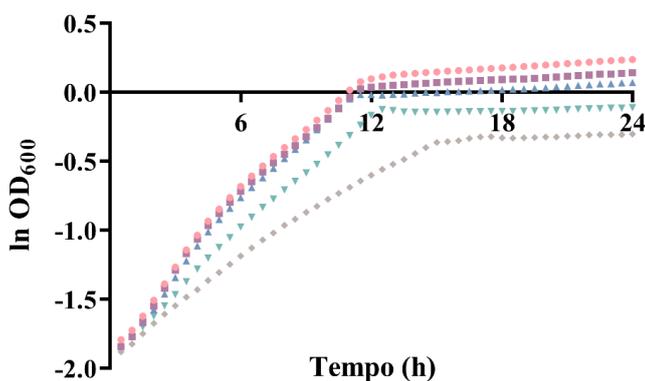
## Capítulo I

A engenharia metabólica de micro-organismos apresenta um grande potencial para a produção de uma ampla variedade de moléculas, como combustíveis, produtos químicos e drogas. Contudo, as perspectivas de comercialização de tais produtos são dificultadas pelos baixos níveis de produtividade alcançados durante o bioprocessamento, limitando a viabilidade econômica deste. Por sua vez, a obtenção de uma alta produtividade depende da tolerância do micro-organismo produtor ao produto final, uma vez que sua presença e acúmulo pode afetar a taxa de crescimento do micro-organismo, limitando a produção e aumentando seu custo. Assim, para a obtenção de uma linhagem de *Z. mobilis* produtora de ácido itacônico, os primeiros testes realizados foram em relação à sua tolerância e consumo deste composto. Neste capítulo também é abordada a construção de vetores para a integração da via de metabolização de xilose no genoma de *Z. mobilis* e para a expressão do gene *CAD1* de *A. terreus*.

### 5.1 Produção de ácido itacônico por *Z. mobilis*

#### 5.1.1 Testes de tolerância e consumo de ácido itacônico

A fim de avaliar a tolerância da bactéria *Z. mobilis* ao itaconato, esta foi cultivada em meio RM contendo diferentes concentrações deste, o qual foi previamente neutralizado em pH 6,0 com KOH. As curvas de crescimento estão apresentadas na Figura 12, sendo que as taxas de crescimento em cada condição e os tempos de duplicação encontram-se na Tabela 9.



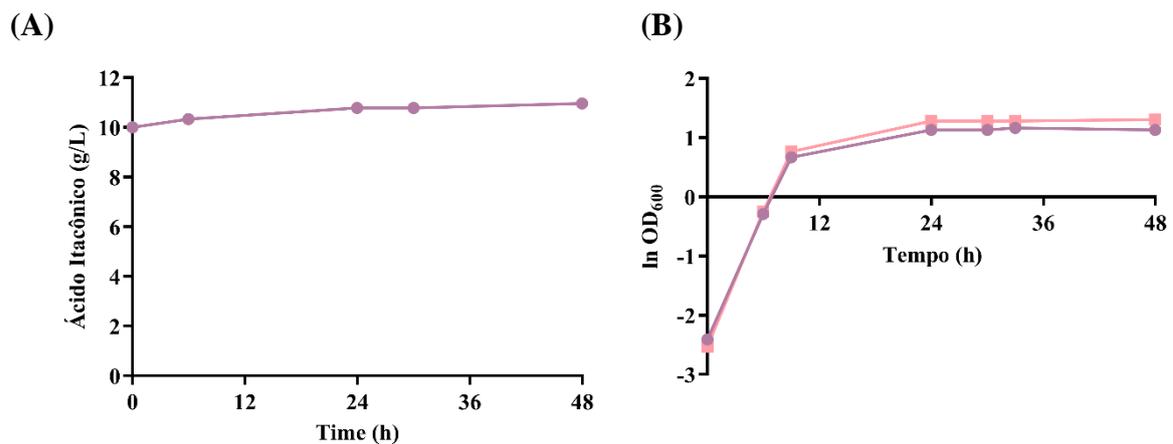
**Figura 12. Crescimento de *Z. mobilis* na presença de diferentes concentrações de ácido itacônico.** As concentrações testadas foram: 0 g L<sup>-1</sup> (círculos rosas); 5 g L<sup>-1</sup> (quadrados roxos); 10 g L<sup>-1</sup> (triângulos azuis); 15 g L<sup>-1</sup> (triângulos invertidos verdes); 20 g L<sup>-1</sup> (losangos cinzas).

**Tabela 9.** Taxas de crescimento específico e tempo de duplicação de *Z. mobilis* em meio contendo ácido itacônico.

Concentração de Ácido Itacônico (g L <sup>-1</sup> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Tempo de duplicação (h)
0	0,17	4,02
5	0,17	4,07
10	0,17	4,07
15	0,14	4,80
20	0,10	6,65

De acordo com os dados obtidos, nota-se que o ácido itacônico afeta negativamente o crescimento de *Z. mobilis* de forma considerável somente a partir da concentração de 20 g L<sup>-1</sup>. Ainda, já foi demonstrado que a tolerância de *Z. mobilis* a ácidos orgânicos pode ser melhorada - uma abordagem de adaptação em meio contendo ácido acético foi utilizada para a geração de uma linhagem, denominada ZM6014, mais tolerante a este composto, sendo esta capaz de crescer em meio contendo 1,4% de ácido acético enquanto que a linhagem original não era capaz (CHEN *et al.*, 2012).

Em *A. terreus*, há uma via proposta de catabolismo de ácido itacônico. Este é primeiro convertido em itaconil-CoA pela enzima itaconil-CoA transferase (IctA), sendo ele hidratado pela enzima itaconil-CoA hidratase (IchA) formando citramalil-CoA. Por fim, o citramalil-CoA é clivado em acetil-CoA e piruvato pela enzima citramalil-CoA liase (CclA) (CHEN *et al.*, 2016). Uma vez que a presença desta ou de outras vias que levariam ao consumo de itaconato é desconhecida em *Z. mobilis*, foi realizado um teste para verificar se esta bactéria é capaz de consumi-lo. Para tanto, *Z. mobilis* foi crescida em meio RM contendo 10 g L<sup>-1</sup> de ácido itacônico neutralizado com KOH. A Figura 13A mostra que a concentração deste permaneceu constante durante 48 h de cultivo, sugerindo que *Z. mobilis* não possui vias catabólicas de itaconato e, portanto, não é capaz de consumi-lo. A Figura 13B apresenta as curvas de crescimento obtidas neste ensaio na presença na ausência de ácido itacônico. Devido à sua tolerância ao ácido itacônico e à sua incapacidade de consumi-lo, *Z. mobilis* demonstra potencial para a produção deste ácido orgânico.



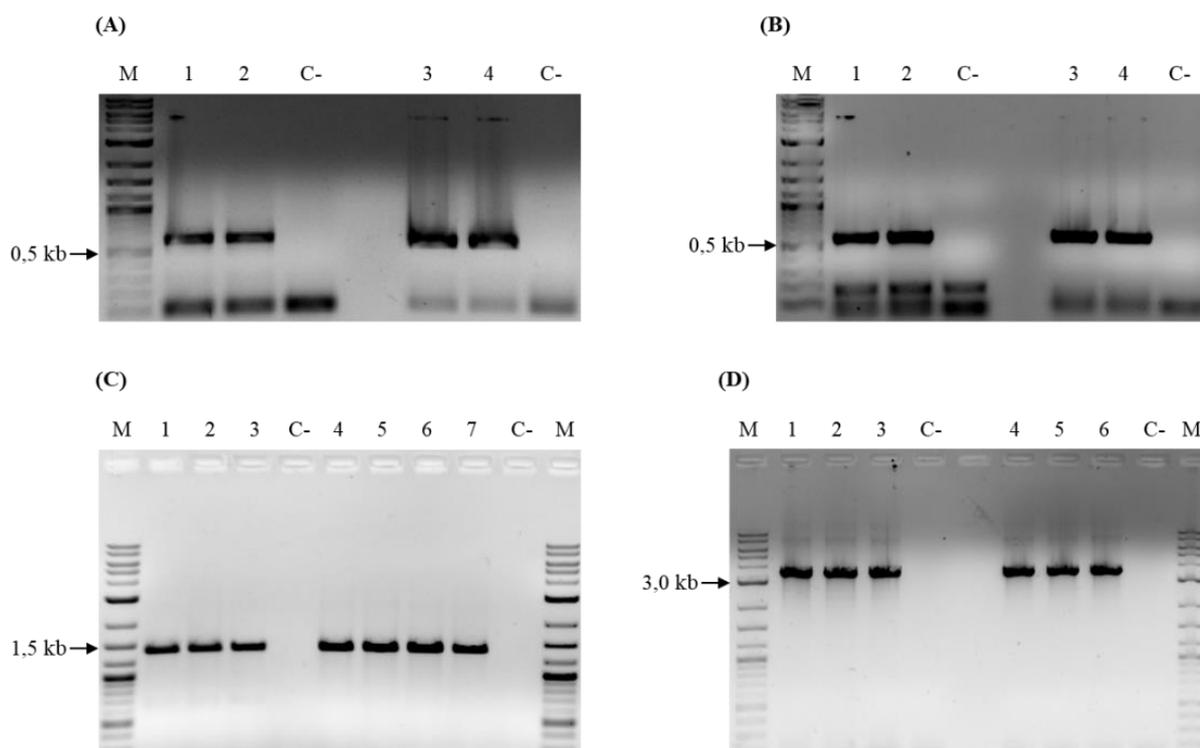
**Figura 13. Teste de consumo de ácido itacônico por *Z. mobilis*.** (A) Presença de ácido itacônico no meio de cultivo ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), a qual foi constante durante 48 h (círculos roxos); (B) crescimento na presença de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de ácido itacônico (círculos roxos) e na ausência deste (quadrados rosas).

### 5.1.2 Construção de vetores integrativos e de expressão para *Z. mobilis*

Como estratégia para o desenvolvimento de uma linhagem de *Z. mobilis* produtora de ácido itacônico, optou-se também pela utilização de xilose como fonte de carbono. Para tanto, é necessária a expressão heteróloga de quatro genes: *xylA* (xilose isomerase), *xylB* (xiluloquinase), *talB* (transaldolase) e *tktA* (transcetolase). Dois *operons*, cada um contendo dois genes para a metabolização de xilose, foram previamente construídos e sintetizados, um contendo os genes *xylA* e *xylB* (Operon X) e o outro contendo os genes *talB* e *tktA* (Operon T). O plasmídeo sintético contendo ambos os *operons* foi utilizado como molde para as suas ampliações. Além disso, os *operons* estão sob controle do promotor do gene *gap* de *Z. mobilis*, sendo que os genes são nativos de *E. coli*.

Cassetes de deleção contendo os *operons* foram construídos objetivando suas integrações no genoma de *Z. mobilis*. Como alvos de integração, foram escolhidos dois genes para concomitante deleção destes: ZMO0976 e ZMO1237. O gene ZMO0976 codifica para uma aldo-ceto redutase que possui atividade sobre xilose (AGRAWAL; CHEN, 2011), convertendo esta a xilitol, um composto tóxico para *Z. mobilis* (YANG *et al.*, 2014a), além de competir pelo substrato xilose. O gene ZMO1237 codifica para uma lactato desidrogenase, enzima catalisadora da conversão de piruvato a lactato. A deleção deste gene visa a um maior fluxo de piruvato pelo TCA para a produção de ácido itacônico, ao invés deste ser convertido em outros subprodutos como o lactato. Para a integração destes cassetes de deleção via

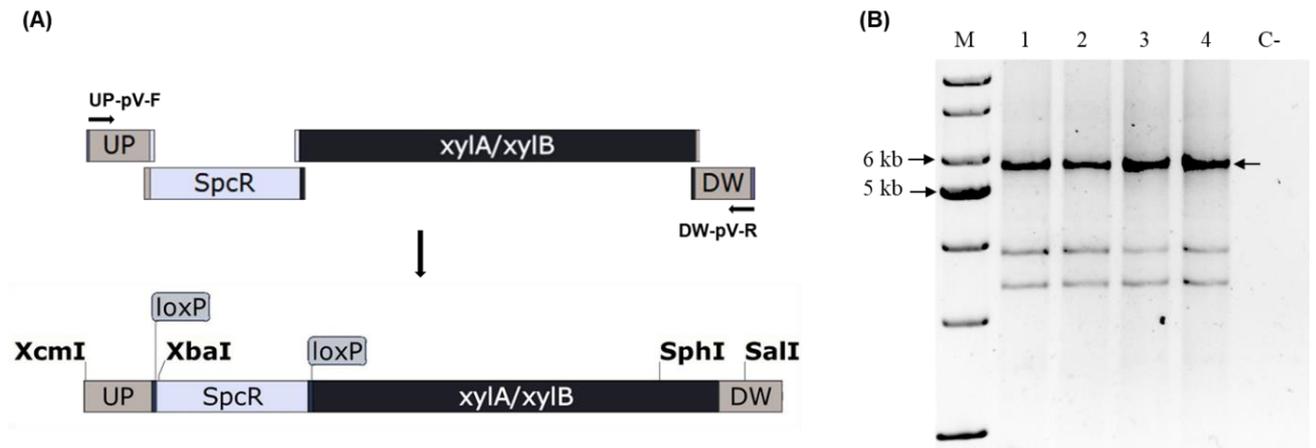
recombinação homóloga, sequências de aproximadamente 500 pb *upstream* e *downstream* aos genes a serem deletados foram amplificadas a partir do genoma de *Z. mobilis*. Como marca de seleção dominante, foi selecionado o gene de resistência ao antibiótico espectinomicina, o qual foi amplificado a partir de um vetor contendo este gene sintetizado e de forma a ser flanqueado por sequências *loxP* para posterior remoção da marca. A Figura 14 apresenta todas as amplificações destes fragmentos.



**Figura 14. Amplificação dos fragmentos para construção dos cassetes de deleção.**

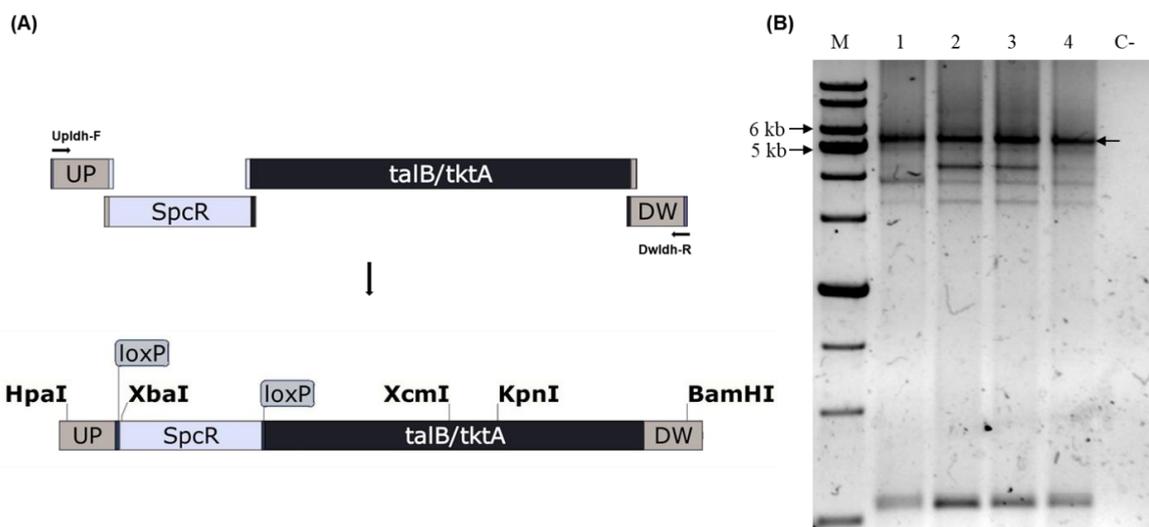
Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (A) Amplificação dos fragmentos de homologia com o genoma de *Z. mobilis*: regiões *upstream* ao gene ZMO0976 (1 e 2); regiões *downstream* ao gene ZMO0976 (3 e 4). (B) Amplificação dos fragmentos de homologia com o genoma de *Z. mobilis*: regiões *upstream* ao gene ZMO1237 (1 e 2); regiões *downstream* ao gene ZMO1237 (3 e 4). (C) Amplificação do gene de resistência e espectinomicina (~1,4 kb): Spc<sup>R</sup> para anelamento com cassete de deleção do gene ZMO1237 (1 – 3); Spc<sup>R</sup> para anelamento com o cassete de deleção do gene ZMO0976 (4 – 7). (D) Amplificação dos *operons* contendo os genes de metabolização de xilose (~3,3 kb): Operon X (1 – 3); Operon T (4 – 6). M: marcador de massa molecular 2- Log DNA Ladder (*New England Biolabs*). C-: controle negativo das reações de PCR.

Uma vez que não foi possível a montagem dos cassetes de deleção utilizando o *mix* de enzimas *NEBuilder HiFi DNA Assembly*, foi adotada uma estratégia de PCR de sobreposição (*overlapping PCR – OLP*) para a construção dos cassetes, cujas amplificações estão apresentadas na Figuras 15 e 16. As bandas resultantes possuem tamanho de aproximadamente 5,7 kb correspondente ao cassete completo. Por fim, para a construção dos plasmídeos finais contendo os cassetes de deleção, foi utilizado o vetor pPCV digerido com as enzimas *SacI* e *KpnI*, originando os vetores pV- $\Delta$ 0976X (contém o Operon X) e pV- $\Delta$ 1237T (contém o Operon T). A digestão com as enzimas citadas permitiu confirmar a clonagem do vetor pV- $\Delta$ 0976X (Figura 17), liberando fragmentos de aproximadamente 5,7 kb e 2,9 kb, correspondente ao cassete e ao vetor, respectivamente. Além disso, foram realizadas digestões com as enzimas *XcmI*, *XbaI*, *SphI* e *SalI* que devem linearizar o vetor nos fragmentos *upstream* ao gene ZMO0976, no gene de resistência a espectinomicina, no Operon X e no fragmento *downstream* ao gene ZMO0976, respectivamente, confirmando assim a presença de cada um dos segmentos de DNA e gerando uma banda de aproximadamente 8,6 kb, correspondente ao vetor linearizado. De maneira semelhante, a confirmação da clonagem do vetor pV- $\Delta$ 1237T (Figura 18) foi realizada utilizando as enzimas *SacI* e *KpnI*, liberando fragmentos de 2,9 kb correspondente ao vetor, e de 3,9 kb e 1,7 kb correspondentes ao cassete de deleção, o qual apresenta um sítio de *KpnI*. Também foram realizadas digestões com as enzimas *HpaI*, *XbaI*, *XcmI* e *BamHI*, as quais linearizam o vetor nos fragmentos *upstream* ao gene ZMO1237, no gene de resistência a espectinomicina, no Operon T e no fragmento *downstream* ao gene ZMO1237, respectivamente, confirmando assim a presença de cada um dos segmentos de DNA e gerando uma banda de aproximadamente 8,6 kb, correspondente ao vetor linearizado.



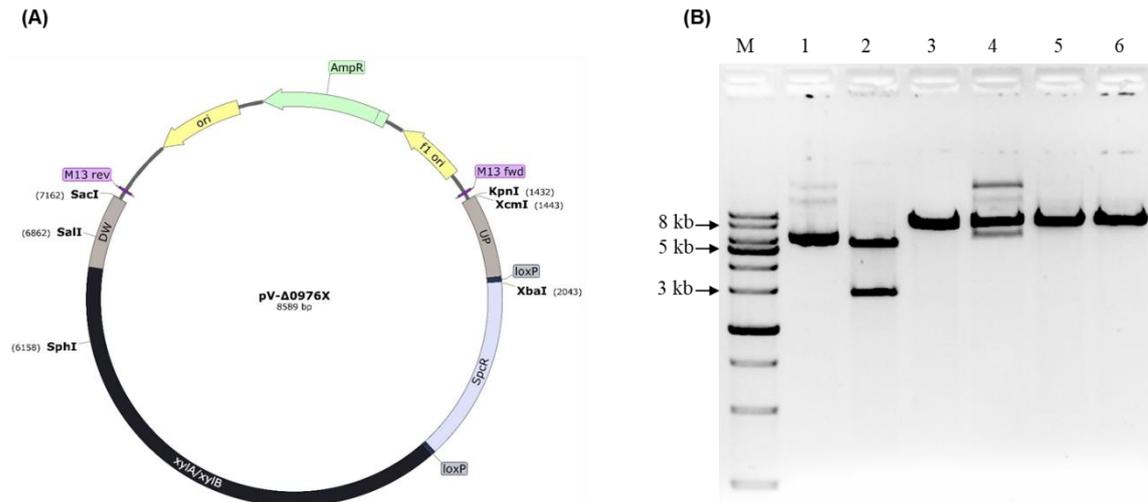
**Figura 15. Amplificação do cassete de deleção do gene ZMO0976 contendo o Operon X.**

(A) Esquema de montagem do cassete por meio da técnica OLP. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio; a seta indica a banda correspondente ao cassete de deleção que possui aproximadamente 5,7 kb. M: marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Sinapse Biotecnologia); 1 a 4: diferentes reações de PCR; C-: controle negativo da reação de PCR.

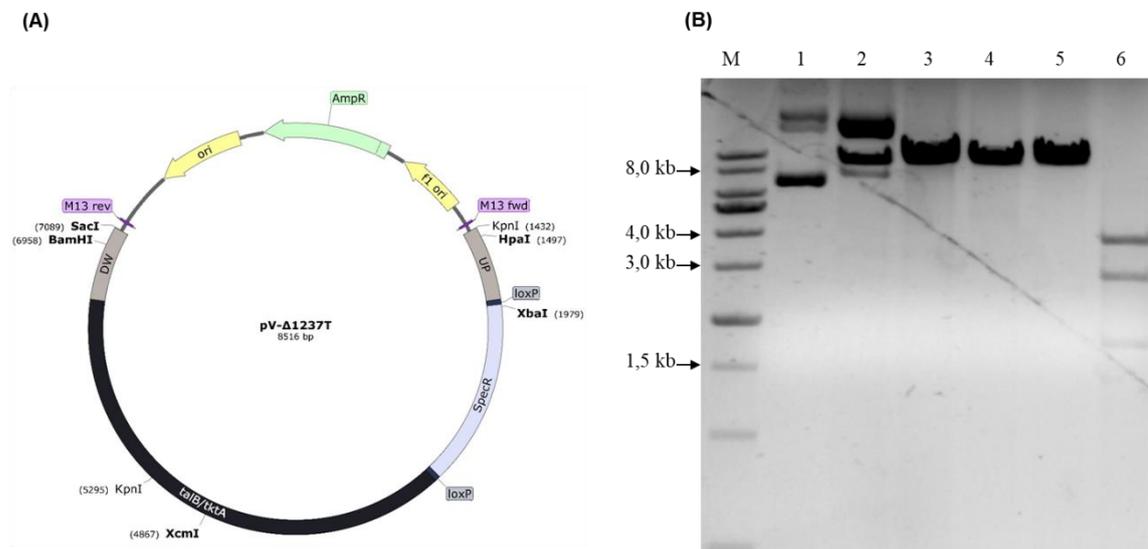


**Figura 16. Amplificação do cassete de deleção do gene ZMO1237 contendo o Operon T.**

(A) Esquema de montagem do cassete por meio da técnica OLP. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio; a seta indica a banda correspondente ao cassete completo que possui aproximadamente 5,7 kb. M: marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Sinapse Biotecnologia); 1 a 4: diferentes reações de PCR; C-: controle negativo da reação de PCR.

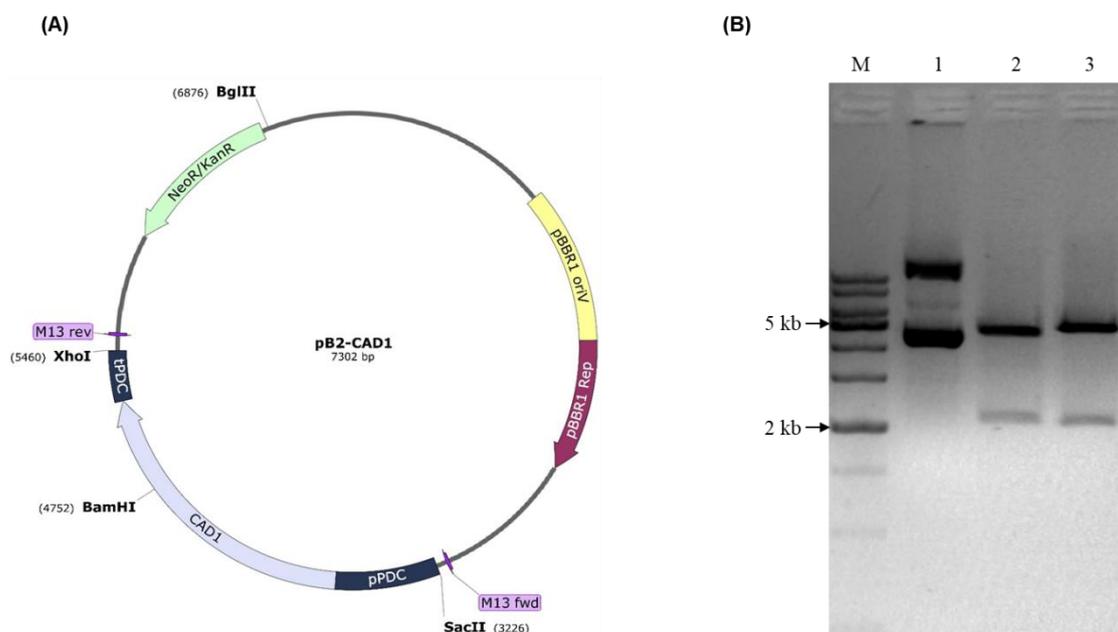


**Figura 17. Confirmação da clonagem do cassete de deleção do gene ZMO0976 contendo o Operon X.** (A) Mapa de restrição do vetor resultante da clonagem do cassete de deleção no plasmídeo pPCV digerido com as enzimas SacI e KpnI. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Sinapse Biotecnologia); 1: vetor intacto; 2: digestão dupla com as enzimas SacI e KpnI; 3: digestão com XcmI; 4: digestão com XbaI; 5: digestão com SphI; 6: digestão com SalI.



**Figura 18. Confirmação da clonagem do cassete de deleção do gene ZMO1237 contendo o Operon T.** (A) Mapa de restrição do vetor resultante da clonagem do cassete de deleção no plasmídeo pPCV digerido com as enzimas SacI e KpnI. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Sinapse Biotecnologia); 1: vetor intacto; 2: digestão com HpaI; 3: digestão com XbaI; 4: digestão com XcmI; 5: digestão com BamHI; 6: digestão dupla com as enzimas SacI e KpnI.

A produção de ácido itacônico requer a expressão do gene *CAD1*, o qual foi clonado no vetor pBBR1MCS2 (Kan<sup>R</sup>). Primeiramente, este foi sintetizado (*Integrated DNA Technologies*) juntamente com o promotor e terminador do gene *pdC* de *Z. mobilis*, além de ser flanqueado por regiões de homologia com o vetor pBBR1MCS2 digerido com as enzimas SacII e XhoI que permitem sua clonagem por meio da técnica de *Gibson Assembly*. O vetor originado foi denominado pB2-CAD1, cujos mapa e confirmação de construção estão apresentados na Figura 19. A digestão dupla com as enzimas SacII e XhoI libera fragmentos de 2,2 kb e 5,1 kb correspondentes ao gene juntamente com as regiões promotora e terminadora, e ao vetor, respectivamente. Já a digestão com BamHI e BglII libera fragmentos de 2,1 kb e 5,2 kb.



**Figura 19. Confirmação da clonagem do gene *CAD1* no vetor pBBR1MCS2.** (A) Mapa de restrição do vetor originado. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Sinapse Biotecnologia); 1: vetor intacto; 2: digestão dupla com as enzimas SacII e XhoI; 3: digestão dupla com as enzimas BamHI e BglII.

### 5.1.3 Integração no genoma de *Z. mobilis*

Os vetores pV- $\Delta$ 0976X e pV- $\Delta$ 1237T foram utilizados para transformar *Z. mobilis* ZM4 visando à integração dos *operons* em seu genoma com concomitante deleção dos genes alvo ZMO0976 e ZMO1237. Por meio da abordagem empregada, os cassetes de deleção

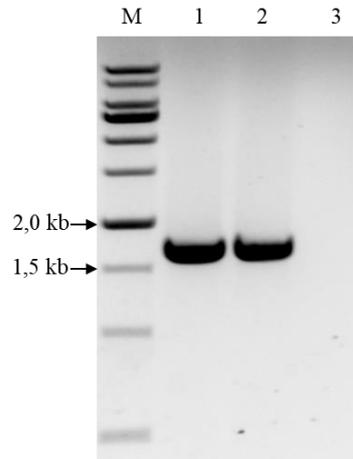
seriam integrados no genoma por meio do aparato de recombinação homóloga da bactéria, uma vez que estes possuem regiões de homologia aos *loci* alvo flanqueando-o.

A transformação de *Z. mobilis* seja com os vetores intactos ou linearizados não resultou em transformantes que possuíssem o cassete integrado de forma correta, uma vez que não foi possível a sua confirmação por PCR de DNA genômico. Uma provável razão para o fracasso da integração é o tamanho dos cassetes de deleção, os quais possuem aproximadamente 4,7 kb, excetuando os braços de homologia. Sabe-se que a eficiência de integração diminui com insertos maiores, sendo que um estudo realizado em *E. coli* (PYNE *et al.*, 2015) demonstrou que a eficiência de integração de cassetes de diferentes tamanhos (variando de 550 a 3000 pb) decaiu de 47% a 1% utilizando braços de homologia de 40 pb e um sistema acoplado de CRISPR/Cas9 com o *recombineering* Lambda Red. Portanto, outra estratégia é necessária para a integração de grandes fragmentos de DNA no genoma de *Z. mobilis*.

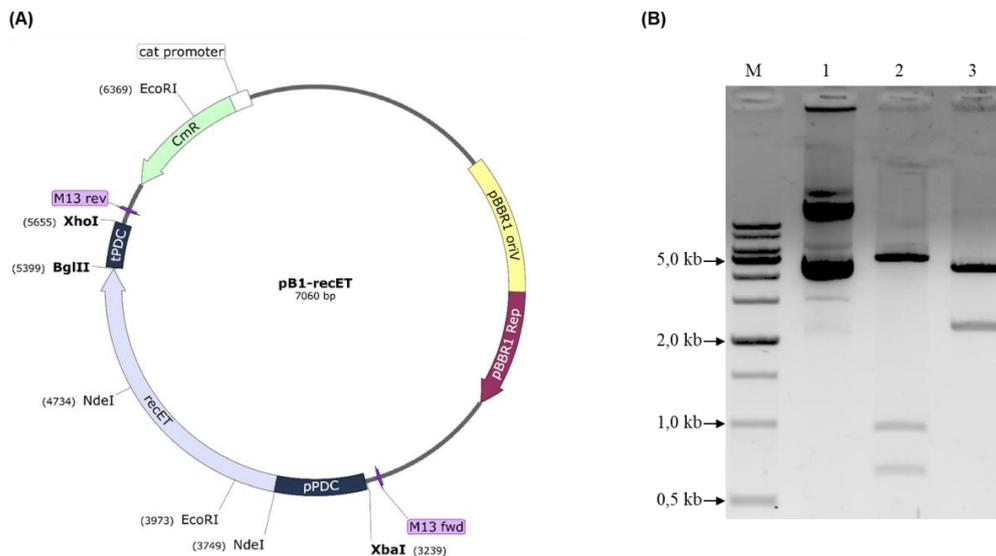
A recombinação homóloga é um importante processo celular cujo papel inclui a manutenção da integridade do genoma, sendo responsável pelo reparo de quebras na dupla-fita de DNA que podem ocorrer durante sua replicação ou por danos derivados de fatores externos. Uma das vias de recombinação homóloga de *E. coli* contém dois genes, *recE* e *recT*, provenientes do profago críptico Rac. A proteína RecE é uma exonuclease 5' → 3' e a RecT é uma proteína que se liga a DNA fita simples (ssDNA), promovendo o anelamento de fitas simples, transferência e invasão de fita *in vitro*. Assim, a RecE é responsável por digerir uma quebra na dupla-fita de DNA, expondo uma extremidade 3' de ssDNA. A RecT se liga a esta extremidade formando um fragmento recombinogênico utilizado no processo de recombinação, que pode ser tanto por anelamento de fitas simples ou por invasão de fita, reestabelecendo a dupla-fita de DNA (MUYRERS *et al.*, 2000).

Este e outros sistemas naturais de recombinação foram empregados como uma técnica de edição de genoma de bactérias denominada “*recombineering*”, se referindo à engenharia de DNA recombinante por meio de recombinação homóloga (MARINELLI; HATFULL; PIURI, 2012). Um estudo (WU *et al.*, 2017) reporta o uso do sistema de recombinação RecET em *Z. mobilis*, sendo relatada a recombinação homóloga entre *loci* genômicos desta bactéria e produtos de PCR, resultando em deleções gênicas. Assim, de forma a testar este sistema na integração de grandes fragmentos de DNA no genoma de *Z. mobilis*, um plasmídeo contendo os genes *recE* e *recT* de *E. coli* foi construído. Para tanto, o *operon recET* foi amplificado a partir do genoma da linhagem DH10B de *E. coli* (Figura 20), o qual contém aproximadamente

1,7 kb, sendo este clonado como fragmento NdeI-BglIII no vetor pBBR1MCS1 contendo o promotor e o terminador do gene *pdC* de *Z. mobilis*. O vetor resultante foi denominado pB1-recET, cuja clonagem foi confirmada pela digestão com as enzimas NdeI e BglIII, resultando em bandas de tamanhos de aproximadamente 0,7, 1,0 e 5,4 kb; e com a enzima EcoRI, a qual resulta em bandas de tamanhos de 2,4 e 4,7 kb (Figura 21).

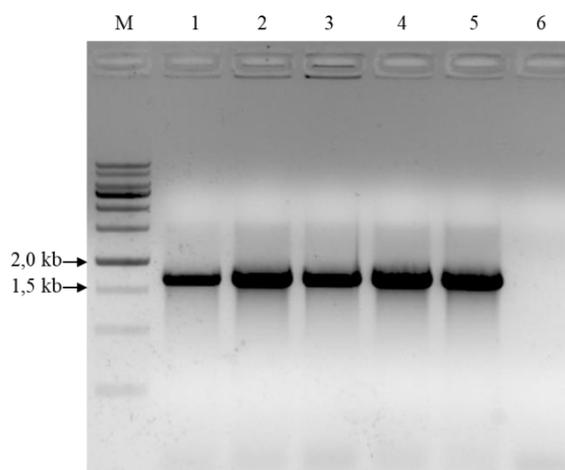


**Figura 20. Amplificação do operon *recET* a partir do genoma de *E. coli*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1 e 2: produtos de PCR provenientes da amplificação dos genes *recE* e *recT*; 3: controle negativo da reação de PCR. M: marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Sinapse Biotecnologia).



**Figura 21. Confirmação da clonagem do operon *recET* no vetor pBBR1MSC1.** (A) Mapa do vetor originado pB1-recET. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Sinapse Biotecnologia); 1: vetor intacto; 2: digestão dupla com as enzimas NdeI e BglIII; 3: digestão com a enzima EcoRI.

A bactéria *Z. mobilis* foi transformada com o vetor pB1-recET, sendo cinco transformantes selecionados aleatoriamente e submetidos à PCR de colônia, sendo confirmada a presença do *operon recET* em todos eles (Figura 22). Foram realizadas tentativas de transformar essa linhagem com o cassete de deleção contendo o Operon X digerido com as enzimas SacI e KpnI a partir do vetor pV- $\Delta$ 0976X. Contudo, não foi possível confirmar a integração no genoma de *Z. mobilis*, sendo possivelmente o tamanho do cassete de deleção um empecilho para que este evento ocorresse.



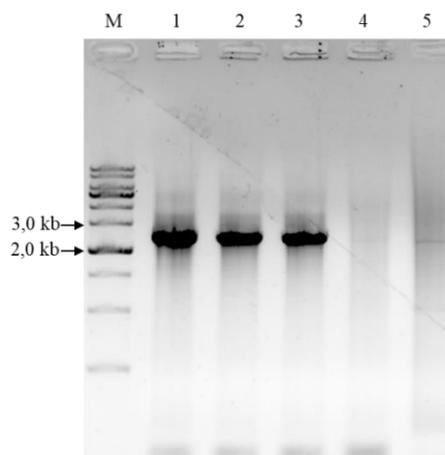
**Figura 22. PCR de colônia de transformantes de *Z. mobilis* contendo o *operon recET*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Todos os transformantes avaliados apresentaram a banda do tamanho esperado de aproximadamente 1,7 kb (1 – 5); 6: controle negativo da reação de PCR. M: marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Sinapse Biotecnologia).

#### 5.1.4 Testes de produção de ácido itacônico

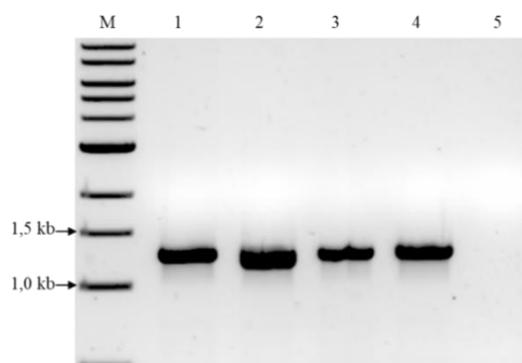
Para a produção de ácido itacônico, o vetor pB2-CAD1 foi transformado em *Z. mobilis*, sendo quatro transformantes selecionados aleatoriamente e submetidos à PCR de colônia, dos quais três apresentaram a banda referente ao gene *CAD1* de aproximadamente 2,4 kb (PCR realizada com *primers* M13) (Figura 23). Testes de produção de ácido itacônico foram conduzidos em frascos, os quais não resultaram em sua produção.

Buscando uma produção induzida, o promotor pBAD, o qual já foi utilizado em *Z. mobilis* (SKERKER *et al.*, 2013), foi testado para promover a expressão induzida do gene *CAD1*. Este promotor é regulado tanto positiva quanto negativamente pelo regulador transcricional AraC, produto do gene *araC*. Em presença de arabinose, esta se liga à proteína AraC, permitindo o início da transcrição. Em sua ausência e presença de glicose, a transcrição

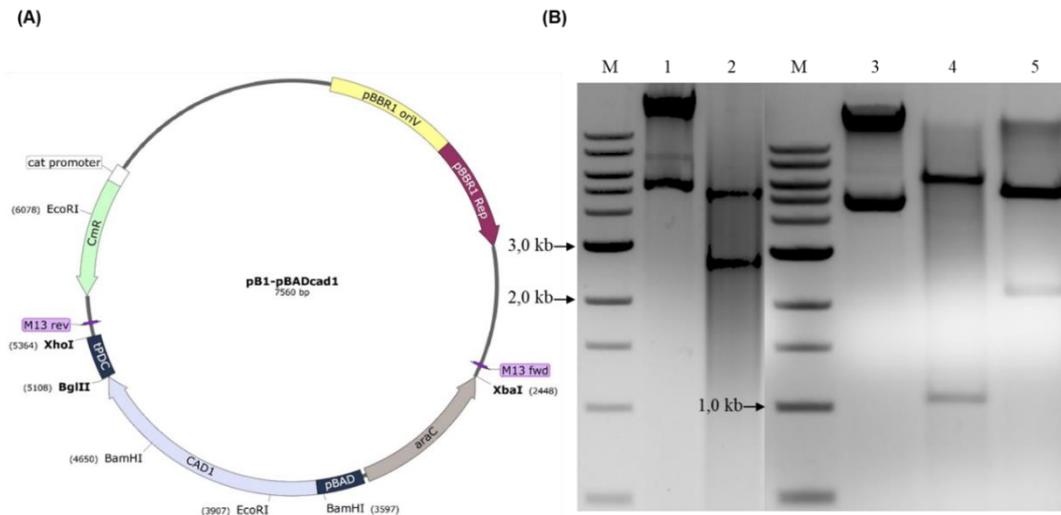
é bloqueada pelo dímero de AraC (SCHLEIF, 1992). Assim, foi construído um vetor com o gene *CAD1* sob controle do promotor pBAD. Para tanto, este, juntamente com o gene *araC*, foram amplificados a partir de um plasmídeo comercial que os continha gerando um fragmento de aproximadamente 1,2 kb (Figura 24). Este foi clonado juntamente com o gene *CAD1* como um fragmento XbaI-BglII no vetor pBBR1MCS1 contendo o terminador do gene *pdC* de *Z. mobilis* (Figura 25). Por meio da digestão dupla com essas enzimas, é gerado um fragmento de 2,7 kb, enquanto que as digestões com BamHI ou com EcoRI liberam fragmentos de 1 e 2,2 kb, respectivamente.



**Figura 23. PCR de colônia de transformantes de *Z. mobilis* contendo gene *CAD1*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Três dos transformantes avaliados apresentaram a banda do tamanho esperado de aproximadamente 2,4 kb (1 – 3); 5: controle negativo da reação de PCR. M: marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Sinapse Biotecnologia).

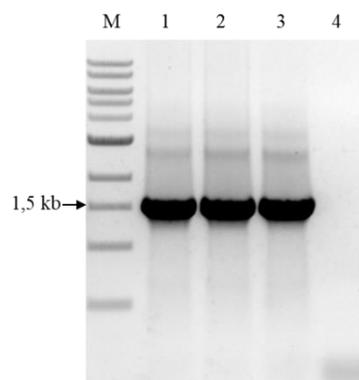


**Figura 24. Amplificação do promotor pBAD juntamente com o gene *araC*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1 – 4: produtos de PCR; 5: controle negativo da reação de PCR. M: marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder (NEB).



**Figura 25. Confirmação da clonagem do gene *CAD1* sob controle do promotor pBAD no vetor pBBR1MSC1.** (A) Mapa do vetor originado pB1-pBADcad1. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder (NEB); 1: vetor intacto; 2: digestão dupla com as enzimas XbaI e BglII; 3: vetor intacto; 4: digestão com a enzima BamHI; 5: digestão com a enzima EcoRI.

O vetor pB1-pBADcad1 foi utilizado para transformação de *Z. mobilis*, sendo três transformantes selecionados aleatoriamente e submetidos à PCR, os quais apresentaram a banda de tamanho esperado de aproximadamente 1,5 kb (Figura 26).



**Figura 26. PCR de colônia de transformantes de *Z. mobilis* contendo gene *CAD1* sob controle do promotor pBAD.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os três transformantes avaliados apresentaram a banda do tamanho esperado de aproximadamente 1,5 kb (1 – 3); 4: controle negativo da reação de PCR. M: marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder (NEB).

Embora a presença do gene *CADI* tenha sido confirmada nos transformantes, a indução com arabinose também não resultou em produção de ácido itacônico. Uma vez que *Z. mobilis* possui um incompleto TCA (BRINGER-MEYER; SAHM, 1989) e que apenas 2 – 2,6% da glicose consumida pela bactéria seja convertida a biomassa celular (ROGERS *et al.*, 1982), é possível que o baixo fluxo de carbono pelo TCA tenha dificultado a produção de ácido itacônico por este micro-organismo, uma vez que esta depende da presença do intermediário *cis*-aconitato. A engenharia metabólica de *Z. mobilis* possibilitaria o desenvolvimento de uma linhagem produtora de ácido itacônico, tendo como um dos alvos de deleção o gene *pdh*, cuja proteína é responsável pela conversão de piruvato a acetaldéido, o qual é convertido em etanol.

Para ser capaz de realizar uma eficiente engenharia metabólica em *Z. mobilis*, são necessárias ferramentas moleculares, as quais não se encontram tão desenvolvidas para esta bactéria quanto para micro-organismos modelo como *E. coli* e *S. cerevisiae*. Por exemplo, bibliotecas de promotores ainda não foram desenvolvidas para *Z. mobilis* (KALNENIEKS; PAPPAS; BETTENBROCK, 2020), sendo que só recentemente uma investigação sistemática da sequência e força de promotores foi realizada (YANG *et al.*, 2019). Assim, a maior parte dos estudos realizados até então foram baseados no uso de promotores fortes e constitutivos, não tendo sido desenvolvido um conjunto de promotores induzíveis capazes de controlar a expressão gênica em *Z. mobilis* (KALNENIEKS; PAPPAS; BETTENBROCK, 2020).

Além disso, enquanto que para organismos-modelo como *E. coli* há uma variedade de plasmídeos com diferentes origens de replicação, número de cópias e grupos de compatibilidade, para *Z. mobilis* só há um conjunto limitado de vetores disponíveis. Portanto, ainda faltam estudos acerca do número de cópias, compatibilidade e estabilidade de plasmídeos em diferentes linhagens de *Z. mobilis* para o uso de métodos moleculares para sua engenharia metabólica. A deleção de genes para esta bactéria também tem se mostrado trabalhosa, geralmente envolvendo a construção de cassetes com regiões de homologia ao genoma do local a ser deletado e clonagem em vetores suicidas, processo que tem se mostrado ineficiente (KALNENIEKS; PAPPAS; BETTENBROCK, 2020). O uso do sistema recET já foi empregado em *Z. mobilis*, permitindo a eletroporação de produtos de PCR e diminuindo o comprimento dos braços de homologia (WU *et al.*, 2017). Recombinases como a FLP (*flippase*) também já foram introduzidas nesta bactéria, levando à cura de marcas de seleção flanqueadas por sítios FRT (*flippase recognition target*) (ZOU *et al.*, 2012). Embora os métodos mencionados sejam promissores, ainda são necessários mais estudos para aplicação

bem sucedida destas técnicas visando à engenharia metabólica de *Z. mobilis*, (KALNENIEKS; PAPPAS; BETTENBROCK, 2020). Dessa forma, ainda que *Z. mobilis* apresente potencial para a produção de combustíveis e químicos, as ferramentas genéticas disponíveis atualmente precisam ser melhoradas para que este potencial possa ser utilizado na produção de produtos de alto valor agregado (AGRAWAL; DUNN; RAO, 2017).

## Capítulo II

Para o desenvolvimento de uma linhagem de *Z. mobilis* produtora de ácido xilônico, foi realizada a avaliação de sete genes codificadores de XDH de forma a selecionar aquele que resultasse em uma melhor produção deste composto. Assim, foram construídos vetores de expressão e realizados testes iniciais em frasco para a seleção do melhor gene. Também foi construído um vetor contendo o gene codificador da enzima xilonolactonase de *P. xenovorans* na forma de um *operon* com o gene XDH selecionado, buscando melhoria na produção de ácido xilônico, como relatado na literatura. Ainda é relatado neste capítulo deleções gênicas como uma abordagem da engenharia metabólica para remoção de vias que competem pelo substrato (LEE et al., 2012), assim como as fermentações realizadas em biorreator em meio complexo e hidrolisado de cana-de-açúcar utilizando a linhagem selecionada. Por fim, com o objetivo de otimizar a produção de ácido xilônico, o gene *xylE* de *E. coli*, que codifica para um transportador de xilose, foi expresso em *Z. mobilis* na sua forma selvagem ou portando mutações selecionadas de forma a minimizar a competição do transportador com a glicose.

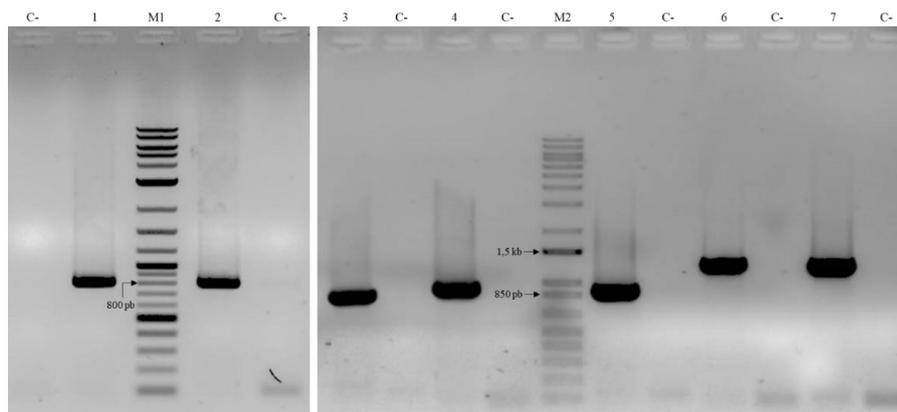
### 5.2 Produção de ácido xilônico por *Z. mobilis*

Como discutido, *Z. mobilis* tem o potencial de estabelecer novas plataformas para a produção de diferentes moléculas de interesse biotecnológico, possuindo um importante papel na substituição de produtos petroquímicos (HE et al., 2014). Essas moléculas incluem os ácidos aldônicos, como o ácido xilônico, o qual pode ser produzido pela enzima periplasmática de *Z. mobilis* glicose-frutose oxirredutase (GFOR). Esta enzima é responsável pela conversão de frutose e glicose a sorbitol e gliconolactona (ZACHARIOU; SCOPES, 1986), respectivamente, mas também apresenta afinidade pela xilose, convertendo 42% deste açúcar a ácido xilônico na presença de frutose (SATORY et al., 1997). Para melhorar este rendimento, a expressão heteróloga de um gene codificador de xilose desidrogenase pode ser realizada de forma a otimizar a produção de ácido xilônico por *Z. mobilis*.

#### 5.2.1 Construção de vetores de expressão para os genes XDH

A produção de ácido xilônico por micro-organismos requer a expressão de um único gene, cuja proteína codificada apresenta atividade de xilose desidrogenase (XDH), convertendo este substrato em xilonolactona, a qual sofre conversão espontânea a ácido xilônico. Para avaliar a habilidade de *Z. mobilis* na produção deste ácido orgânico, foram testados sete genes codificadores de XDH, incluindo um gene controle (CC) de *C. crescentus*,

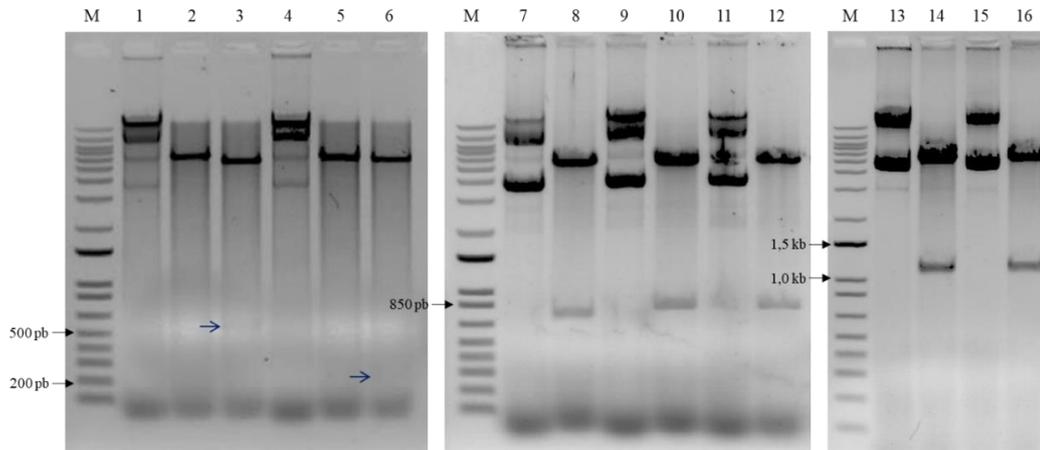
o qual é amplamente utilizado na engenharia metabólica de micro-organismos para a produção de ácido xilônico. Estes genes foram sintetizados *de novo* e clonados em vetores pMA-T, os quais foram utilizados como moldes para a reação de PCR dos genes de interesse. Os oligonucleotídeos utilizados para estas amplificações estão apresentados na Tabela 6. A Figura 27 exhibe essas amplificações, as quais apresentaram a banda de tamanho esperado para cada um dos genes.



**Figura 27. Amplificação dos genes XDH.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio exibindo a amplificação dos genes XDH. (1) gene HL (771 pb); (2) gene BS (759 pb); (3) gene CC (747 pb); (4) gene AP (825 pb); (5) gene BX (807 pb); (6) gene TM (1176 pb); (7) gene TR (1176 pb). C-: controle negativo das reações de PCR. M1: marcador de massa molecular *2-Log DNA Ladder* (NEB). M2: marcador de massa molecular *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

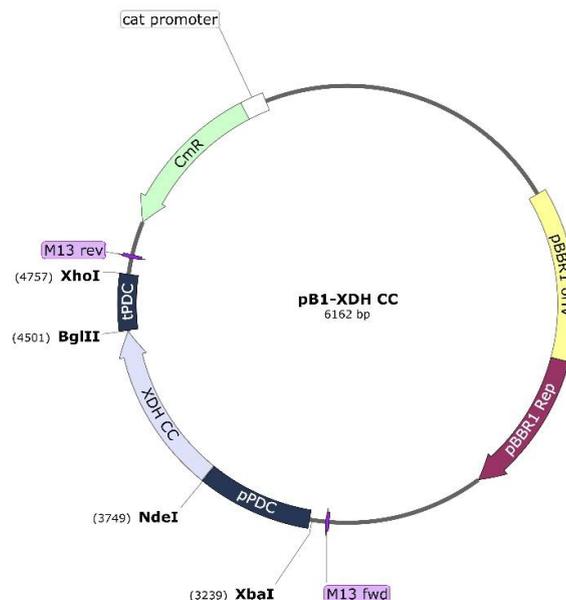
Após a amplificação dos fragmentos de interesse e de suas purificações, estes foram clonados por homologia no vetor pBBR1MCS1 contendo o promotor e o terminador do gene *pdc* de *Z. mobilis* digerido com as enzimas NdeI e BglII. As confirmações das clonagens realizadas por digestão estão apresentadas na Figura 28. Uma vez que os genes BS e HL apresentam um sítio de restrição da enzima BglII em suas sequências, a confirmação da clonagem destes foi realizada digerindo o vetor com as enzimas BglII e NdeI separadamente. A construção dos demais vetores foram confirmados por digestão dupla com as enzimas citadas. Como exemplo, o mapa de restrição do vetor pB1-XDH CC, o qual contém o gene CC, está apresentado na Figura 29, sendo que os demais mapas se encontram disponíveis no Apêndice 8.1. Posteriormente à confirmação das clonagens, os vetores de expressão foram transformados na linhagem de *E. coli* JM110 (*dam<sup>-</sup> dcm<sup>-</sup>*) a fim de desmetilar o DNA. Esta etapa é necessária uma vez que *Z. mobilis* possui uma endonuclease pertencente ao sistema de

restrição do tipo IV (KERR *et al.*, 2011) que possui como alvo sequências de DNA que apresentam modificações como metilação.



**Figura 28. Confirmação das clonagens dos genes XDH no vetor pBBR1MCS1.**

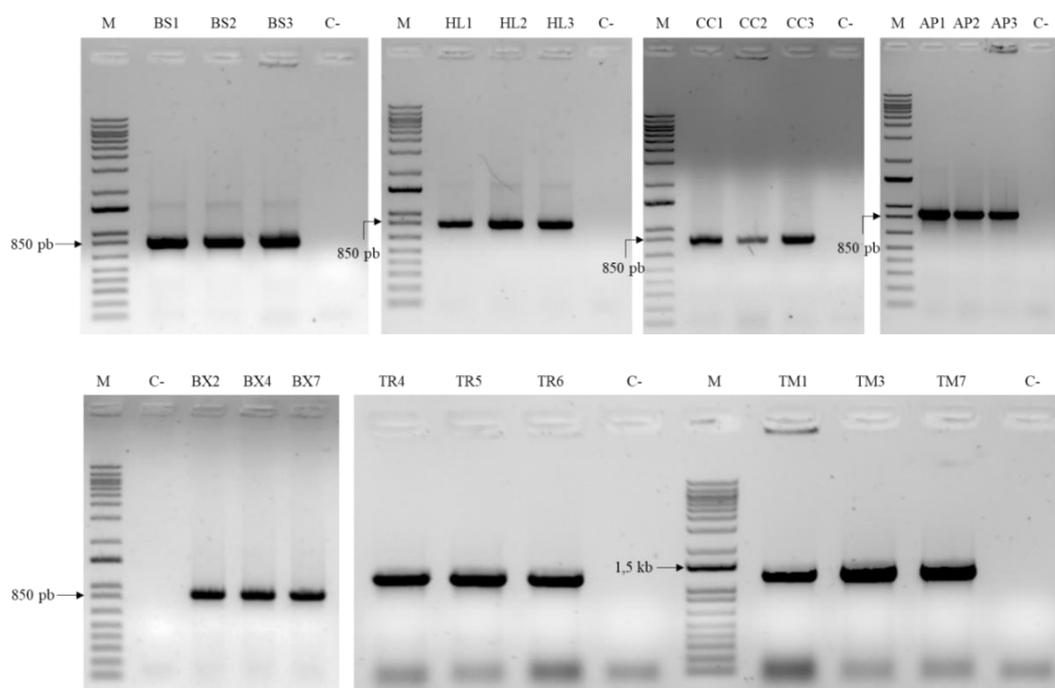
Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio apresentando a digestão dos vetores contendo os genes XDH. (1) pB1-XDH BS intacto e digestões com NdeI (2) e BglII (3); (4) pB1-XDH HL intacto e digestões com NdeI (5) e BglII (6); (7) pB1-XDH CC intacto e digerido com NdeI e BglII (8); (9) pB1-XDH AP intacto e digerido com NdeI e BglII (10); (11) pB1-XDH BX intacto e digerido com NdeI e BglII (12); (13) pB1-XDH TR intacto e digerido com NdeI e BglII (14); (15) pB1-XDH TM intacto e digerido com NdeI e BglII (16); M: marcador de massa molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).



**Figura 29. Mapa de restrição do vetor pB1-XDH CC.** A clonagem de todos os genes XDH foi realizada utilizando-se os sítios de restrição NdeI e BglII.

### 5.2.2 Produção de ácido xilônico por *Z. mobilis* expressando genes XDH

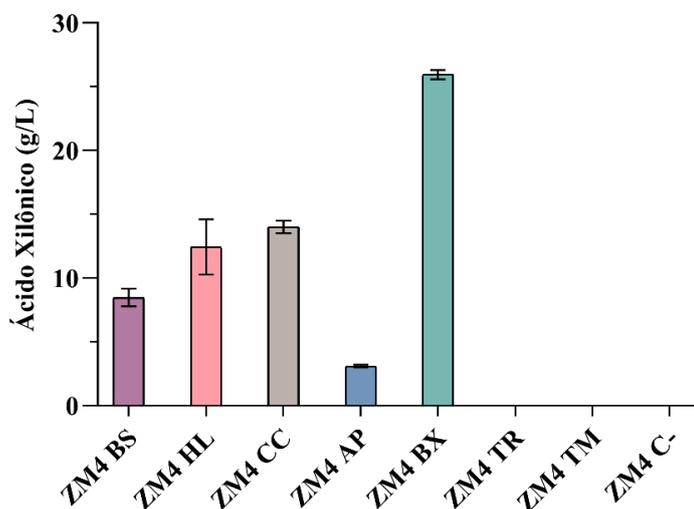
Os vetores de expressão contendo os sete diferentes genes XDH foram transformados em *Z. mobilis* ZM4, sendo obtidos transformantes para todos eles. Para a confirmação da presença de cada um dos genes nos transformantes, três colônias de cada transformação foram selecionadas randomicamente e submetidas à PCR de colônia. Os *primers* utilizados para esta confirmação foram os mesmos empregados na amplificação dos genes XDH e estão presentes na Tabela 6. O resultado da PCR de colônia está apresentado na Figura 30, sendo que todos os transformantes avaliados apresentaram a banda correspondente a cada um dos genes.



**Figura 30. PCR de colônia de transformantes de *Z. mobilis* contendo os genes XDH.** Todos os transformantes avaliados apresentaram a banda do tamanho esperado correspondente aos genes: BS - 759 pb; HL - 771 pb; CC - 747 pb; AP - 825 pb; BX - 807 pb; TM - 1176 pb; TR - 1176 pb. C-: controle negativo da reação de PCR. M: marcador de massa molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

A seguir, a produção do ácido xilônico foi avaliada em frascos, sendo selecionados de forma randômica os seguintes clones para o teste: BS3, HL2, CC2, AP2, BX7, TR5 e TM3. As linhagens geradas de *Z. mobilis* foram denominadas, respectivamente, de ZM4 BS, ZM4 HL, ZM4 CC, ZM4 AP, ZM4 BX, ZM4 TR e ZM4 TM. A comparação da produção de ácido xilônico dentre as linhagens expressando os diferentes genes ao fim de 48h de cultivo está

apresentada na Figura 31. A Tabela 10 apresenta a produção e produtividade alcançadas por cada uma das linhagens.



**Figura 31. Produção de ácido xilônico por *Z. mobilis* expressando diferentes genes XDH.** A fermentação foi realizada em frascos por 48 h a 30 °C em meio RM contendo 50 g L<sup>-1</sup> de xilose.

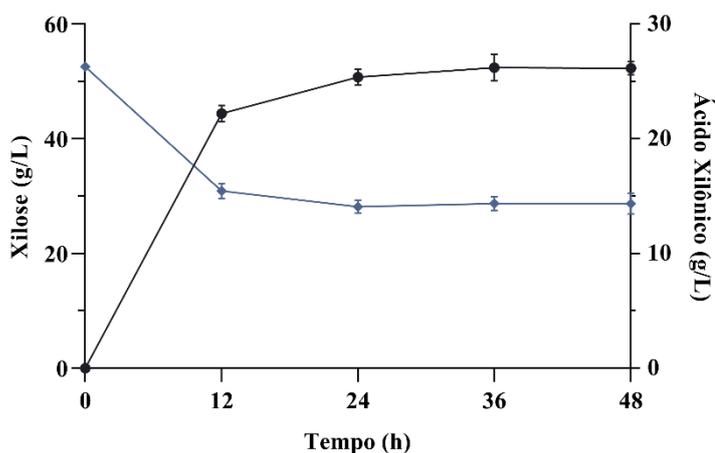
**Tabela 10.** Produção e produtividade de ácido xilônico alcançado por *Z. mobilis* expressando diferentes genes XDH.

Linhagem	Ácido xilônico	
	Produção (g L <sup>-1</sup> )	Produtividade (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )*
ZM4 CC	14.01 ± 0.70	0.96 ± 0.03
ZM4 BS	8.47 ± 0.97	0.63 ± 0.02
ZM4 HL	12.45 ± 3.05	0.88 ± 0.11
ZM4 AP	3.10 ± 0.20	0.240 ± 0.01
ZM4 BX	26.17 ± 0.58	1.85 ± 0.06
ZM4 TR	n.d.	n.d.
ZM4 TM	n.d.	n.d.
ZM4 C-	n.d.	n.d.

n.d.: não detectado.

\*: calculada durante a fase exponencial de produção.

A expressão de cinco genes XDH procarióticos resultou em diferentes níveis de produção de ácido xilônico. Contudo, as linhagens de *Z. mobilis* que expressaram os dois genes eucarióticos, TR e TM, não produziram quantidades detectáveis do ácido orgânico, e assim não foram, mais utilizados neste trabalho. De forma notória, a linhagem ZM4 BX, a qual expressa o gene XDH de *P. xenovorans*, exibiu uma produção de aproximadamente 87% maior quando comparada à linhagem controle ZM4 CC. A bactéria *Z. mobilis* expressando o gene BX foi capaz de produzir  $26,17 \pm 0,58 \text{ g L}^{-1}$  de ácido xilônico com um rendimento de  $1,04 \pm 0,04 \text{ g}_{\text{AX}}/\text{g}_{\text{X}}$ , o qual representa 93,7% do rendimento máximo teórico, mostrando que quase toda xilose consumida foi convertida em ácido xilônico. Neste experimento, após 24 h de cultivo, não houve mais produção de ácido xilônico ou consumo de xilose significativos (Figura 32), restando ainda cerca de  $30 \text{ g L}^{-1}$  do substrato no meio. Este fato possivelmente é devido à acidificação deste, uma vez que o meio não foi tamponado e o pH final após 48 h atingiu  $3,00 \pm 0,13$  para a linhagem ZM4 BX.



**Figura 32. Produção de ácido xilônico (círculo azul escuro) e consumo de xilose (losango azul claro) pela linhagem de ZM4 BX ao longo do tempo.** Esta foi cultivada em frascos contendo  $50 \text{ g L}^{-1}$  de xilose a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A produtividade de  $1,85 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  alcançada pela linhagem ZM4 BX também é notável, sendo maior que aquela observada para outros micro-organismos modificados para a produção de ácido xilônico descritos na literatura (Tabela 11). Por exemplo, a engenharia metabólica de *S. cerevisiae* para esta produção levou a levedura a atingir produtividades de  $36 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (TOIVARI *et al.*, 2010) e  $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (TOIVARI *et al.*, 2012b) ao expressar o gene *xyd1* de *T. reesei* e coexpressar os genes *xylB* e *xylC* de *C. crescentus*, respectivamente. Bactérias como *E. coli* e *C. glutamicum* também já foram modificadas para a produção de

ácido xilônico. Uma linhagem de *E. coli* expressando o gene *xylB* de *C. crescentus* atingiu uma produtividade de 1,09 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (LIU *et al.*, 2012), e linhagens de *C. glutamicum* expressando o mesmo gene alcançou produtividades de 1,02 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (YIM *et al.*, 2017) e 0,93 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (SUNDAR *et al.*, 2020). Um valor similar à produtividade de *Z. mobilis* (1,8 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) também foi encontrado para duas linhagens de *E. coli* modificadas para a produção de ácido xilônico (CAO *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2019). A melhor produtividade descrita até então foi alcançada por uma linhagem de *E. coli* expressando o gene *xylB* de *C. crescentus*, a qual ainda continha circuitos proteicos, o que levou à produtividade de 7,12 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (GAO *et al.*, 2019), ressaltando o relevante uso da biologia sintética na engenharia metabólica de micro-organismos. Tendo apresentado a melhor produção e produtividade, a linhagem ZM4 BX foi escolhida para dar continuidade ao trabalho.

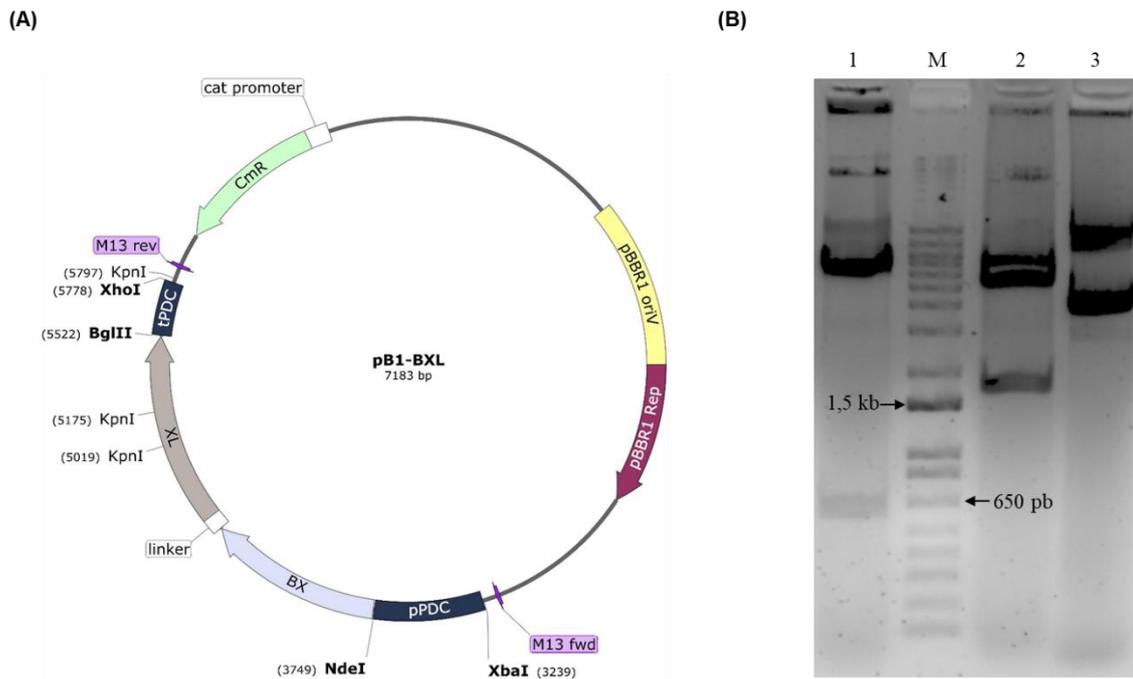
**Tabela 11.** Comparativo da produtividade volumétrica alcançada por micro-organismos modificados para a produção de ácido xilônico.

Micro-organismo	Genes expressos	Produtividade (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Referência
<i>S. cerevisiae</i>	<i>xyd1</i> ( <i>T. reesei</i> )	0,036	(TOIVARI <i>et al.</i> , 2010)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>xylB</i> ( <i>C. crescentus</i> ) <i>xylC</i> ( <i>C. crescentus</i> )	0,23 0,24 (+ <i>xylC</i> )	(TOIVARI <i>et al.</i> , 2012b)
<i>E. coli</i>	<i>xylB</i> ( <i>C. crescentus</i> )	1,09	(LIU <i>et al.</i> , 2012)
<i>E. coli</i>	<i>xylB</i> + <i>xylC</i> ( <i>C. crescentus</i> )	1,80	(CAO <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. glutamicum</i>	<i>xylB</i> ( <i>C. crescentus</i> ) <i>xylE</i> ( <i>E. coli</i> )	1,02	(YIM <i>et al.</i> , 2017)
<i>E. coli</i>	<i>xylB</i> + <i>xylC</i> ( <i>C. crescentus</i> )	1,80	(ZHANG <i>et al.</i> , 2019)
<i>E. coli</i>	<i>xylB</i> ( <i>C. crescentus</i> )	7,12	(GAO <i>et al.</i> , 2019)
<i>C. glutamicum</i>	<i>xylB</i> ( <i>C. crescentus</i> )	0,93	(SUNDAR <i>et al.</i> , 2020)
<i>Z. mobilis</i>	XDH ( <i>P. xenovorans</i> )	1,85	Este trabalho.

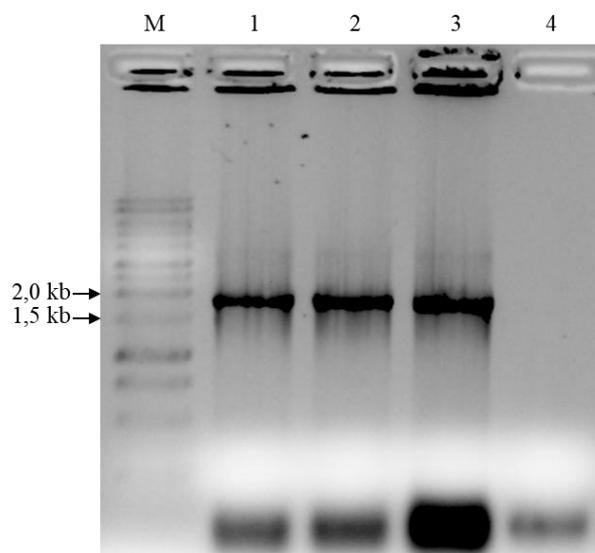
### 5.3 Coexpressão dos genes XDH e XL

Embora a produção de ácido xilônico seja possibilitada somente com a expressão do gene XDH uma vez que a xilonolactona, produto da atividade desta enzima, sofre desidratação espontânea para formar o ácido orgânico, a coexpressão de um gene codificador da enzima xilonolactonase (XL) poderia melhorar a produção, conforme já descrito para *E. coli* (CAO *et al.*, 2013). Assim, o gene codificador de XL de *P. xenovorans* foi expresso na linhagem ZM4 BX.

Primeiramente, este gene foi sintetizado e clonado no sítio de BglII do vetor pB1-XDH BX, formando um *operon* com o gene BX, dando origem ao vetor pB1-BXL. A confirmação desta clonagem está apresentada na Figura 33, sendo que a digestão com a enzima KpnI gera um fragmento de 600 pb e outro de aproximadamente 150 pb, o qual não é possível de ser visualizado no gel de agarose devido ao seu pequeno tamanho. Ainda, a digestão dupla com as enzimas NdeI e BglII gera um fragmento de 1,8 kb correspondente aos dois genes. Este vetor foi transformado em *Z. mobilis*, sendo três transformantes selecionados aleatoriamente e submetidos à PCR de colônia com *primers* que se anelam no início do gene BX e no terminador do gene *pdv* presente no plasmídeo. Esta amplificação resulta em uma banda de aproximadamente 1,8 kb, a qual foi apresentada pelos três transformantes avaliados (Figura 34).

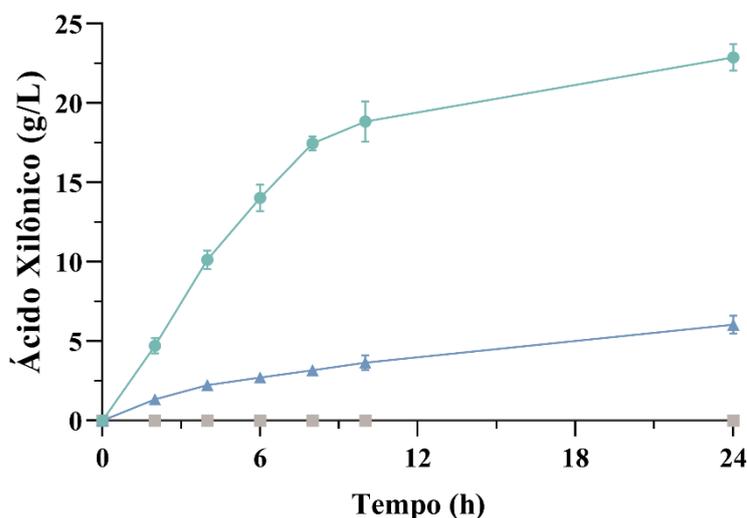


**Figura 33. Mapa de restrição do vetor pB1-BXL (A) e confirmação da sua construção (B).** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1: vetor pB1-BXL digerido com a enzima KpnI; 2: digestão dupla com as enzimas NdeI e BglII; 3: vetor pB1-BXL intacto; (M) *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).



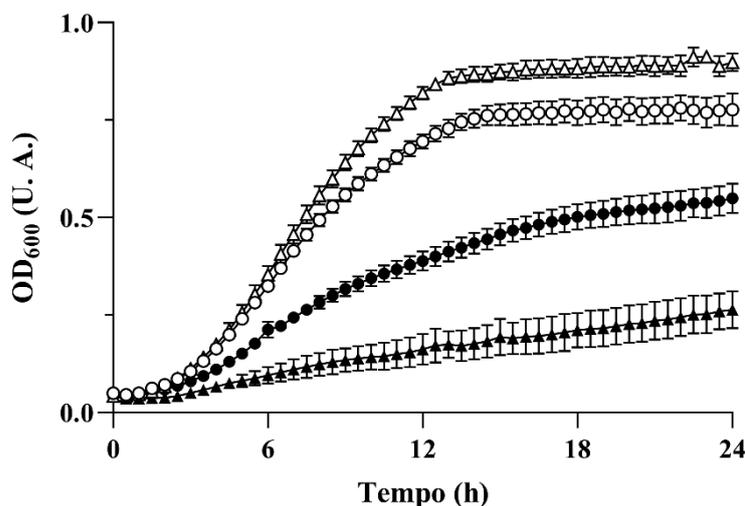
**Figura 34. PCR de colônia de transformantes de *Z. mobilis* contendo o operon com os genes BX e XL.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os três transformantes avaliados apresentaram a banda do tamanho esperado de aproximadamente 1,8 kb (1 – 3); 4: controle negativo da reação de PCR. M: marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder (Promega).

A linhagem coexpressando os genes BX e XL (ZM4 BXL) foi avaliada para a produção de ácido xilônico, sendo que esta, surpreendentemente, foi prejudicada nesta linhagem, como mostrado na Figura 35. Enquanto que a linhagem ZM4 BX foi capaz de produzir neste experimento  $22,88 \pm 0,83 \text{ g L}^{-1}$  de ácido xilônico após 24 h de cultivo, ZM4 BXL produziu somente  $6,06 \pm 0,57 \text{ g L}^{-1}$ . Um resultado similar foi observado em uma linhagem modificada de *C. glutamicum* coexpressando os genes *xylB* (xilose desidrogenase) e *xylC* (xilonolactonase) de *C. crescentus*, a qual produziu  $5,86 \text{ g L}^{-1}$  de ácido xilônico comparado a  $20,04 \text{ g L}^{-1}$  produzidos pela linhagem apenas expressando o gene *xylB* (YIM *et al.*, 2017). Uma vez que a XL catalisa a abertura do anel da lactona para a forma linear do ácido xilônico, é possível que o pH intracelular tenha diminuído muito rapidamente. Em um estudo com uma linhagem modificada de *S. cerevisiae* produtora de ácido xilônico (NYGÅRD *et al.*, 2014), foi demonstrado que a coexpressão dos genes *xylB* e *xylC* de *C. crescentus* realmente leva a uma rápida diminuição no pH intracelular para menor que 5, comparado com a linhagem apenas expressando *xylB*, tendo como consequência uma redução na taxa de crescimento específico e morte celular. Este fato poderia explicar o baixo desempenho de *Z. mobilis* expressando os dois genes.



**Figura 35. Comparativo da produção de ácido xilônico entre as linhagens ZM4 BX (círculos verdes), ZM4 BXL (triângulos azuis) e ZM4 C- (quadrados cinzas). As linhagens foram cultivadas em frascos com meio RM contendo  $50 \text{ g L}^{-1}$  de xilose a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .**

Visando à confirmação da diminuição da taxa de crescimento específico devido à expressão de XL na presença de xilose no meio, as linhagens ZM4 BX e ZM4 BXL foram cultivadas em meio RM contendo somente glicose ou glicose com xilose. Os resultados mostram que a linhagem expressando os dois genes cresce menos que a ZM4 BX na presença de xilose (Figura 36). Quando crescida somente em glicose, a linhagem ZM4 BXL apresenta um melhor crescimento, com uma taxa de crescimento específico máximo de  $0,47 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$  comparado com  $0,38 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  da linhagem ZM4 BX. Quando a xilose estava presente no meio, a taxa de crescimento específico máximo apresentada por ZM4 BXL foi de  $0,14 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$ , 55% menos que a ZM4 BX ( $0,31 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ). Assim, devido aos efeitos negativos no crescimento celular, o gene XL não foi mais empregado neste trabalho.



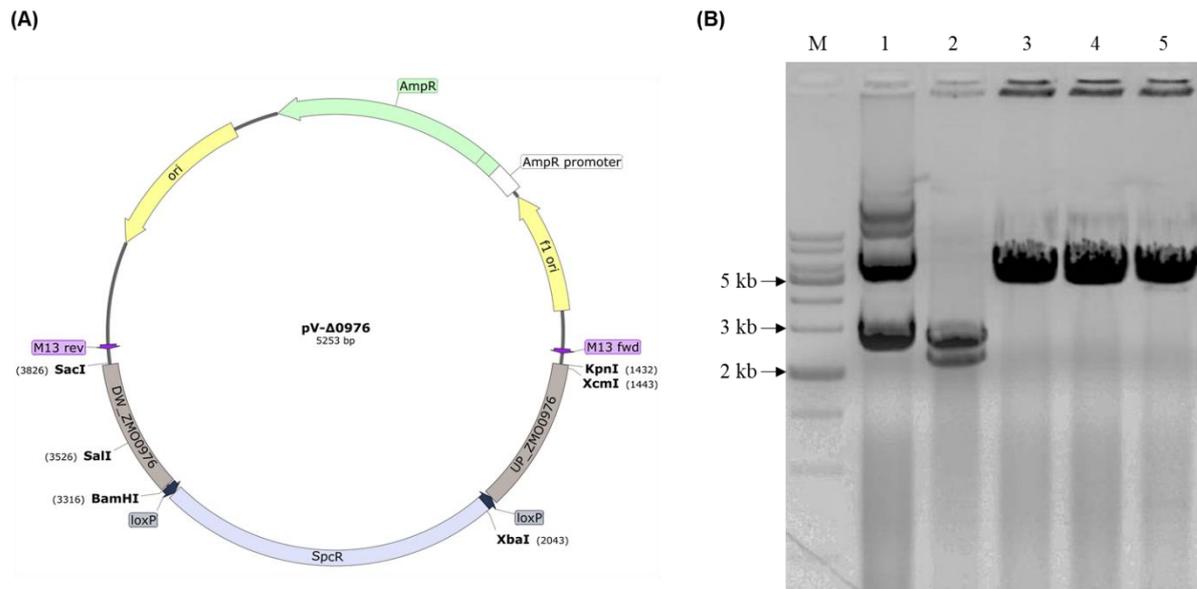
**Figura 36. Comparação do crescimento das linhagens ZM4 BX e ZM4 BXL em glicose ou glicose com xilose.** Triângulos abertos: ZM4 BXL em glicose; círculos abertos: ZM4 BX em glicose; triângulos fechados: ZM4 BXL em glicose e xilose; círculos fechados: ZM4 BX em glicose e xilose.

#### 5.4 Construção dos cassetes de deleção e vetores de expressão

Visando à otimização do processo de produção de ácido xilônico, dois genes foram selecionados como alvo de deleção. Um deles é o gene ZMO0976 que codifica uma aldo-ceto redutase, cuja a atividade sobre xilose, além de competir por este substrato, converte esta em xilitol, um composto tóxico para as células (YANG *et al.*, 2014a). Para reduzir a formação de outros subprodutos, o gene ZMO1237, codificador da enzima lactato desidrogenase, também foi escolhido como alvo de deleção. Esta enzima produz lactato a partir de piruvato principalmente em aerobiose (YANG *et al.*, 2009b), condição que beneficiaria a produção de ácido xilônico devido à reciclagem de cofatores utilizados pelas XDH pela cadeia respiratória. Assim, o gene ZMO1237 foi escolhido porque a produção de lactato a partir da glicose poderia afetar na formação de biomassa.

Para a deleção dos genes alvo, cassetes de deleção foram construídos contendo o gene de resistência a espectinomicina flanqueado por sítios *loxP* para posterior remoção da marca. Para a integração deste gene de resistência com concomitante deleção do gene de interesse, utilizou-se a maquinaria de recombinação homóloga da célula. Assim, além do gene de resistência a antibiótico, os cassetes de deleção foram construídos de forma a possuírem aproximadamente 500 pb de homologia com a localização desejada no genoma em suas extremidades. Os cassetes de deleção foram construídos no vetor pPCV, cuja replicação não é possível em *Z. mobilis*, uma vez que sua origem de replicação não é funcional nesta bactéria.

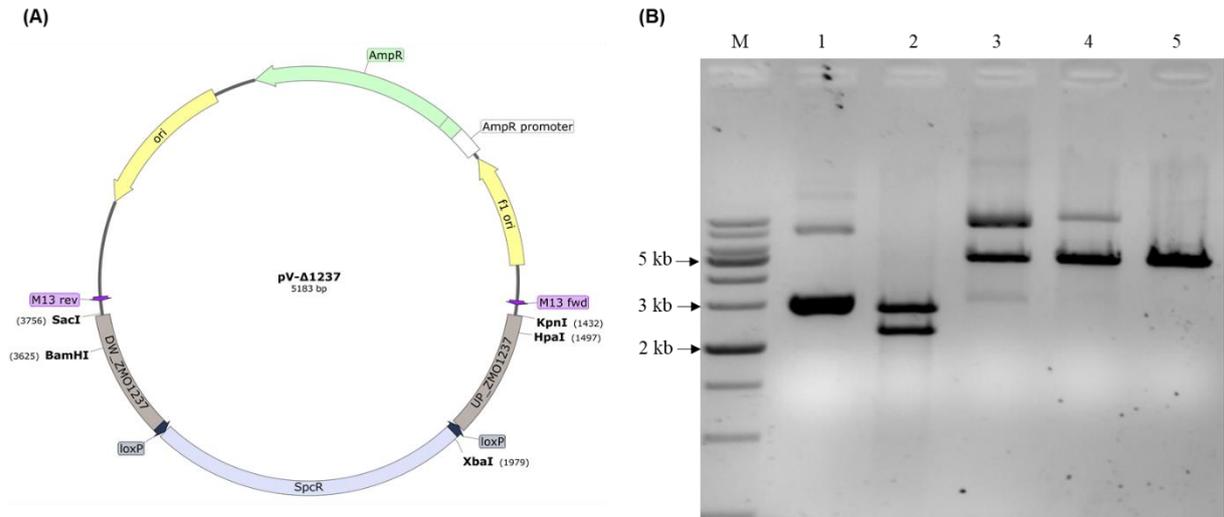
Para a deleção do gene ZMO0976, foi construído o vetor pV- $\Delta$ 0976, o qual contém o gene de resistência a espectinomicina flanqueado por sítios *loxP*, sendo este também flanqueado por braços de homologia ao genoma. A Figura 37 mostra a análise de restrição deste vetor para a confirmação da sua construção. A digestão com as enzimas XcmI, XbaI e SalI linearizam o vetor construído ao digeri-lo no fragmento *upstream* ao gene ZMO0976, no gene de resistência à espectinomicina e no fragmento *downstream* ao gene ZMO0976, respectivamente.



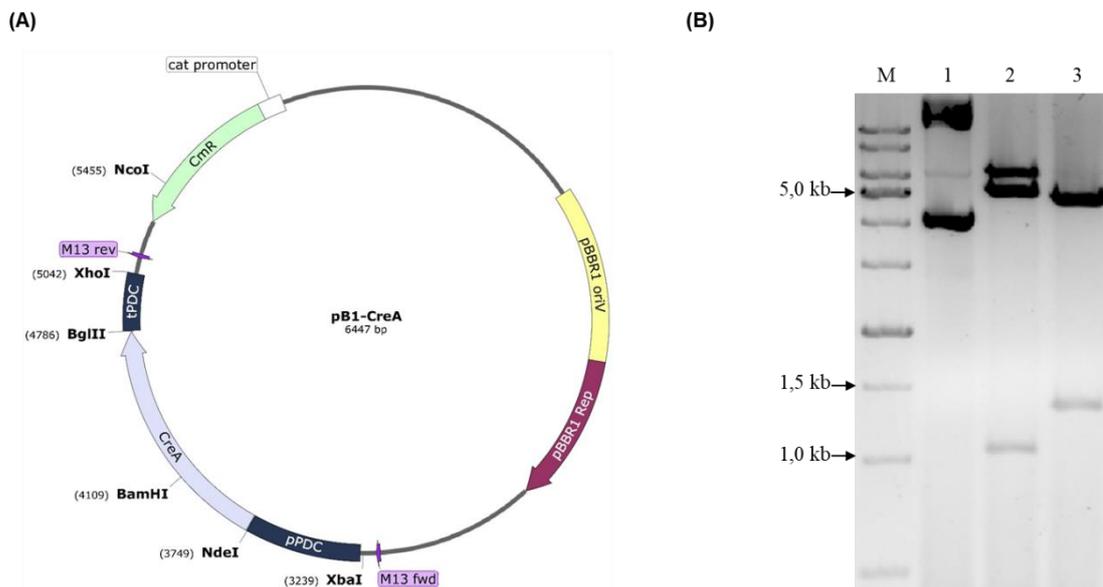
**Figura 37. Confirmação da construção do vetor pV- $\Delta$ 0976 contendo o cassete de deleção para o gene ZMO0976.** (A) Mapa de restrição do vetor construído. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio: 1: vetor intacto; 2: digestão dupla com as enzimas com SacI e KpnI; 3: digestão com XcmI; 4: digestão com XbaI; 5: digestão com SalI; M: marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Sinapse Biotecnologia).

O vetor pV- $\Delta$ 1237, utilizado para a deleção do gene ZMO1237, foi construído da mesma maneira, sendo sua construção confirmada pela análise de restrição apresentada na Figura 38. Da mesma maneira do que para o vetor pV- $\Delta$ 0976, a dupla digestão com as enzimas SacI e KpnI gera fragmentos de aproximadamente 2,4 e 2,9 kb, correspondentes ao cassete de deleção e vetor, respectivamente. Já a digestão com as enzimas HpaI, XbaI e BamHI linearizam o vetor construído ao digeri-lo no fragmento *upstream* ao gene ZMO1237, no gene de resistência à espectinomicina e no fragmento *downstream* ao gene ZMO1237, respectivamente.

Ainda, a utilização do sistema Cre-loxP requer a expressão do gene da recombinase Cre. Este foi amplificado a partir do vetor pYRCre2 (BETANCUR *et al.*, 2017), sendo então clonado no vetor pBBR1MCS1 contendo o promotor e terminador do gene *pdv* como um fragmento Nde-BglIII. O vetor resultante foi denominado pB1-CreA, sendo a confirmação da sua clonagem apresentada na Figura 39. A digestão com as enzimas citadas libera o gene da Cre, cujo tamanho aproximado é de 1 kb. Já a digestão com as enzimas BamHI e NcoI libera um fragmento de 1,3 kb.



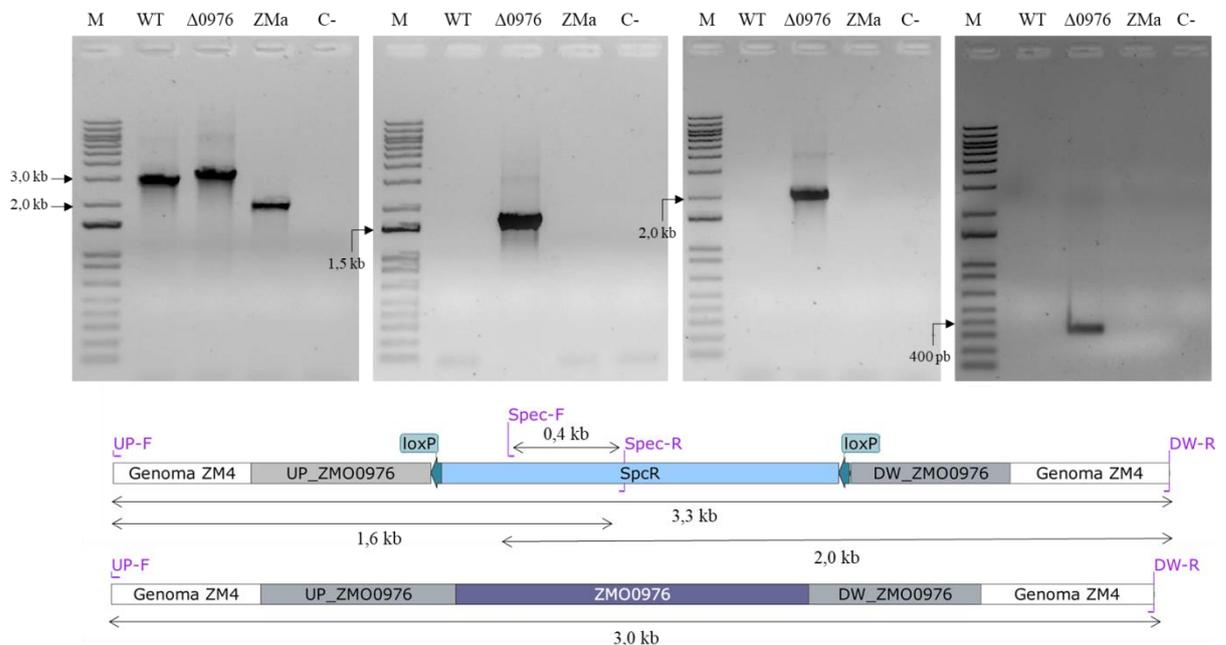
**Figura 38. Confirmação da construção do vetor pV- $\Delta$ 1237 contendo o cassete de deleção para o gene ZMO1237.** (A) Mapa de restrição do vetor construído. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio: 1: vetor intacto; 2: digestão dupla com as enzimas com SacI e KpnI; 3: digestão com HpaI; 4: digestão com XbaI; 5: digestão com BamHI; M: marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Sinapse Biotecnologia).



**Figura 39. Confirmação da construção do vetor pB1-CreA para expressão da recombinase Cre.** (A) Mapa de restrição do vetor construído. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio: 1: vetor intacto; 2: digestão dupla com as enzimas NdeI e BglIII; 3: digestão dupla com as enzimas BamHI e NcoI; M: marcador de massa molecular 1 kb ladder (Sinapse Biotecnologia).

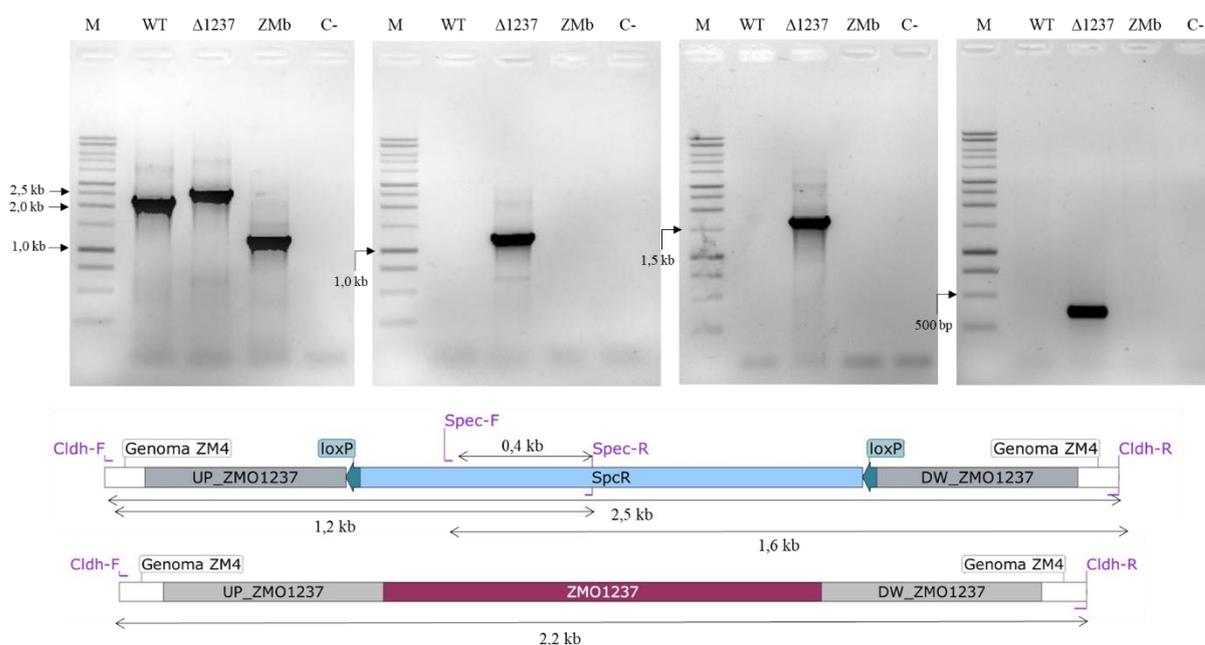
## 5.5 Deleções gênicas

Para a deleção do gene ZMO0976, o vetor pV- $\Delta$ 0976 foi transformado em *Z. mobilis* após sua desmetilação, sendo feita a seleção em espectinomicina. Transformantes foram avaliados por meio de PCR de colônia para a confirmação da deleção. Após esta, um dos transformantes foi selecionado para a remoção da marca de deleção por meio do sistema Cre-*loxP*. A Figura 40 mostra as confirmações realizadas por meio de PCR a partir de DNA genômico. A amplificação do *locus* selvagem utilizando os *primers* UP-F e DW-R, que se anelam no genoma de *Z. mobilis* fora da região de integração, resulta em uma banda de tamanho aproximado de 3 kb, sendo que após a integração do gene de resistência à espectinomicina, é obtida uma banda de aproximadamente 3,3 kb. Após a remoção da marca, a amplificação com estes mesmos *primers* resulta em uma banda de cerca de 2 kb. Também foram utilizados *primers* internos ao cassete de deleção que se anelam no gene de resistência à espectinomicina, denominados Spec-F e Spec-R. A utilização destes resulta em amplificação somente na linhagem com o gene deletado antes da remoção da marca de seleção, sendo obtida uma banda de 400 pb ao se empregar este par. Utilizando-se os *primers* UP-F e Spec-R, é obtida uma banda de 1,6 kb, e uma banda de 2,0 kb é resultante da amplificação com os *primers* Spec-F e DW-R.



**Figura 40. Confirmação da deleção do gene ZMO0976 e remoção da marca de seleção.** WT: *Z. mobilis* selvagem;  $\Delta$ 0976: linhagem com o gene ZMO0976 deletado; ZMa: linhagem com o gene ZMO0976 deletado e com a marca de seleção removida; C-: controle negativo da reação de PCR; M: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

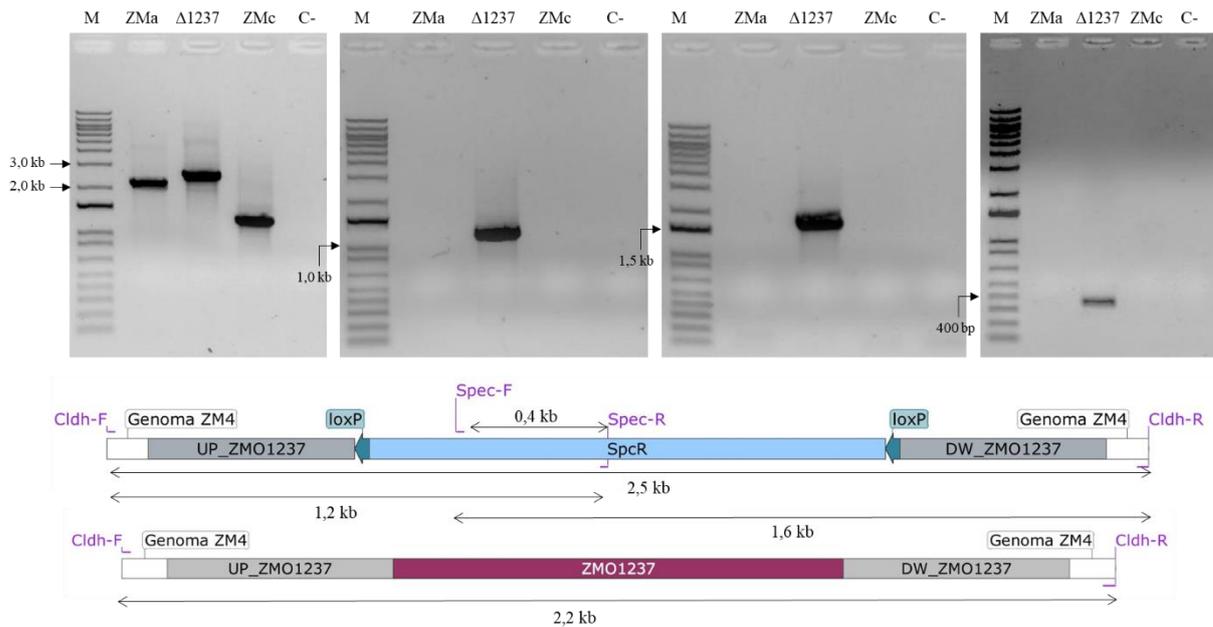
O mesmo foi realizado para a deleção do gene ZMO1237, sendo *Z. mobilis* transformada com o vetor pV- $\Delta$ 1237. A amplificação do locus *ldh* selvagem utilizando os primers Cldh-F e Cldh-R, que se anelam no genoma de *Z. mobilis* fora da região de integração, resulta em uma banda de aproximadamente 2,2 kb, sendo que após a integração do gene de resistência à espectinomicina, é obtida uma banda de 2,5 kb. Após a remoção da marca, a amplificação com estes mesmos primers resulta em uma banda de cerca de 1,2 kb. Os primers internos ao cassette de deleção Spec-F e Spec-R também foram utilizados, sendo obtida a banda de 400 pb ao se empregar este par. Utilizando-se os primers Cldh-F e Spec-R, é obtida uma banda de 1,2 kb, e uma banda de 1,6 kb é resultante da amplificação com os primers Spec-F e Cldh-R (Figura 41).



**Figura 41. Confirmação da deleção do gene ZMO1237 e remoção da marca de seleção.**

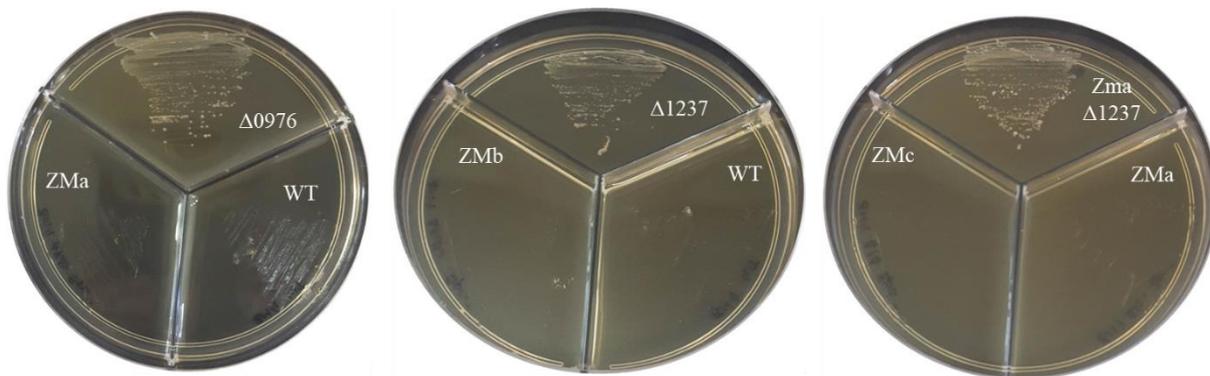
WT: *Z. mobilis* selvagem;  $\Delta$ 1237: linhagem com o gene ZMO1237 deletado; ZMb: linhagem com o gene ZMO1237 deletado e com a marca de seleção removida; C-: controle negativo da reação de PCR; M: marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder (Promega).

Também foi construída uma linhagem portando a dupla deleção. Para tanto, a linhagem ZMa foi transformada com o vetor pV- $\Delta$ 1237 para deleção do gene ZMO1237. Após a confirmação da deleção, um dos transformantes foi selecionado para a remoção da marca de deleção por meio do sistema *Cre-loxP*. A Figura 42 mostra as confirmações feitas por PCR a partir do DNA genômico, sendo que as bandas referentes a estas confirmações são idênticas às indicadas na Figura 41.



**Figura 42. Confirmação da deleção do gene ZMO1237 na linhagem ZMa e remoção da marca de deleção.** ZMa: linhagem com o gene ZMO0976 deletado e com a marca de seleção removida;  $\Delta 1237$ : linhagem ZMa com o gene ZMO1237 deletado; ZMc: linhagem contendo os dois genes deletados e marca de seleção removida; C-: controle negativo da reação de PCR; M: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

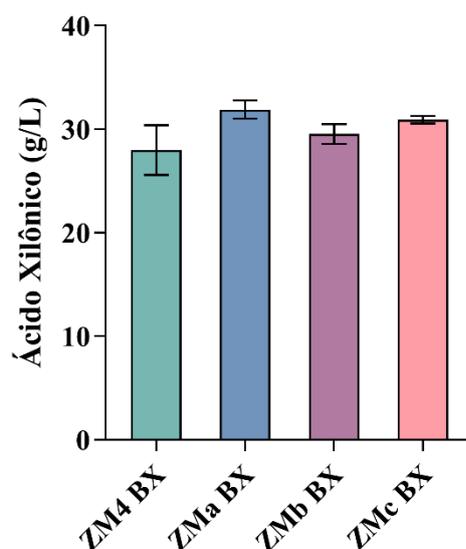
Demonstra-se, assim, que a integração de cassetes menores ao genoma de *Z. mobilis* é possível por meio da técnica apresentada. Contudo, ainda são necessárias novas ferramentas para a integração de fragmentos de DNA maiores, cujo desenvolvimento é imperativo para a engenharia metabólica desta bactéria. A confirmação da remoção da marca de seleção nas linhagens deletadas também foi realizada por meio do seu crescimento em meio contendo espectinomicina. A Figura 43 mostra que após a integração dos cassetes de deleção, as células são capazes de crescer em meio contendo este antibiótico, sendo esta característica perdida após a remoção da marca por meio do sistema Cre-*loxP*. Este é o primeiro relato de utilização deste sistema em *Z. mobilis*, sendo que este sucesso agrega para o desenvolvimento de ferramentas de engenharia genética para esta bactéria.



**Figura 43. Crescimento das linhagens deletadas em meio contendo espectinomicina.** ZMa:  $\Delta 0976$  Spc<sup>-</sup>; ZMb:  $\Delta 1237$  Spc<sup>-</sup>; ZMc:  $\Delta 0976\Delta 1237$  Spc<sup>-</sup>. WT: *Z. mobilis* selvagem.

### 5.6 Produção de ácido xilônico pelas linhagens deletadas

Tendo confirmado as deleções dos genes ZMO0976 e ZMO1237, o vetor pB1-XDH BX foi transformado nas linhagens deletadas. A produção de ácido xilônico foi testada da mesma forma que anteriormente, sendo o resultado apresentado na Figura 44. A Tabela 12 apresenta a produção, produtividade e o rendimento obtidos para estas linhagens. Embora todas as linhagens deletadas tenham apresentado médias ligeiramente superiores de produção de ácido xilônico em comparação à linhagem ZM4 BX, o teste t ( $p < 0,1$ ) mostrou que somente a linhagem ZMa BX apresentou uma diferença significativa, mostrando que esta linhagem foi capaz de produzir mais ácido xilônico que a ZM4 BX. Esta diferença reflete que a xilose não está sendo convertida em xilitol, um composto tóxico para *Z. mobilis*. A produção de ácido xilônico pela linhagem ZMb BX não foi significativamente maior que a de ZM4 BX, mostrando que a deleção do gene da lactato desidrogenase não afeta a produção de ácido xilônico nas condições testadas para esta bactéria. Embora a linhagem ZMc também tenha o gene ZMO0976 deletado como a ZMa, é possível que a deleção do gene ZMO1237 cause um efeito oposto, uma vez que a lactato desidrogenase recicla o NAD<sup>+</sup> utilizado como cofator pela XDH, e assim, não deve ser considerado um alvo de deleção para a engenharia metabólica de *Z. mobilis* para a produção de ácido xilônico. De maneira semelhante à linhagem ZM4 BX, as linhagens deletadas também não foram capazes de consumir toda xilose presente no meio de cultivo, possivelmente devido à acidificação do meio de cultivo mencionada. Devido ao melhor desempenho da linhagem ZMa BX na produção de ácido xilônico, esta foi selecionada para a continuidade do trabalho.



**Figura 44.** Produção de ácido xilônico pelas linhagens modificadas de *Z. mobilis* expressando o gene BX. As linhagens foram crescidas por 24 h em frascos com meio RM contendo 50 g L<sup>-1</sup> de xilose a 30 °C.

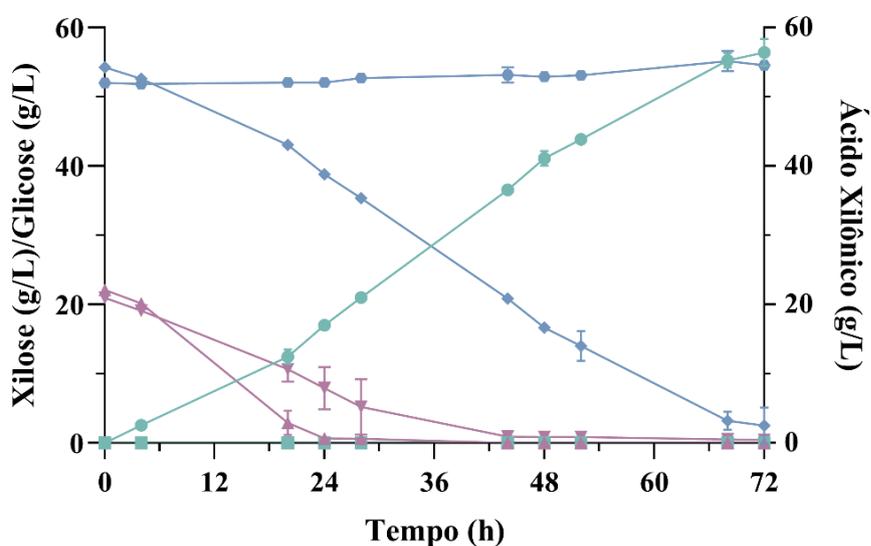
**Tabela 12.** Produção de ácido xilônico, produtividade e rendimento alcançados pelas linhagens modificadas de *Z. mobilis* expressando o gene BX após 24 h de cultivo.

Linagem	Produção (g L <sup>-1</sup> )	Produtividade (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Rendimento (g <sub>AX</sub> /g <sub>X</sub> )
ZM4 BX	27.99 ± 2.40	2,12 ± 0,19	1,05 ± 0,01
ZMa BX	31.90 ± 0.88	2,28 ± 0,19	1,05 ± 0,06
ZMb BX	29.55 ± 0.95	2,25 ± 0,13	1,03 ± 0,11
ZMc BX	30.91 ± 0.36	2,36 ± 0,06	1,05 ± 0,06

### 5.7 Produção de ácido xilônico por fermentação em batelada simples

A linhagem ZMa BX foi cultivada em um biorreator de escala de laboratório de 1 L, contendo 500 mL de meio RM com 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e 50 g L<sup>-1</sup> de xilose (Figura 45). A glicose foi consumida em aproximadamente 28 h, sendo que o consumo de xilose começou dentro de 4 h e finalizando em aproximadamente 72 h. Neste momento, a linhagem ZMa BX produziu 56,44 ± 1,93 g L<sup>-1</sup> de ácido xilônico a partir de 54,27 ± 0,26 g L<sup>-1</sup> de xilose, com um rendimento de 1,08 ± 0,02 g<sub>AX</sub>/g<sub>X</sub>, o que representa 97,3% do máximo teórico. A produtividade deste bioprocesso foi de 0,99 ± 0,03 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, a qual foi menor daquela obtida em frascos, possivelmente devido à menor biomassa inoculada no início do processo.

A linhagem ZMa C- (controle negativo) foi incapaz de utilizar xilose, a qual permaneceu no meio de cultivo até o fim da fermentação. Ela também apresentou uma menor taxa de crescimento quando comparada com a linhagem produtora de ácido xilônico, uma vez que esta apresentou uma taxa de crescimento máximo específico de  $0,04 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$  em comparação com  $0,02 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$  do controle negativo. De fato, a glicose só foi consumida após aproximadamente 52 h, enquanto ZMa BX a consumiu em 28 h. Este atraso no crescimento pode ser explicado pelo estresse causado pela própria xilose. As respostas moleculares de *Z. mobilis* quando a xilose está presente no meio já foram investigadas em uma linhagem utilizadora deste açúcar, mostrando que este causa um impacto mais severo nesta bactéria do que aquele causado por acetato, sendo recrutados mais genes para a utilização de xilose do que para o acetato (YANG *et al.*, 2014a). Embora sejam diferentes linhagens, a xilose também pode impor algum estresse na ZMa C-, sendo necessários mais estudos para a elucidação dos mecanismos de utilização de xilose por *Z. mobilis* para uma melhor engenharia metabólica desta bactéria e um melhor aproveitamento desta pentose.

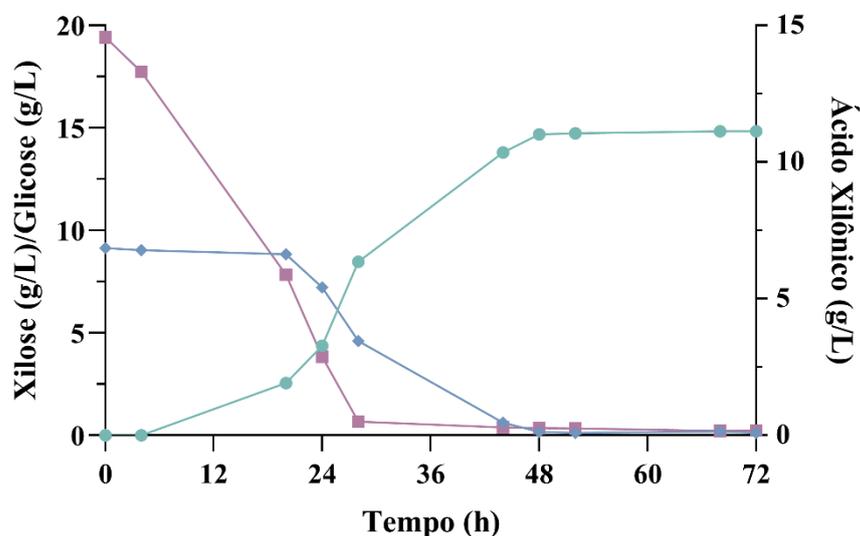


**Figura 45. Perfil fermentativo das linhagens ZMa BX e ZMa C-.** A fermentação foi realizada em modo de batelada em meio contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose e  $50 \text{ g L}^{-1}$  de xilose a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Círculos verdes: produção de ácido xilônico por ZMa BX; losangos azuis: consumo de xilose por ZMa BX; triângulos roxos: consumo de glicose por ZMa BX; quadrados verdes: produção de ácido xilônico por ZMa C-; hexágonos azuis: consumo de xilose por ZMa C-; triângulos invertidos roxos: consumo de glicose por ZMa C-.

### 5.8 Uso de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em fermentação em batelada

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agrícola abundante no Brasil, tendo sido produzidos 178 milhões de toneladas em 2016 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019), de forma que a sua utilização como uma matéria-prima de baixo custo é de grande relevância. Uma vez que *Z. mobilis* mostrou uma eficiente conversão de xilose a ácido xilônico em meio complexo, esta conversão utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar também foi avaliada.

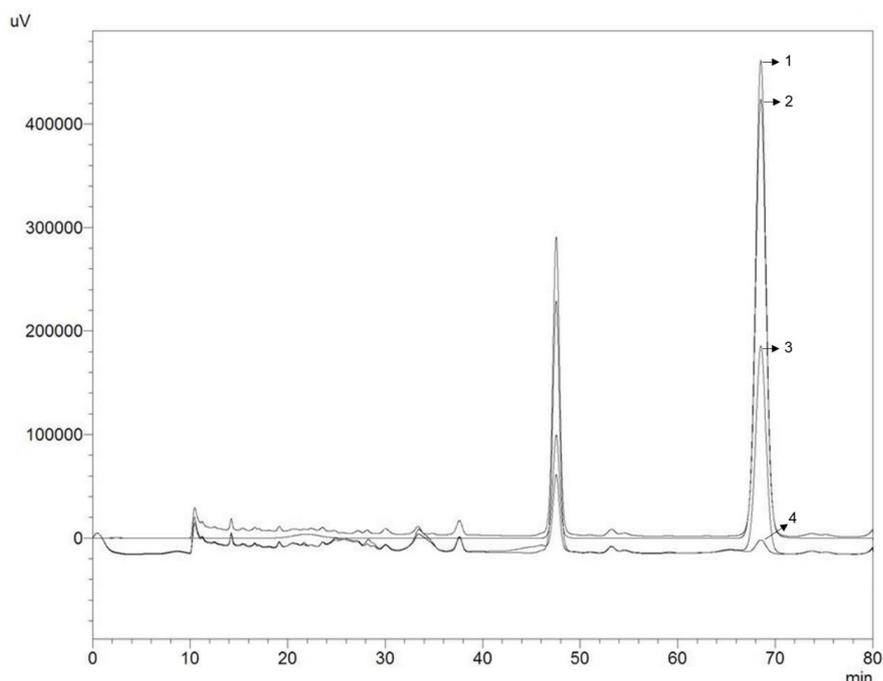
Foi utilizado meio definido contendo 10% de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, de forma que o meio final continha aproximadamente 10 g L<sup>-1</sup> de xilose. A linhagem ZMa C- não foi capaz de crescer nem consumir a glicose presente no meio, enquanto que ZMa BX a consumiu após aproximadamente 28 h de cultivo (Figura 46), tempo semelhante ao cultivo em meio complexo. Esta linhagem atingiu uma produção de 11,13 g L<sup>-1</sup> de ácido xilônico com uma produtividade de 0,32 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, aproximadamente um terço daquela obtida em meio complexo, provavelmente devido à presença de inibidores encontrados em hidrolisados lignocelulósicos. Apesar disso, o rendimento deste bioprocessos foi de 1,07 g<sub>AX</sub>/g<sub>X</sub>, o qual foi similar ao encontrado para a fermentação em meio rico.



**Figura 46. Perfil fermentativo da linhagem ZMa BX em meio contendo hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.** A fermentação foi realizada em modo de batelada em meio definido contendo 10% de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar a 30 °C. Círculos verdes: produção de ácido xilônico; losangos azuis: consumo de xilose; triângulos roxos: consumo de glicose.

A produtividade alcançada por ZMa BX em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar foi menor daquela observada para uma linhagem de *E. coli* modificada produtora de ácido xilônico, a qual foi de  $1,52 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (ZHANG *et al.*, 2019), estudo no qual foi utilizado hidrolisado de espiga de milho como matéria-prima. Outra linhagem modificada de *C. glutamicum* utilizando hidrolisado de palha de arroz foi capaz de produzir  $42,94 \text{ g L}^{-1}$  de ácido xilônico a partir de  $60 \text{ g L}^{-1}$  de xilose somente após 120 h de incubação. Em contrapartida, *Z. mobilis* foi capaz de converter toda xilose disponível no meio contendo hidrolisado em ácido xilônico, demonstrando seu potencial como plataforma industrial para a produção deste ácido orgânico.

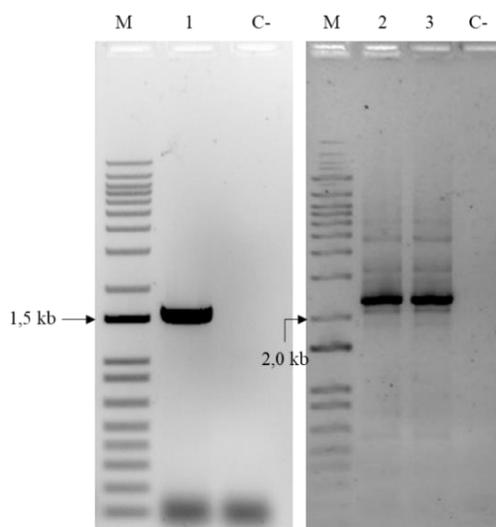
Um interessante resultado deste experimento foi a capacidade de *Z. mobilis* de detoxificar o furfural presente no hidrolisado, uma vez que este composto não foi mais detectado ao final da fermentação (Figura 47). De fato, já foi demonstrado que *Z. mobilis* é capaz de converter o furfural em sua forma alcóolica furfural, que é aproximadamente 75% menos inibitório que o furfural (FRANDEN *et al.*, 2013). Esta é uma importante característica quando o hidrolisado lignocelulósico é considerado como matéria-prima para a produção de produtos de alto valor agregado.



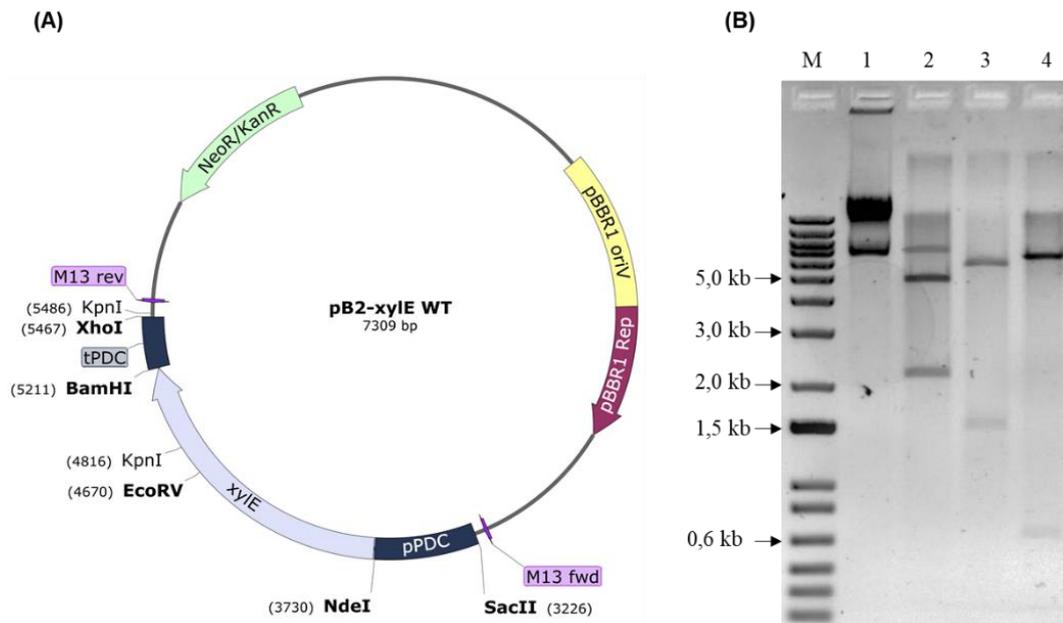
**Figura 47. Cromatogramas das amostras fermentativas de *Z. mobilis* mostrando o decréscimo no pico referente ao furfural. 1: Padrão contendo furfural (tempo de retenção de aproximadamente 70 min); 2: amostra fermentativa no tempo 0 h; 3: amostra fermentativa no tempo de 4 h; 4: amostra fermentativa no tempo de 20 h.**

### 5.9 Clonagem do transportador *xylE*

Ainda com o objetivo de otimizar a produção de ácido xilônico, o gene *xylE* de *E. coli*, que codifica para um transportador de xilose, foi expresso em *Z. mobilis*, sendo ele amplificado a partir do DNA genômico da linhagem DH10B. Para a sua expressão, foram utilizados o promotor e terminador do gene *pdC* de *Z. mobilis*, os quais foram amplificados a partir do seu genoma. A clonagem destes fragmentos separadamente para a montagem do vetor de expressão não foi possível, de forma que estes foram submetidos a uma PCR de sobreposição, gerando um fragmento de aproximadamente 2,2 kb, contendo o gene *xylE* com as regiões promotora e terminadora do gene *pdC*. A amplificação do gene *xylE* e a PCR de sobreposição estão apresentados na Figura 48. Após, foi realizada a clonagem deste produto de PCR no vetor pBBR1MCS2 digerido com as enzimas SacII e XhoI, dando origem ao vetor pB2-*xylE* WT. A confirmação da clonagem e o mapa de restrição deste plasmídeo estão apresentados na Figura 49. A digestão com as enzimas citadas libera o fragmento de 2,2 kb contendo o gene *xylE* e as regiões promotora e terminadora. Já a digestão com as enzimas NdeI e BamHI leva à liberação do gene *xylE* de aproximadamente 1,5 kb, sendo que a digestão com KpnI libera um fragmento de cerca de 600 pb.

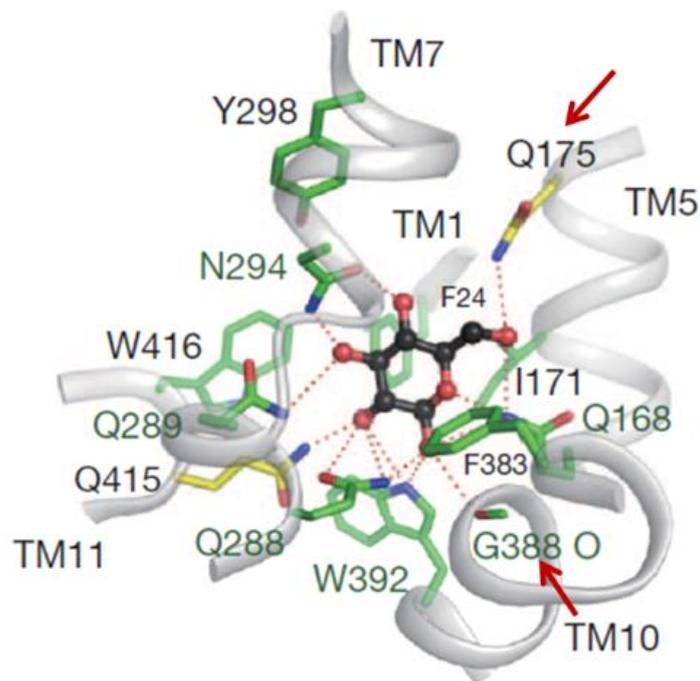


**Figura 48. Amplificação e PCR de sobreposição do gene *xylE*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando a amplificação do gene *xylE* (1) e sua ligação com as regiões promotora e terminadora do gene *pdC* por meio de PCR de sobreposição (2 e 3). C-: controle negativo das reações de PCR. M: marcador de massa molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).



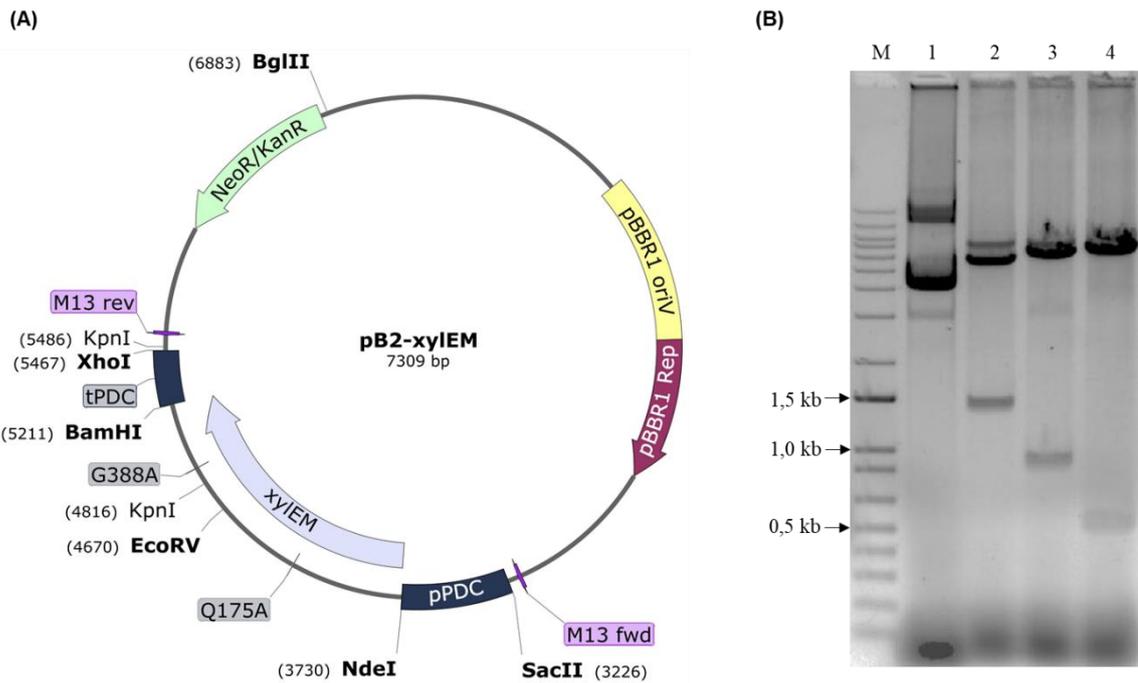
**Figura 49. Confirmação da clonagem do gene *xyIE* no vetor pBBR1MCS2.** (A) Mapa de restrição do vetor pB2-*xyIE* WT. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio: (1) vetor intacto; (2) digestão dupla com as enzimas SacII e XhoI; (3) digestão dupla as enzimas NdeI e BamHI; (4) digestão com KpnI. M: marcador de massa molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Visando minimizar a competição do transportador com a glicose, este foi mutagenizado em dois resíduos. Um deles, a glutamina na posição 175 (Q175), faz ligações de hidrogênio somente com a glicose, não sendo necessário para a ligação com xilose. Assim, ele foi substituído por um resíduo de alanina (mutação Q175A). O outro resíduo, uma glicina na posição 388 (G388), embora também interaja com a xilose, realiza uma ligação de hidrogênio a mais com a glicose, sendo, portanto, mais importante para a ligação deste monossacarídeo. Assim, ele também foi modificado para um resíduo de alanina (mutação G388A). O gene contendo ambas mutações foi sintetizado e posteriormente fragmentos do gene selvagem foram substituídos nesta versão mutada de forma a obter outras duas versões do transportador contendo as mutações citadas separadamente. A Figura 50 mostra a estrutura tridimensional do bolso de ligação ao substrato do transportador Xyle ligado à glicose, com destaque aos resíduos que foram mutagenizados.



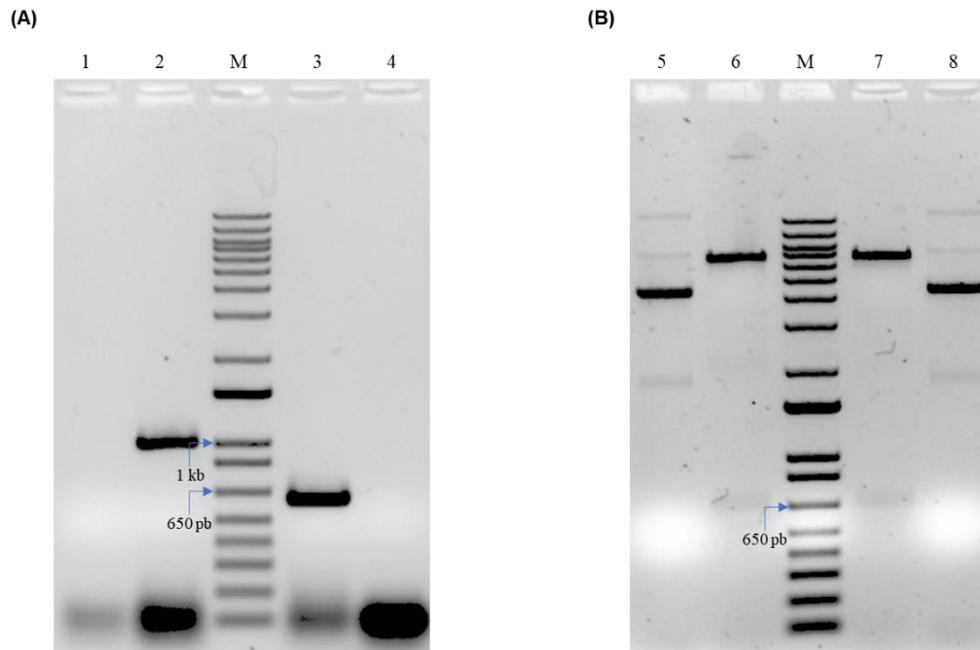
**Figura 50. Estrutura tridimensional do bolso de ligação ao substrato do transportador XyleE ligado à glicose.** As setas vermelhas indicam os resíduos mutagenizados. Retirado de SUN *et al.*, 2012.

A sequência de DNA sintetizada contendo as mutações para ambos os resíduos de aminoácidos foi clonada no vetor pB2-xyleE WT digerido com as enzimas NdeI e BamHI, dando origem ao vetor pB2-xyleEM. A digestão dupla com estas enzimas leva à liberação do gene *xyleE* de aproximadamente 1,5 kb. Já a digestão dupla com as enzimas EcoRV e NdeI ou EcoRV e BamHI liberam fragmentos de aproximadamente 900 e 500 pb, respectivamente. A confirmação da clonagem assim como seu mapa de restrição está apresentada na Figura 51.



**Figura 51. Confirmação da clonagem do gene *xylE* mutado no vetor pBBR1MCS2.** (A) Mapa de restrição do vetor pB2-xylEM. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio: (1) vetor intacto; (2) digestão dupla com as enzimas NdeI e BamHI; (3) digestão dupla com as enzimas NdeI e EcoRV; (4) digestão dupla com as enzimas EcoRV e BamHI; M: marcador de massa molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Ainda, também foram obtidas outras duas versões do gene *xylE* contendo uma mutação cada. Para tanto, o vetor pB2-xylEM foi digerido com a enzima EcoRV juntamente com a enzima NdeI ou BamHI, de forma a retirar os fragmentos que contêm as mutações Q175A e G388A, respectivamente, substituindo-os pelos fragmentos selvagens amplificados a partir do vetor pB2-xylE WT (Figura 52A). O fragmento que contém o resíduo 175 possui aproximadamente 1 kb e o que contém o resíduo 388, 600 pb. Estes produtos de PCR foram clonados no vetor pB2-xylEM, originando os novos plasmídeos pB2-xylE175 e pB2-xylE388, contendo as mutações Q175A e G388A, respectivamente. Seus mapas de restrição encontram-se no Apêndice 8.2. A confirmação destas clonagens está apresentada na Figura 52B, na qual está apresentada a digestão com a enzima KpnI que libera um fragmento de 670 pb.



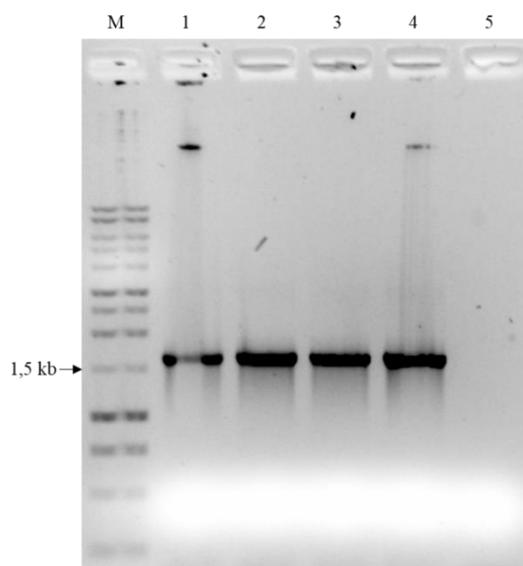
**Figura 52. Amplificação dos fragmentos do gene *xylE* e confirmação da sua clonagem.**

(A) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando a amplificação dos fragmentos do gene *xylE* na forma selvagem (2 e 3); 1 e 4: controle negativo das reações de PCR. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando a confirmação da clonagem dos fragmentos selvagens no vetor pB2-xylEM: 5: vetor pB2-xylE175 intacto e digerido com a enzima KpnI (6); 7: digestão do vetor pB2-xylE388 com a enzima KpnI; 8: vetor pB2-xylE388 intacto; M: marcador de massa molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Todos os vetores contendo as diferentes versões deste gene, incluindo o selvagem, foram desmetilados na linhagem de *E. coli* JM110 visando à transformação em *Z. mobilis* e à avaliação do transporte de xilose nesta bactéria por meio da sua produção nativa de xilitol. Contudo, após tentativas de transformação realizando a seleção de transformantes em canamicina, não foi possível confirmar a presença dos plasmídeos nestes, sendo que colônias também cresciam no controle negativo (“transformação” realizada sem DNA) da transformação. Swing e De Ley (1977) reportam a resistência de *Z. mobilis* a antibióticos comumente utilizados como canamicina, ampicilina, estreptomicina, gentamicina, dentre outros, embora o gene de resistência a canamicina seja realmente utilizado na construção de vetores de expressão para *Z. mobilis* (CAO *et al.*, 2016). Além disso, Kerr *et al.* (2011) relatam que somente os antibióticos cloranfenicol e tetraciclina são confiáveis para o uso em

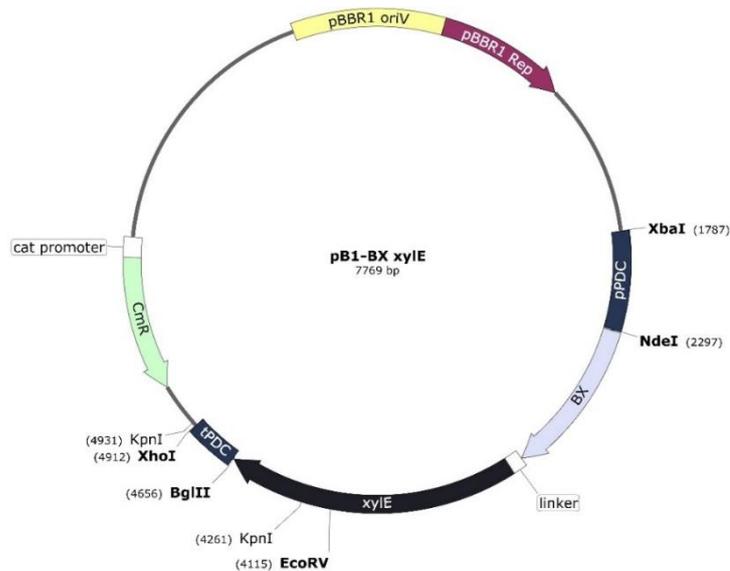
*Z. mobilis*, enquanto que Dunn (2015) adicionou espectinomomicina a esta lista. De fato, os antibióticos cloranfenicol e espectinomomicina foram utilizados com sucesso neste trabalho.

Assim, para contornar este problema relacionado à resistência à canamicina, outra estratégia foi escolhida para o teste dos transportadores *xylE*, optando-se pela montagem de *operons* portando as diferentes versões deste gene e o gene BX e avaliando-os diretamente na produção de ácido xilônico. Para tanto, os plasmídeos já construídos (pB2-*xylE* WT, pB2-*xylEM*, pB2-*xylE175* e pB2-*xylE388*) foram utilizados como molde para a amplificação dos genes *xylE*, cujo resultado encontra-se na Figura 53.

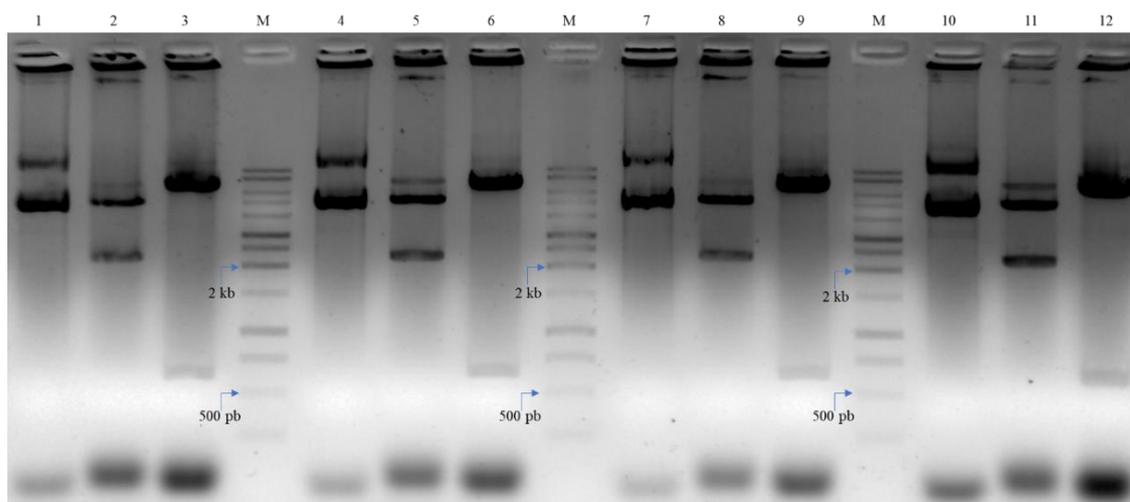


**Figura 53. Amplificação das versões do gene *xylE*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando a amplificação das diferentes versões do gene *xylE* - 1: versão selvagem (WT); 2: versão com a dupla mutação (M); 3: versão com a mutação Q175A (175); 4: versão com a mutação G388A (388); 5: controle negativo da reação de PCR; M: marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder (Promega).

Os produtos de PCR foram então clonados no vetor pB1-XDH BX digerido com a enzima BglII, originando os seguintes vetores: pB1-BX *xylE*, portando a versão selvagem do transportador *xylE*, pB1-BX *xylEM* portando a versão com dupla mutação; pB1-BX *xylE175* portando a mutação Q175A e pB1-BX *xylE388*, portando a mutação G388A. O mapa de restrição do vetor pB1-BX *xylE* está apresentado na Figura 54. A confirmação da clonagem destes plasmídeos encontra-se na Figura 55, a qual foi realizada por meio da digestão dupla com as enzimas NdeI e BglII ou com a enzima KpnI, liberando fragmentos de 2,4 kb e 670 pb, respectivamente.



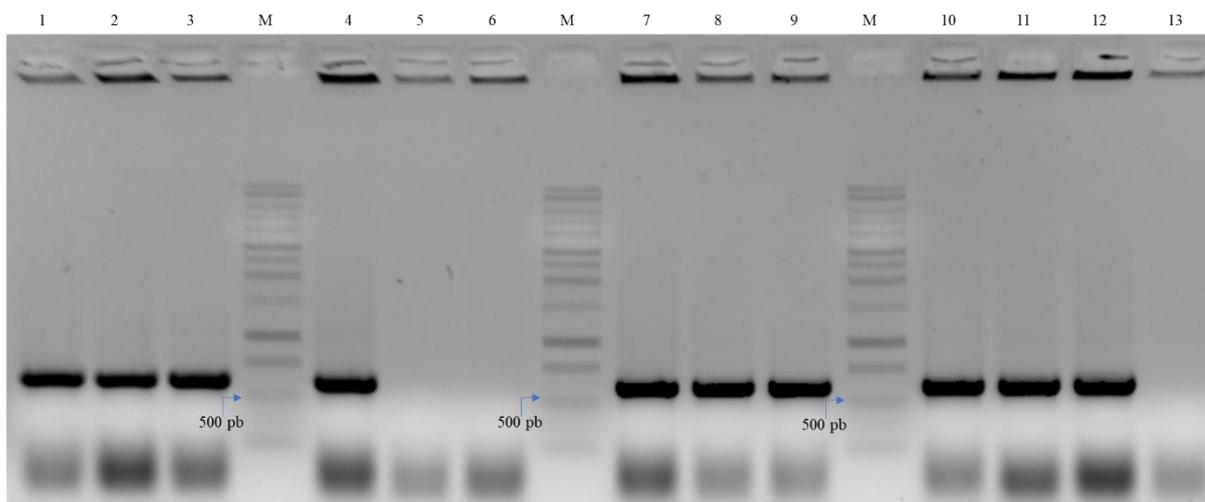
**Figura 54.** Mapa de restrição do vetor pB1-BX *xylE* contendo o *operon* com o gene BX e *xylE* selvagem.



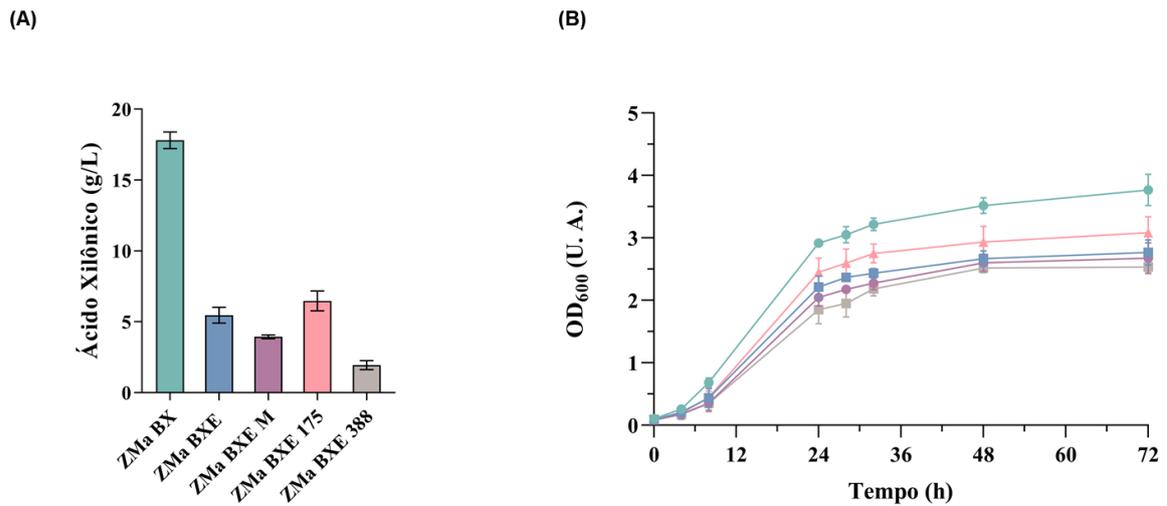
**Figura 55.** Confirmação da clonagem das diferentes versões do gene *xylE* no vetor pB1-XDH BX. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando a confirmação da clonagem dos genes *xylE*: 1: vetor pB1-BX *xylE* intacto; 2: vetor pB1-BX *xylE* digerido com as enzimas NdeI e BglII; 3: vetor pB1-BX *xylE* digerido com a enzima KpnI; 4: vetor pB1-BX *xylE*175 intacto; 5: vetor pB1-BX *xylE*175 digerido com as enzimas NdeI e BglII; 6: vetor pB1-BX *xylE*175 digerido com a enzima KpnI; 7: vetor pB1-BX *xylE*388 intacto; 8: vetor pB1-BX *xylE*388 digerido com as enzimas NdeI e BglII; 9: vetor pB1-BX *xylE*388 digerido com a enzima KpnI; 10: vetor pB1-BX *xylE*388 intacto; 11: vetor pB1-BX *xylE*388 digerido com as enzimas NdeI e BglII; 12: vetor pB1-BX *xylE*388 digerido com a enzima KpnI. M: marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder (Promega).

### 5.10 Avaliação do transportador *xylE* na produção de ácido xilônico

Após desmetilação dos plasmídeos contendo o *operon* com os genes BX e *xylE* (e suas variantes), estes foram transformados na linhagem ZMa, sendo três transformantes de cada variação do *xylE* escolhidos aleatoriamente e submetidos à PCR de colônia. Como mostrado na Figura 56, desta vez foi possível a identificação do plasmídeo contendo os diferentes transportadores nos transformantes de *Z. mobilis*. Para as variantes selvagem, 175 e 388 do *xylE*, todos os transformantes testados apresentaram a banda correspondente à presença do transportador *xylE*, sendo que somente um da variante dupla mutada apresentou esta banda. Assim, transformantes positivos foram testados para a produção de ácido xilônico, sendo que as linhagens geradas foram denominadas BXE (contendo o gene *xylE* selvagem); BXE M (contendo o gene *xylE* com a dupla mutação); BXE 175 (contendo o gene *xylE* com a mutação Q175A) e BXE 388 (contendo o gene *xylE* com a mutação G388A). A Figura 57A mostra a produção de cada linhagem após 72 h de cultivo. Conforme apresentado, as linhagens portando o transportador *xylE*, em qualquer uma de suas versões, teve a sua produção de ácido xilônico impactada negativamente, sendo que o crescimento destas também foi menor do que para a linhagem ZMa BX (Figura 57B).

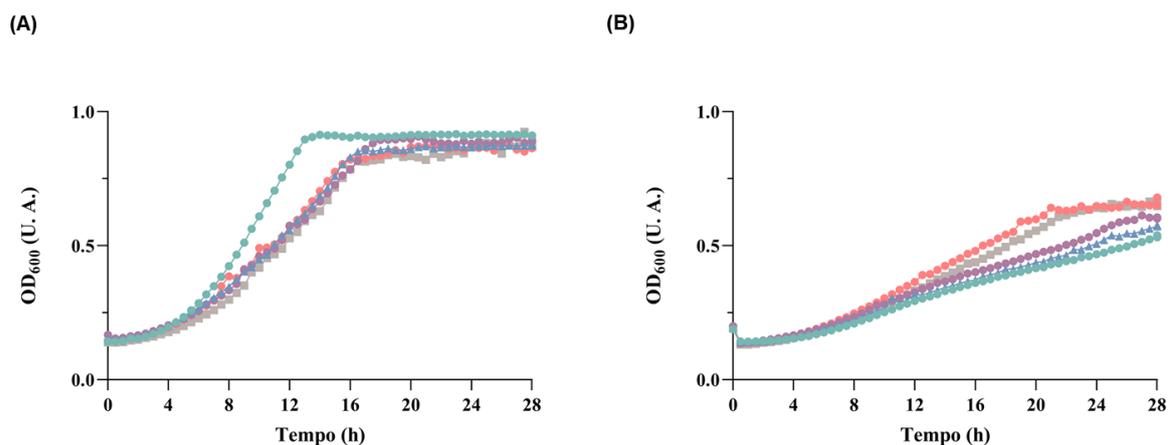


**Figura 56. PCR de colônia dos transformantes contendo o *operon* com o gene BX e variantes do gene *xylE*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1 a 3: transformantes contendo a variante selvagem do *xylE*; 4 a 6: transformantes contendo a variante dupla mutada do gene *xylE*; 7 a 9: transformantes contendo a variante 175 do gene *xylE*; 10 a 12: transformantes contendo a variante 388 do gene *xylE*; 13: controle negativo da reação de PCR; M: marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder (Promega).



**Figura 57. Produção de ácido xilônico pelas linhagens coexpressando o gene BX e *xylE* (A) e seu crescimento (B).** As linhagens foram crescidas por 72 h em frascos com meio RM contendo 50 g L<sup>-1</sup> de xilose a 30 °C. Verde: linhagem ZMa BX; azul: linhagem ZMa BXE; roxo: linhagem ZMa BXE M; rosa: linhagem ZMa BXE 175; cinza: linhagem ZMa BXE 388.

Para melhor verificar a influência da presença do gene *xylE* no crescimento celular de *Z. mobilis*, as linhagens foram submetidas a crescimento em placa em meio contendo somente glicose e glicose com xilose. A Figura 58A mostra o crescimento das linhagens em meio contendo apenas glicose e a Figura 58B mostra seu crescimento em meio contendo glicose e xilose.

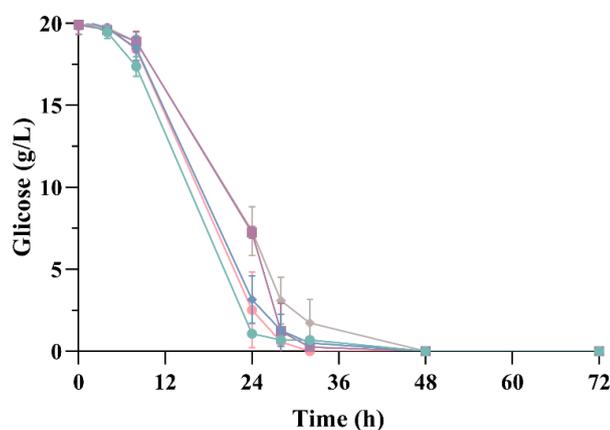


**Figura 58. Crescimento das linhagens coexpressando o gene BX e *xylE* em meio contendo apenas glicose (A) e glicose e xilose (B).** As células foram crescidas a 30 °C. Verde: linhagem ZMa BX; azul: linhagem ZMa BXE; roxo: linhagem ZMa BXE M; rosa: linhagem ZMa BXE 175; cinza: linhagem ZMa BXE 388.

Nota-se na Figura 58A que as linhagens portando o transportador XylE apresentam uma maior fase lag em comparação à linhagem expressando somente o gene BX quando crescidas em meio contendo somente glicose como fonte de carbono, embora todas atinjam uma OD<sub>600</sub> semelhante na fase estacionária. Contudo, enquanto que a linhagem ZMa BX atinge esta fase em aproximadamente 12 h, as demais linhagens levam cerca de 16 h. Ainda, há um decréscimo na taxa de crescimento específico máximo para as linhagens expressando *xylE*. A linhagem ZMa BX apresentou uma taxa de crescimento específico máximo de  $0,18 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ , enquanto que ZMa BXE, ZMa BXE M, ZMa BXE 175 e ZMa BXE 388 apresentaram taxas de  $0,12 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,12 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,13 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  e  $0,13 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$  respectivamente. Assim, verifica-se que a expressão de *xylE* sob o controle de um promotor forte como o *pdc* leva a um aumento da fase lag e a uma redução na taxa de crescimento específico máximo de *Z. mobilis*.

Este aumento da fase lag em células expressando *xylE* também foi observado em uma linhagem de *Z. mobilis* capaz de metabolizar xilose para a produção de etanol (DUNN; RAO, 2014), sendo que no estudo citado, também houve uma redução na taxa de consumo de glicose, embora os autores não tenham discutido ou correlacionado os dois fatos. Coincidentemente, a expressão de *xylE* na linhagem ZMa BX também levou a uma menor taxa de consumo de glicose em comparação à linhagem sem *xylE*, conforme apresentado na Figura 59, a qual mostra o consumo de glicose durante a produção de ácido xilônico apresentada na Figura 57. Assim, é possível que o crescimento mais lento observado nas linhagens expressando *xylE* seja devido ao menor consumo de glicose. Outra possibilidade para o menor crescimento em células com o transportador XylE estaria relacionada com o fato de que este é um transportador que utiliza a força próton-motiva como energia para o transporte do açúcar (DUNN; RAO, 2014). Sabe-se que *Z. mobilis* apresenta um crescimento desacoplado, no qual há um rápido catabolismo não relacionado com a síntese de biomassa celular (BELAÏCH; SENEZ, 1965), sendo possível que o ATP produzido seja reciclado por uma atividade de ATPase, convertendo esta energia em uma força próton-motiva transmembrana (KALNENIEKS, 2006). Este gradiente transmembrana pode ser dissipado por meio da exportação de ânions bicarbonato derivados da dissociação do CO<sub>2</sub> produzido pela fermentação, deixando um próton no citoplasma (KALNENIEKS, 2006), hipótese mencionada no tópico 1.6.2, de forma que a presença do transportador XylE derivada de uma alta expressão pelo promotor *pdc* poderia causar um desbalanço na dissipação deste gradiente, tendo como consequência uma diminuição no crescimento de *Z. mobilis*. Contudo, mais

estudos são necessários para confirmar tanto a exportação de ânions bicarbonato para a dissipação do gradiente transmembrana quanto para a influência do transportador XylE nesta dissipação de energia.



**Figura 59. Consumo de glicose por ZMa BX e pelas linhagens coexpressando o gene BX e *xylE*.** As células foram crescidas a 30 °C. Verde: linhagem ZMa BX; azul: linhagem ZMa BXE; roxo: linhagem ZMa BXE M; rosa: linhagem ZMa BXE 175; cinza: linhagem ZMa BXE 388.

Ainda de acordo com a Figura 59, verifica-se que as variantes do transportador XylE que mais influenciaram no consumo de glicose foram aquelas com a dupla mutação e com a mutação G388A, revelando que este resíduo de aminoácido de fato tem influência na ligação e transporte da glicose. Além disso, o crescimento das linhagens ZMa BX e daquelas coexpressando o gene BX e *xylE* também é impactado quando há xilose no meio, conforme a Figura 58B, possivelmente devido à presença de ácido xilônico. Embora a linhagem ZMa BX, a melhor produtora dentre elas, seja a mais impactada, todas exibem taxas de crescimento máximo específico similares ( $0,08 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ ), com exceção da linhagem ZMa BXE 175, a qual exibiu  $0,09 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ .

Concomitantemente aos testes das diferentes versões do transportador XylE na produção de ácido xilônico, foi realizado o sequenciamento das construções dos *operons* contendo o gene BX e *xylE* descritas no tópico 5.9 para a verificação dos resíduos mutagenizados. Conforme apresentado no alinhamento da Figura 60, tanto a versão selvagem do gene (WT) e mutagenizada no resíduo 175 da proteína apresentam o resíduo 388 na forma selvagem (glicina) enquanto que as versões com a dupla mutação (M) e 388 apresentam este

mutado para alanina (destaque em vermelho). Entretanto, a Figura 61 revela que a versão 388 que deveria apresentar somente a mutação no resíduo 388, também apresenta o resíduo 175 mutado, ou seja, o fragmento selvagem não foi corretamente clonado, de forma que esta versão apresenta os dois resíduos mutados assim como na versão M. Assim, com os dois resíduos mutados, há realmente uma mudança no consumo de glicose em relação às demais variantes, sendo que estas mutações podem ser aplicadas a bioprocessos nos quais a competição entre glicose e xilose pelos transportadores é um gargalo.

```

WT  GTATTGTGGCGCTACTGTCGATGCTGTTCTATGTTGCCGCCCTTTGCCATGTCCTGGGGTCCGGTATGCTGGGTACTGCTGT
M   GTATTGTGGCGCTAC-GTCGATGCTGTTCTATGTTGCCGCCCTTTGCCATGTCCTGGGCCCGGTATGCTGGGTACTGCTGT
175 GTATTGTGGCGCTACTGTCGATGCTGTTCTATGTTGCCGCCCTTT-CCATGTCC-GGGGTCCGGTATGCTGGGTACTGCTGT
388 GTATTGTGGCGCTACTGTCGATGCTGTTCTATGTTGCCGCCCTTTGCCATGTCCTGGGGCCCGGTATGCTGGGTACTGCTGT

```

**Figura 60. Alinhamento das sequências genéticas das diferentes versões do gene *xylE*.** O códon do resíduo 388 da proteína está destacado em vermelho. WT: versão selvagem do *xylE*; M: versão com a dupla mutação; 175: versão com o resíduo 175 mutado; 388: versão com o resíduo 388 mutado.

```

WT  CCAGCTCATATTTCGCGGGAAACTGGTCTCTTTTAACCAAGTTTGGCATTATTTTCGGGCCAACTTTTAGTTTACTGCGT
M   CCAGCTCATATTTCGCGGGAAACTGGTCTCTTTTAACCAAGTTTGGCATTATTTTCGGGGCCCTTTTAGTTTACTGCGT
175 CCAGCTCATATT-GCGGGAAACTGGTCTCTTTTAACCAAGTTTGGCATTATTTTCGGGGCCCTTTTAGTTTACTGCGT
388 CCAGCTCATATT---GGGGAAATGGTTT---TTTAACCAAGTTT-CGATTATTTTCGGGGCCCTTTTAGTTTACTGCGT

```

**Figura 61. Alinhamento das sequências genéticas das diferentes versões do gene *xylE*.** O códon do resíduo 175 da proteína está destacado em vermelho. WT: versão selvagem do *xylE*; M: versão com a dupla mutação; 175: versão com o resíduo 175 mutado; 388: versão com o resíduo 388 mutado.

Além disso, verificou-se que a expressão do transportador *xylE* controlada por um promotor forte como o do gene *pdC* impactou negativamente o seu crescimento, de forma que para a expressão deste gene em *Z. mobilis*, um promotor fraco seria mais adequado. Este fato mais uma vez corrobora para a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas de engenharia genética para esta bactéria que traz um importante potencial na construção de novas plataformas biotecnológicas.

## 6. Conclusões e Perspectivas

Ácidos orgânicos são importantes blocos de construção na indústria química, possuindo grupamentos funcionais que permitem a sua polimerização em moléculas mais complexas. Além disso, a bactéria *Z. mobilis* possui características industriais desejáveis, como a alta taxa de absorção de açúcares e a baixa formação de biomassa celular. Dessa forma, neste trabalho buscou-se o desenvolvimento de uma linhagem de *Z. mobilis* capaz de produzir ácidos orgânicos a partir da xilose, pentose cujo aproveitamento é relevante para a valorização da biomassa lignocelulósica de forma a utilizar esta como matéria-prima.

A expressão do gene *CADI* de *A. terreus* não levou à produção de ácido itacônico por *Z. mobilis*, possivelmente devido ao baixo fluxo de carbono pelo TCA, porém são necessários mais estudos para a elucidação deste problema. Ainda, também não foi possível a integração de grandes fragmentos de DNA ao genoma de *Z. mobilis*, ressaltando a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas de engenharia genética para esta bactéria.

Contudo, a produção de ácido xilônico foi realizada com sucesso, sendo este trabalho o primeiro relato da produção deste composto em *Z. mobilis* (linhagem ZM4). A avaliação de sete diferentes genes codificadores de XDH permitiu a seleção de um gene nativo de *P. xenovorans*, o qual resultou em uma melhor produtividade volumétrica em relação ao gene de *C. crescentus*, o mais comumente utilizado na literatura, evidenciando a importância da busca de novos genes provenientes da biodiversidade no desenvolvimento de rotas metabólicas no contexto da biologia sintética.

A deleção do gene ZMO0976, codificador para uma xilose redutase, permitiu um aumento na produção de ácido xilônico possivelmente devido a uma diminuição da conversão da xilose em xilitol. A fermentação em modo batelada com esta linhagem levou ao consumo de toda a xilose disponível no meio em ácido xilônico, atingindo um rendimento próximo ao máximo teórico. Devido a este sucesso, a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como uma matéria-prima de baixo custo também foi avaliada, sendo que a linhagem modificada foi capaz de converter a xilose presente neste material em ácido xilônico, revelando o potencial de se utilizar *Z. mobilis* em um bioprocessamento economicamente viável. A fim de otimizar este processo, estudos acerca da composição do meio, das suplementações de nutrientes e dos parâmetros fermentativos são necessários. Por exemplo, a utilização de extrato de levedura em substituição às vitaminas adicionadas ao meio contendo hidrolisado de cana-de-açúcar deve ser avaliada, uma vez que isso levaria a uma redução maior dos custos de produção.

A expressão do transportador de xilose *xyIE* não levou a melhorias na produção de ácido xilônico por *Z. mobilis*, interferindo no crescimento desta bactéria. Embora ainda sejam estudos preliminares, estes mostraram que o transportador contendo os resíduos Q175 e G388 mutados leva a uma mudança no consumo de glicose em relação à forma selvagem, de forma que estas mutações podem ser aplicadas a bioprocessos nos quais a xilose é utilizada. Para a sua utilização em *Z. mobilis*, a expressão do gene *xyIE* deve ser controlada por um promotor mais fraco, evidenciando novamente que estudos acerca de sua genética para o desenvolvimento de ferramentas para sua manipulação são necessários para o aproveitamento do potencial industrial desta bactéria.

## 7. Referências Bibliográficas

AGRAWAL, M.; CHEN, R. R. Discovery and characterization of a xylose reductase from *Zymomonas mobilis* ZM4. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 11, p. 2127–2133, 2011.

AGRAWAL, M.; DUNN, K. L.; RAO, C. V. *Zymomonas mobilis* for the Conversion of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. In: GOSSET, G. (Ed.). **Engineering of Microorganisms for the Production of Chemicals and Biofuels from Renewable Resources**. 1. ed. Cham: Springer, 2017. p. 67–92.

AGRAWAL, M.; MAO, Z.; CHEN, R. R. Adaptation Yields a Highly Efficient Xylose-Fermenting *Zymomonas mobilis* Strain. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 4, p. 777–785, 2011.

AHORSU, R.; MEDINA, F.; CONSTANTÍ, M. Significance and Challenges of Biomass as a Suitable Feedstock for Bioenergy and Biochemical Production: A Review. **Energies**, v. 11, n. 3366, 2018.

ALMEIDA, J. R. M. *et al.* **Komagataella phaffii recombinante produtora de ácido xilônico e método para a produção de ácido xilônico a partir de xilose**. Patente número: BR 102018001359-9, 2019.

ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Microbial production of specialty organic acids from renewable and waste materials. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, p. 497–513, 2014.

ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 187–198, 2000.

BARKER, B. T. P.; HILLIER, V. F. Cider sickness. **The Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 1, p. 67–85, 1912.

BARROS, M. DE *et al.* Synthesis of sorbitol by *Zymomonas mobilis* under high osmotic pressure. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 324–328, 2006.

BARUAH, J. *et al.* Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. **Frontiers in Energy Research**, v. 6, p. 1–19, 2018.

BAUP, S. Ueber eine neue Pyrogen-Citronensäure, und über Benennung der Pyrogen-Säuren überhaupt. **Annalen der Pharmacie**, v. 19, n. 1, p. 29–38, 1836.

BECKER, J. *et al.* Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 36, p. 168–175, 2015.

BELAÏCH, J.-P.; SENEZ, J. C. Influence of Aeration and of Pantothenate on Growth Yields of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 89, n. 5, p. 1195–1200, 1965.

BENTLEY, R.; THIESSEN, C. P. Biosynthesis of Itaconic Acid in *Aspergillus terreus* - I. Tracer Studies with C14-labeled substrates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 673–687, 1957.

BERTRAND, M. G. Action de la bactérie du sorbose sur le sucre de bois. In: **Comptes Rendus des Séances de L'académie des Sciences**. Paris: Gauthier-Villars, 1898. p. 124–127.

BETANCUR, M. O. *et al.* Multicopy plasmid integration in *Komagataella phaffii* mediated by a defective auxotrophic marker. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 99, 2017.

BONNARME, P. *et al.* Itaconate Biosynthesis in *Aspergillus terreus*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 3573–3578, 1995.

BRESTIC-GOACHET, N. *et al.* Transfer and Expression of an *Erwinia chrysanthemi* Cellulase Gene in *Zymomonas mobilis*. **Microbiology**, v. 135, n. 4, p. 893–902, 1989.

BRINGER-MEYER, S.; SAHM, H. Junctions of catabolic and anabolic pathways in *Zymomonas mobilis*: phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 5–6, p. 529–536, 1989.

BUCHERT, J. *et al.* Production of Xylonic Acid by *Pseudomonas fragi*. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 8, p. 541–546, 1986.

BUCHERT, J.; PULS, J.; POUTANEN, K. Comparison of *Pseudomonas fragi* and *Gluconobacter oxydans* for production of xylonic acid from hemicellulose hydrolyzates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 367–372, 1988.

CALAM, C. T.; OXFORD, A. E.; RAISTRICK, H. Studies in the biochemistry of micro-organisms: itaconic acid, a metabolic product of a strain of *Aspergillus terreus* Thom. **Biochemical Journal**, v. 33 (9), p. 1488–1495, 1939.

CAO, Q. *et al.* Three new shuttle vectors for heterologous expression in *Zymomonas mobilis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 33–40, 2016.

CAO, Y. *et al.* Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the Production of Xylonate. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e67305, 2013.

CARR, J. G.; PASSMORE, S. M. Discovery of the “cider sickness” bacterium *Zymomonas anaerobia* in apple pulp. **Journal of the Institute of Brewing**, p. 462–466, 1971.

CARRA, S. *et al.* High lactobionic acid production by immobilized *Zymomonas mobilis* cells: a great step for large-scale process. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 7, p. 1265–1276, 2020.

CHACON-VARGAS, K. *et al.* Genome Sequence of *Zymomonas mobilis* subsp.

*mobilis* NRRL B-1960. **Genome Announcements**, v. 5, n. 30, p. e00562-17, 2017.

CHANG, P. *et al.* Engineering efficient production of itaconic acid from diverse substrates in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 249, p. 73–81, 2017.

CHEN, C. *et al.* Genome comparison of different *Zymomonas mobilis* strains provides insights on conservation of the evolution. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–15, 2018.

CHEN, M. *et al.* Identification of an itaconic acid degrading pathway in itaconic acid producing *Aspergillus terreus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7541–7548, 2016.

CHEN, R. R. *et al.* **Strains of *Zymomonas mobilis* for fermentation of biomass**. Patente número: US 8329444 B2, 2012.

CHEN, Y.; NIELSEN, J. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 165–172, 2016.

CHUN, B. W. *et al.* The Development of Cement and Concrete Additive. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 645-658, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perfil do Setor do Açúcar e Etanol no Brasil**. Brasília, 2019.

CONWAY, T. The Entner-Doudoroff pathway: history , physiology and molecular biology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 1–28, 1992.

COOK, G. M.; RUSSELL, J. B. Energy-spilling reactions of *Streptococcus bovis* and resistance of its membrane to proton conductance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1942–1948, 1994.

CORDES, T.; MICHELUCCI, A.; HILLER, K. Itaconic Acid : The Surprising Role of an Industrial Compound as a Mammalian Antimicrobial Metabolite. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 35, p. 12.1-12.23, 2015.

COTON, M. *et al.* Polyphasic study of *Zymomonas mobilis* strains revealing the existence of a novel subspecies *Z. mobilis* subsp. *francensis* subsp. nov., isolated from French cider. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 121–125, 2006.

CUNHA DA CRUZ, J.; MACHADO DE CASTRO, A.; CAMPORESE SÉRVULO, E. F. World market and biotechnological production of itaconic acid. **3 Biotech**, v. 8, n. 138, 2018.

DADDS, M. J. S.; MARTIN, P. A.; CARR, J. G. The Doubtful Status of the Species *Zymomonas anaerobia* and *Z. mobilis*. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 36, p. 531–

539, 1973.

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, 1974.

DAWES, E. A.; RIBBONS, D. W.; LARGE, P. J. The route of ethanol formation in *Zymomonas mobilis*. **Biochemical Journal**, v. 98, p. 795–803, 1966.

DE GRAAF, A. A. *et al.* Metabolic state of *Zymomonas mobilis* in glucose-, fructose-, and xylose- fed continuous cultures as analysed by <sup>13</sup>C- and <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy. **Archives of Microbiology**, v. 171, n. 6, p. 371–385, 1999.

DE LEY, J.; SWINGS, J. Phenotypic Description, Numerical Analysis, and Proposal for an Improved Taxonomy and Nomenclature of the Genus *Zymomonas* Kluyver and van Niel 1936. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, n. 2, p. 146–157, 1976.

DEANDA, K. *et al.* Development of an Arabinose-Fermenting *Zymomonas mobilis* Strain by Metabolic Pathway Engineering. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4465–4470, 1996.

DESINIOTIS, A. *et al.* Complete genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* centrotpe ATCC 29191. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 21, p. 5966–5967, 2012.

DESSIE, W. *et al.* Current advances on waste biomass transformation into value-added products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 11, p. 4757–4770, 2020.

DUNN, K. L. **Engineering *Zymomonas mobilis* for the Production of Biofuels and Other Value-Added Products**. University of Illinois at Urbana-Champaign, 2015.

DUNN, K. L.; RAO, C. V. Expression of a xylose-specific transporter improves ethanol production by metabolically engineered *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 15, p. 6897–6905, 2014.

EL-IMAM, A. A.; CHENYU, D. Fermentative Itaconic Acid Production. **Biodiversity, Bioprospecting and Development**, v. 1, p. 1–8, 2014.

ENTNER, N.; DOUDOROFF, M. Glucose and Gluconic Acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 196, p. 853–862, 1952.

FALCÃO DE MORAIS, J. O. *et al.* *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. **Journal of Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 75–91, 1993.

FELDMANN, S. D.; SAHM, H.; SPRENGER, G. A. Pentose metabolism in

*Zymomonas mobilis* wild-type and recombinant strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 354–361, 1992.

FERRAZ, H. C.; BORGES, C. P.; ALVES, T. L. M. Sorbitol and Gluconic Acid Production Using Permeabilized *Zymomonas mobilis* Cells Confined by Hollow-Fiber Membranes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 89, p. 43–53, 2000.

FRANDEN, M. A. *et al.* Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 99, 2013.

GAO, C. *et al.* Programmable biomolecular switches for rewiring flux in *Escherichia coli*. **Nature Communications**, v. 10, n. 3751, 2019.

GIBBS, M.; DEMOSS, R. D. Ethanol Formation in *Pseudomonas lindneri*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 34, n. 2, p. 478–479, 1951.

GIBBS, M.; DEMOSS, R. D. Anaerobic dissimilation of C14-labeled glucose and fructose by *Pseudomonas linderi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 207, p. 689–694, 1954.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future. **Science**, v. 315, p. 808–810, 2007.

GOODMAN, A. E.; ROGERS, P. L.; SKOTNICKI, M. L. Minimal Medium for Isolation of Auxotrophic *Zymomonas* Mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 496–498, 1982.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Fourth ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GUPTA, S. K. **Hydroxy Acid Complexes for Antiaging and Skin Renovation**. Patente número US 7547454, 2009.

HARDER, B.-J.; BETTENBROCK, K.; KLAMT, S. Model-based metabolic engineering enables high yield itaconic acid production by *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 38, p. 29–37, 2016.

HAYASHI, T. *et al.* The respiratory chain provides salt stress tolerance by maintaining a low NADH/NAD<sup>+</sup> ratio in *Zymomonas mobilis*. **Microbiology**, v. 161, n. 12, p. 2384–2394, 2015.

HE, M. X. *et al.* Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under furfural stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 189–199, 2012.

HE, M. X. *et al.* *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries.

**Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 101, 2014.

HUANG, X. *et al.* Improving itaconic acid production through genetic engineering of an industrial *Aspergillus terreus* strain. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 119, 2014.

IEA Bioenergy. **Bio-based Chemicals: Value Added Products from Biorefineries**. International Energy Agency, 2012.

IEA. **The Future of Petrochemicals - Towards more sustainable plastics and fertilisers**. International Energy Agency, 2018.

ISHIZAKI, H. *et al.* D-Xylonic Acid Production by *Enterobacter cloacae*. **Nippon Nōgeikagaku Kaishi**, v. 47, n. 12, p. 755–761, 1973.

JANNER, C. R. *et al.* pPCV, a versatile vector for cloning PCR products. **SpringerPlus**, v. 2, n. 441, 2013.

JOACHIMSTHAL, E. *et al.* A mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 capable of ethanol production from glucose in the presence of high acetate concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 2, p. 137–142, 1998.

JONES-BURRAGE, S. E.; KREMER, T. A.; MCKINLAY, J. B. Cell Aggregation and Aerobic Respiration are Important for *Zymomonas mobilis* ZM4 Survival in an Aerobic Minimal Medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 10, p. 1–12, 2019.

KALNENIEKS, U. *et al.* Oxidative phosphorylation in *Zymomonas mobilis*. **Archives of Microbiology**, v. 160, p. 74–79, 1993.

KALNENIEKS, U. *et al.* Membrane d-lactate oxidase in *Zymomonas mobilis*: evidence for a branched respiratory chain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, n. 1, p. 91–97, 1998.

KALNENIEKS, U. Physiology of *Zymomonas mobilis*: Some Unanswered Questions. In: **Advances in Microbial Physiology**. [s.l: s.n.]. v. 51p. 73–117.

KALNENIEKS, U. *et al.* Respiratory behaviour of a *Zymomonas mobilis* adhB::kan<sup>R</sup> mutant supports the hypothesis of two alcohol dehydrogenase isoenzymes catalysing opposite reactions. **FEBS Letters**, v. 580, n. 21, p. 5084–5088, 2006.

KALNENIEKS, U.; BALODITE, E.; RUTKIS, R. Metabolic Engineering of Bacterial Respiration: High vs. Low P/O and the Case of *Zymomonas mobilis*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1–11, 2019.

KALNENIEKS, U.; PAPPAS, K. M.; BETTENBROCK, K. *Zymomonas mobilis* metabolism: Novel tools and targets for its rational engineering. In: **Advances in Microbial Physiology**. 1. ed., Elsevier Ltd., 2020. v. 77

KANAMASA, S. *et al.* Cloning and functional characterization of the *cis*-aconitic acid decarboxylase (CAD) gene from *Aspergillus terreus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 223–229, 2008.

KERR, A. L. *et al.* DNA restriction-modification systems in the ethanologen, *Zymomonas mobilis* ZM4. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 761–769, 2011.

KIESSLING, H.; LINDBERG, B.; MCKAY, J. Some Products of the Metabolism of D-Xylose by *Pullularia pullulans*. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 16, n. 8, p. 1858–1862, 1962.

KINOSHITA, K. Über eine neue Aspergillus-Art, *Asp. itaconicus* nov. spec. **The Botanical Magazine**, v. 45, n. 530, p. 45–61, 1931.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10–26, 2004.

KOSAKO, Y. *et al.* Proposal of *Sphingomonadaceae* Fam. nov., consisting of *Sphingomonas* Yabuuchi *et al.* 1990, *Erythrobacter* Shiba and Shimidu 1982, *Erythromicrobium* Yurkov *et al.* 1994, *Porphyrobacter* Fuerst *et al.* 1993, *Zymomonas* Kluyver and van Niel 1936, and *Sandaracinobacter* Yurkov *et al.* 1997, with the Type Genus *Sphingomonas* Yabuuchi *et al.* 1990. **Microbiology and Immunology**, v. 44, n. 7, p. 563–575, 2000.

KOUVELIS, V. N. *et al.* Complete genome sequence of the ethanol producer *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 22, p. 7140–7141, 2009.

KOUVELIS, V. N. *et al.* Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas mobilis* subsp. *pomaceae* Lectotype Strain ATCC 29192. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 18, p. 5049–5050, 2011.

KOUVELIS, V. N. *et al.* Finished Genome of *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* Strain CP4, an Applied Ethanol Producer. **Genome Announcements**, v. 2, n. 1, p. 4–5, 2014.

KOVACH, M. E. *et al.* Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, v. 166, p. 175–176, 1995.

KREMER, T. A. *et al.* N<sub>2</sub> gas is an effective fertilizer for bioethanol production by *Zymomonas mobilis*. **PNAS**, v. 112, n. 7, p. 2222–2226, 2015.

KRULL, S. *et al.* Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 10, p. 4063–4072, 2017.

KURUMBANG, N. P. *et al.* Heterologous expression of a glycosyl hydrolase and cellular reprogramming enable *Zymomonas mobilis* growth on cellobiose. **PLoS ONE**, v. 15, n. 8, p. 1–24, 2020.

LEE, J. W. *et al.* Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 6, p. 536–546, 2012.

LEE, K. J. *et al.* Kinetic studies on a highly productive strain of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 2, n. 8, p. 339–344, 1980.

LEE, K. Y. *et al.* The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 94, p. 1–12, 2010.

LEJEUNE, A.; EVELEIGH, D. E.; COLSON, C. Expression of an endoglucanase gene of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* in *Zymomonas mobilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 49, n. 3, p. 363–366, 1988.

LI, A. *et al.* A clone-based transcriptomics approach for the identification of genes relevant for itaconic acid production in *Aspergillus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 602–611, 2011.

LI, A. *et al.* Enhanced itaconic acid production in *Aspergillus niger* using genetic modification and medium optimization. **BMC Biotechnology**, v. 12, n. 57, 2012.

LI, J. *et al.* Next-generation metabolic engineering of non-conventional microbial cell factories for carboxylic acid platform chemicals. **Biotechnology Advances**, v. 43, n. June, 2020.

LIN, Y. H. *et al.* Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Aspergillus terreus* to alleviate the effect of a short break in aeration during culture. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1067–1072, 2004.

LINGER, J. G.; ADNEY, W. S.; DARZINS, A. Heterologous Expression and Extracellular Secretion of Cellulolytic Enzymes by *Zymomonas mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6360–6369, 2010.

LIU, H. *et al.* High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 244–248, 2012.

LIU, J. *et al.* Protein and metabolic engineering for the production of organic acids.

**Bioresource Technology**, v. 239, p. 412–421, 2017.

LOCKWOOD, L. B.; NELSON, G. E. N. The Oxidation of Pentoses by *Pseudomonas*. **Journal of Bacteriology**, v. 52, p. 581–586, 1946.

LUO, Z.; BAO, J. Secretive expression of heterologous  $\beta$ -glucosidase in *Zymomonas mobilis*. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 29, 2015.

MA, J. *et al.* D-Xyloonic acid: A solvent and an effective biocatalyst for a three-component reaction. **Green Chemistry**, v. 18, p. 1738-1750, 2016.

MALVESSI, E. *et al.* Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2013.

MARINELLI, L. J.; HATFULL, G. F.; PIURI, M. Recombineering - A powerful tool for modification of bacteriophage genome. **Bacteriophage**, v. 2, n. 2, p. 5–14, 2012.

MARKHAM, R. G. **Compositions and Methods for Administering Therapeutically Active Compounds**. Patente número AU-B-43288/89, 1992.

MCCLINTOCK, M. K.; ZHANG, K. Xylose Metabolism and its Metabolic Engineering Applications. In: **Engineering Microbial Metabolism For Chemical Synthesis: Reviews and Perspectives**. 2017, p. 209–235.

MEHTIÖ, T. *et al.* Production and applications of carbohydrate-derived sugar acids as generic biobased chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 904–916, 2016.

MILLIS, N. F. A Study of the Cider-sickness Bacillus - a New Variety of *Zymomonas anaerobia*. **The Journal of General Microbiology**, v. 15, p. 521–528, 1956.

MISAWA, N.; OKAMOTO, T.; NAKAMURA, K. Expression of a cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 167–177, 1988.

MISAWA, N.; YAMANO, S.; IKENAGA, H. Production of  $\beta$ -carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1847–1849, 1991.

MUSATTI, A. *et al.* Can *Zymomonas mobilis* Substitute *Saccharomyces cerevisiae* in Cereal Dough Leavening? **Foods**, v. 7, n. 4, 2018.

MUYRERS, J. P. P. *et al.* RecE/RecT and Red $\alpha$ /Red $\beta$  initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. **Genes and Development**, v. 14, n. 15, p. 1971–1982, 2000.

NEALE, A. D. D. *et al.* The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 154, n. 1, p. 119–124, 1986.

NIU, W.; MOLEFE, M. N.; FROST, J. W. Microbial Synthesis of the Energetic Material Precursor 1,2,4-Butanetriol. **JACS Communications**, v. 125, p. 12998–12999, 2003.

NYGÅRD, Y. *et al.* Bioconversion of D-xylose to D-xylonate with *Kluyveromyces lactis*. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 383–391, 2011.

NYGÅRD, Y. *et al.* Single cell and in vivo analyses elucidate the effect of *xylC* lactonase during production of D-xylonate in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 25, p. 238–247, 2014.

OHSUGI, M.; TOCHIKURA, T.; OGATA, K. The Production of d-Xylonic Acid by *Micrococcus* sp. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 357–363, 1970.

OKAMOTO, S. *et al.* Production of itaconic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. **Journal of Genetic and Applied Microbiology**, v. 60, p. 191–197, 2014.

OKAMOTO, S. *et al.* Production of itaconic acid in *Escherichia coli* expressing recombinant  $\alpha$ -amylase using starch as substrate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, p. 548–553, 2015.

OTTEN, A.; BROCKER, M.; BOTT, M. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of itaconate. **Metabolic Engineering**, v. 30, p. 156–165, 2015.

PAPPAS, K. M. *et al.* Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* Lectotype Strain ATCC 10988. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 18, p. 5051–5052, 2011.

POOLE, R. K.; COOK, G. M. Redundancy of Aerobic Respiratory Chains in Bacteria? Routes, Reasons and Regulation. **Advances in Microbial Physiology**, v. 43, p. 165–224, 2000.

PUJOS, P.; JIJAKLI, M. H. **Compositions for use against one or more pathogens**. Patente número US 8828450, 2014.

PYNE, M. E. *et al.* Coupling the CRISPR/Cas9 system with lambda red recombineering enables simplified chromosomal gene replacement in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 15, p. 5103–5114, 2015.

QIU, M. *et al.* Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for anaerobic isobutanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 15, p. 1–14, 2020.

RAMOS, J. L.; DUQUE, E. Twenty-first-century chemical odyssey: fuels versus commodities and cell factories versus chemical plants. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 2,

p. 200–209, 2019.

REYES, L.; SCOPES, R. K. Membrane-associated ATPase from *Zymomonas mobilis*; purification and characterization. **BBA - Biomembranes**, v. 1068, n. 2, p. 174–178, 1991.

RITTER, S. K. **Lignocellulose: A Complex Biomaterial**. Disponível em: <<https://cen.acs.org/articles/86/i49/Lignocellulose-Complex-Biomaterial.html>>. Acesso em: 8 jul. 2020.

ROGERS, P. L. *et al.* Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 37–84, 1982.

ROGERS, P. L. *et al.* *Zymomonas mobilis* for Fuel Ethanol and Higher Value Products. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 263–288, 2007.

RUTKIS, R. *et al.* The inefficient aerobic energetics of *Zymomonas mobilis*: Identifying the bottleneck. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 1090–1097, 2014.

RUTKIS, R. *et al.* The Low Energy-Coupling Respiration in *Zymomonas mobilis* Accelerates Flux in the Entner-Doudoroff Pathway. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–15, 2016.

SATORY, M. *et al.* Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 12, p. 1205–1208, 1997.

SAUER, M. *et al.* Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 100–108, 2007.

SCHLEIF, R. DNA looping. **Annual Review of Biochemistry**, v. 61, p. 199–223, 1992.

SENTHILKUMAR, V. *et al.* Disruption of the *Zymomonas mobilis* extracellular sucrose gene (*sacC*) improves levan production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 4, p. 671–676, 2004.

SEO, J. S. *et al.* **Method for mass production of primary metabolites, strain for mass production of primary metabolites, and method for preparation thereof**. Patente número: US 2009/0162910 A1, 2009.

SEO, J. S. *et al.* The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 63–68, 2005.

SHIMWELL, J. L. Study of a new type of beer disease bacterium (*Achromobacter anaerobium* Sp. nov.) producing alcoholic fermentation of glucose. **Journal of the Institute of Brewing**, p. 507–509, 1937.

SHIMWELL, J. L. *Saccharomonas*, a proposed new genus for bacteria producing a

quantitative alcoholic fermentation of glucose. **Journal of the Institute of Brewing**, p. 179–182, 1950.

SHUI, Z. X. *et al.* Adaptive laboratory evolution of ethanogenic *Zymomonas mobilis* strain tolerant to furfural and acetic acid inhibitors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5739–5748, 2015.

SILVA-MARTINEZ, M. *et al.* Simultaneous Enzymatic Synthesis of Gluconic Acid and Sorbitol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70–72, p. 863–868, 1998.

SILVEIRA, M. M. *et al.* Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 99–103, 1999.

SKERKER, J. M. *et al.* Dissecting a complex chemical stress: Chemogenomic profiling of plant hydrolysates. **Molecular Systems Biology**, v. 9, n. 674, 2013.

SOOTSUWAN, K. *et al.* Analysis of the respiratory chain in ethanogenic *Zymomonas mobilis* with a cyanide-resistant bd-type ubiquinol oxidase as the only terminal oxidase and its possible physiological roles. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 163–175, 2008.

STEIGER, M. G. *et al.* Itaconic Acid - An Emerging Building Block. In: WITTMANN, C.; LIAO, J. C. (Eds.). **Industrial Biotechnology - Products and Process**. First Edit ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2017.

STRAZDINA, I. *et al.* Electron transport and oxidative stress in *Zymomonas mobilis* respiratory mutants. **Archives of Microbiology**, v. 194, n. 6, p. 461–471, 2012.

STROHDEICHER, M. *et al.* Electron transport chain of *Zymomonas mobilis* - Interaction with the membrane-bound glucose dehydrogenase and identification of ubiquinone 10. **Archives of Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 536–543, 1990.

SUN, L. *et al.* Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. **Nature**, v. 490, p. 361–366, 2012.

SUNDAR, M. S. L. *et al.* Heterologous expression of genes for bioconversion of xylose to xylonic acid in *Corynebacterium glutamicum* and optimization of the bioprocess. **AMB Express**, v. 10, n. 1, 2020.

SUZUKI, T.; ONISHI, H. The Production of Xylitol and D-Xylonic Acid by Yeast. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 31, n. 10, p. 1233–1236, 1967.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The Biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1–46, 1977.

TAI, Y. S. *et al.* Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 4, p. 247–253, 2016.

TEVŽ, G.; BENČINA, M.; LEGIŠA, M. Enhancing itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1657–1664, 2010.

TOIVARI, M. *et al.* Low pH D-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 555–562, 2013.

TOIVARI, M. H. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* engineered to produce D-xylonate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, p. 751–760, 2010.

TOIVARI, M. H. *et al.* Microbial D-xylonate production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1–8, 2012a.

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

TURNER, E. (ED.). **Elements of Chemistry, Including the Actual State and Prevalent Doctrines of the Science**. Sixth Ed ed. Philadelphia: Cowperthwait & Co., 1840.

VASAN, P. T. *et al.* Cellulosic ethanol production by *Zymomonas mobilis* harboring an endoglucanase gene from *Enterobacter cloacae*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2585–2589, 2011.

VUORISTO, K. S. *et al.* Metabolic engineering of itaconate production in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 221–228, 2015.

WANG, J. *et al.* Anaerobic Fermentation for Production of Carboxylic Acids as Bulk Chemicals from Renewable Biomass. In: **Anaerobes in Biotechnology**. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2016. p. 323–361.

WANG, W. *et al.* Genome shuffling enhances stress tolerance of *Zymomonas mobilis* to two inhibitors. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 288, 2019.

WANG, Y. *et al.* Biosynthesis of ethylene glycol from d-xylose in recombinant *Escherichia coli*. **Bioengineered**, v. 9, n. 1, p. 233–241, 2018.

WECKER, M. S. A.; ZALL, R. R. Production of Acetaldehyde by *Zymomonas mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 2815–2820, 1987.

WEIMBERG, R. Pentose Oxidation by *Pseudomonas fragi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. 3, p. 629–635, 1961.

WEISSER, P.; KRÄMER, R.; SPRENGER, G. A. Expression of the *Escherichia coli pmi* gene, Encoding Phosphomannose-Isomerase in *Zymomonas mobilis*, Leads to Utilization of Mannose as a Novel Growth Substrate, Which Can Be Used as a Selective Marker.

**Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4155–4161, 1996.

WERPY, T.; PETERSEN, G. **Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I — Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas**. 2004.

WU, B. *et al.* Construction of a novel secretion expression system guided by native signal peptide of PhoD in *Zymomonas mobilis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 78, n. 4, p. 708–713, 2014.

WU, Y. *et al.* RecET recombination system driving chromosomal target gene replacement in *Zymomonas mobilis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 118–124, 2017.

YABLONSKY, M. D. *et al.* *Zymomonas mobilis* CP4: a clarification of strains via plasmid profiles. **Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 71–79, 1988.

YANASE, H.; NOZAKI, K.; OKAMOTO, K. Ethanol production from cellulosic materials by genetically engineered *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 4, p. 259–263, 2005.

YANG, S. *et al.* Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis*. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 893–894, 2009a.

YANG, S. *et al.* Transcriptomic and metabolomic profiling of *Zymomonas mobilis* during aerobic and anaerobic fermentations. **BMC Genomics**, v. 10, n. 34, 2009b.

YANG, S. *et al.* Insights into acetate toxicity in *Zymomonas mobilis* 8b using different substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 140, 2014a.

YANG, S. *et al.* Elucidation of *Zymomonas mobilis* physiology and stress responses by quantitative proteomics and transcriptomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–13, 2014b.

YANG, S. *et al.* Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for 2,3-butanediol production from lignocellulosic biomass sugars. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 189, 2016.

YANG, S. *et al.* Complete genome sequence and the expression pattern of plasmids of the model ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 and its xylose-utilizing derivatives 8b and 2032. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 125, 2018.

YANG, Y. *et al.* Prediction and characterization of promoters and ribosomal binding sites of *Zymomonas mobilis* in system biology era. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 52, p. 1–13, 2019.

YI, X. *et al.* Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms

of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 153, p. 1–15, 2015.

YIM, S. S. *et al.* Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Consolidated Conversion of Hemicellulosic Biomass into Xylonic Acid. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 1700040, 2017.

YIN, X. *et al.* Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: Advances and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 830–841, 2015.

YOON, K. H.; PACK, M. Y. Transfer of *Bacillus subtilis* endo- $\beta$ -1,4-glucanase gene into *Zymomonas anaerobia*. **Biotechnological Letters**, v. 10, n. 3, p. 213–216, 1988.

ZACHARIOU, M.; SCOPES, R. K. K. Glucose-Fructose Oxidoreductase, a New Enzyme Isolated from *Zymomonas mobilis* That Is Responsible for Sorbitol Production. **Journal of Bacteriology**, v. 167, n. 3, p. 863–869, 1986.

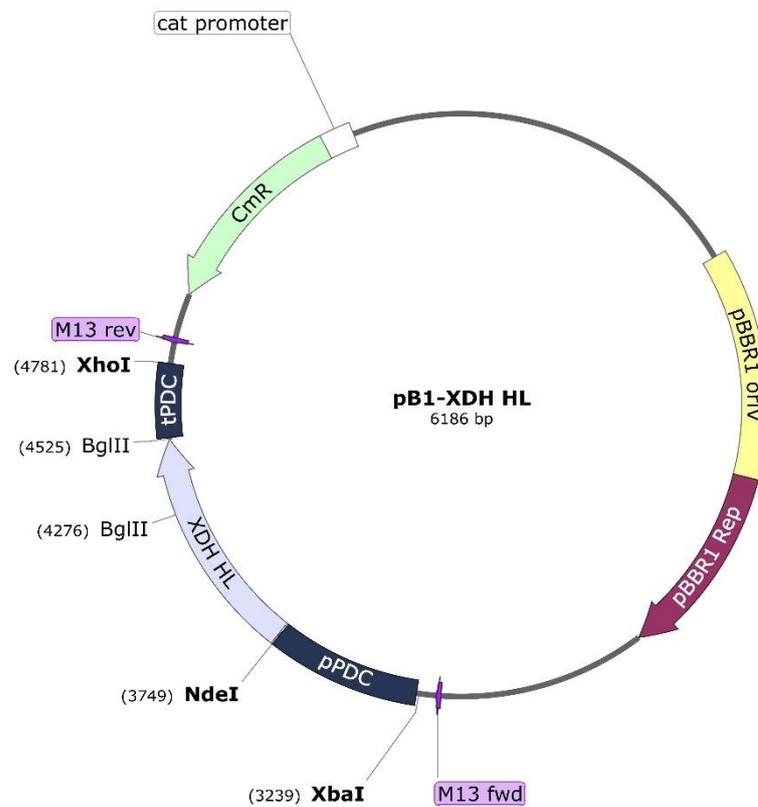
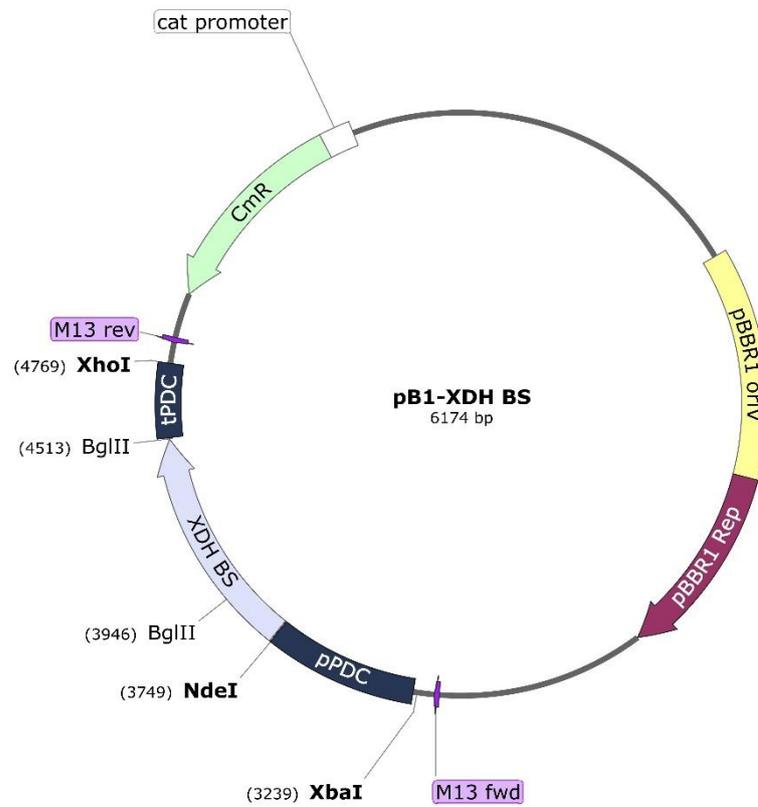
ZHANG, M. *et al.* Metabolic Engineering of a Pentose Metabolism Pathway in Ethanologenic *Zymomonas mobilis*. **Science**, v. 267, p. 240–243, 1995.

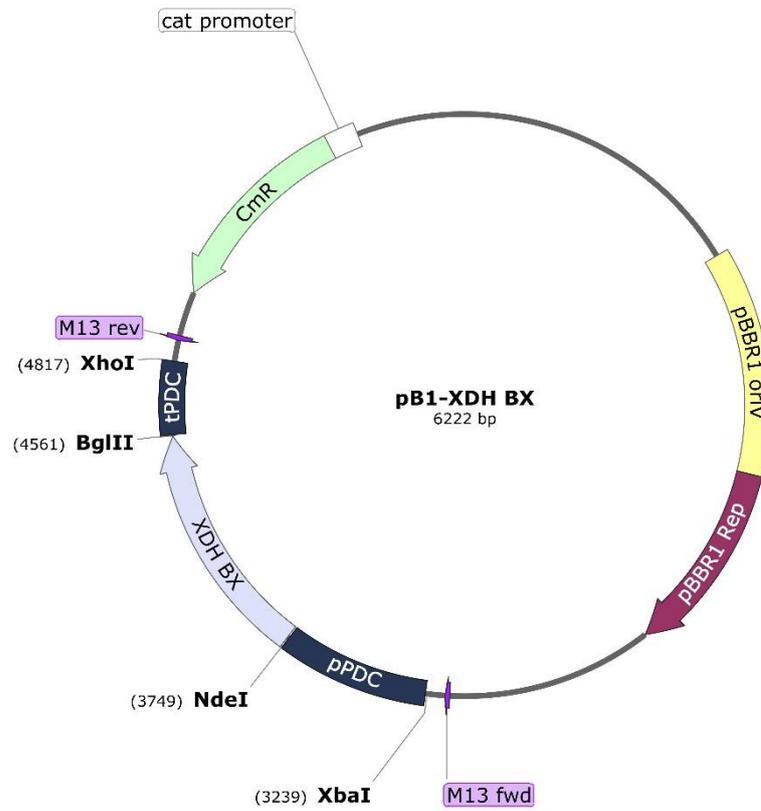
ZHANG, Y. *et al.* Production of D-Xylonate from Corn Cob Hydrolysate by a Metabolically Engineered *Escherichia coli* Strain. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 7, p. 2160–2168, 2019.

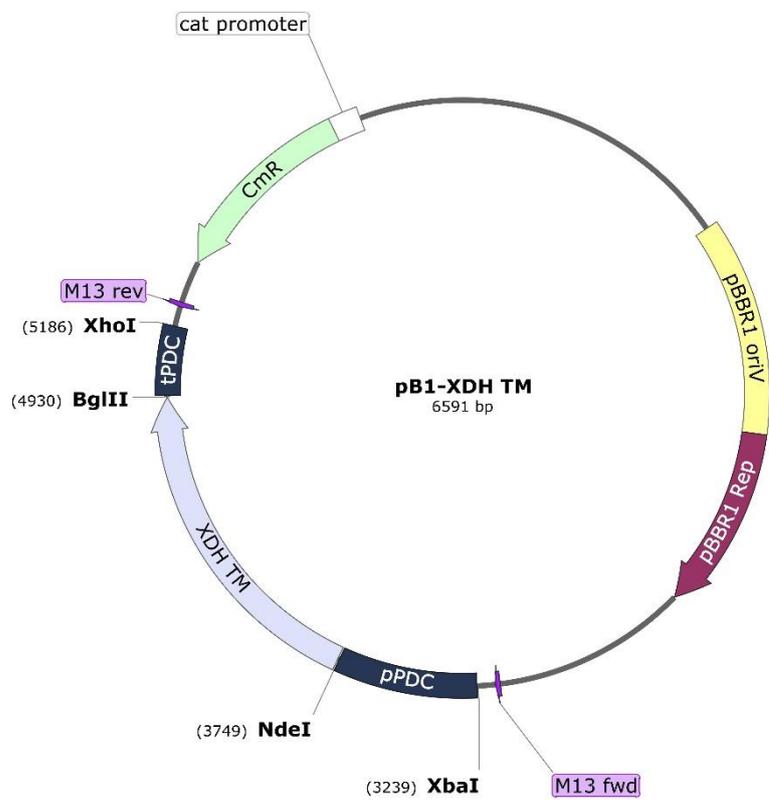
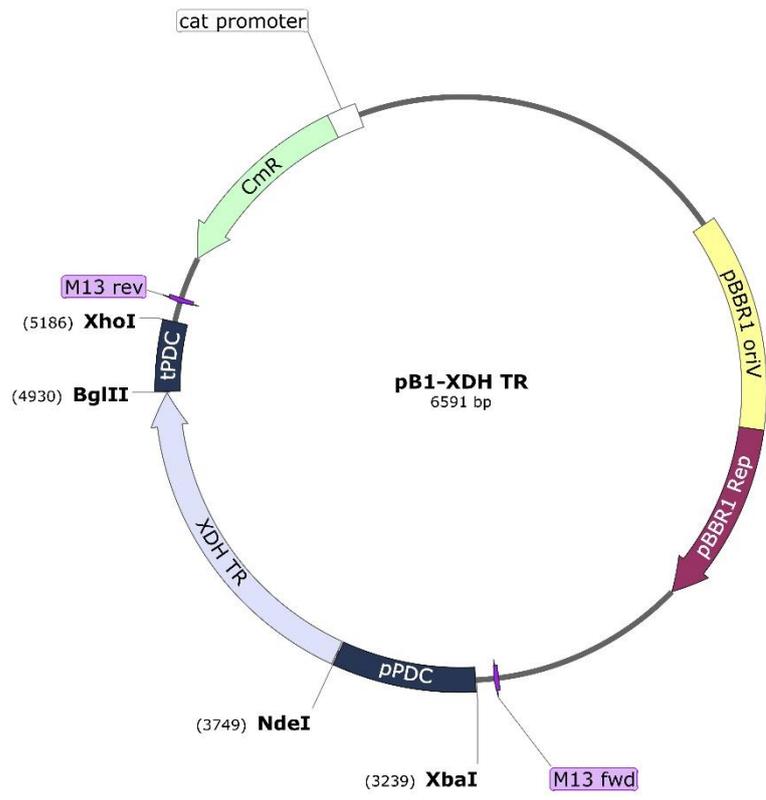
ZOU, S. L. *et al.* Construction of an unmarked *Zymomonas mobilis* mutant using a site-specific FLP recombinase. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 4, p. 406–411, 2012.

## 8. Apêndices

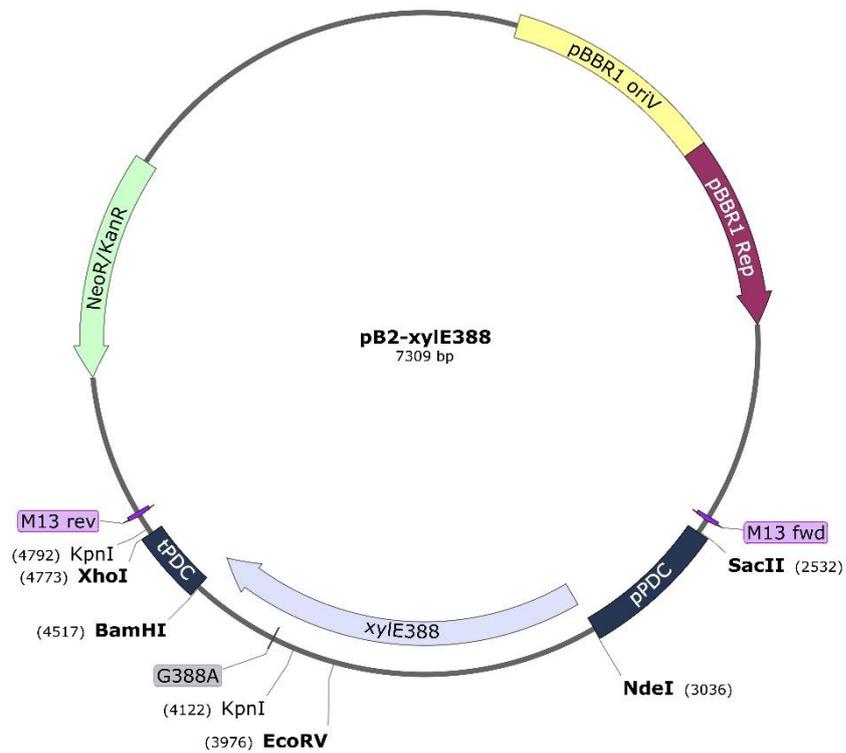
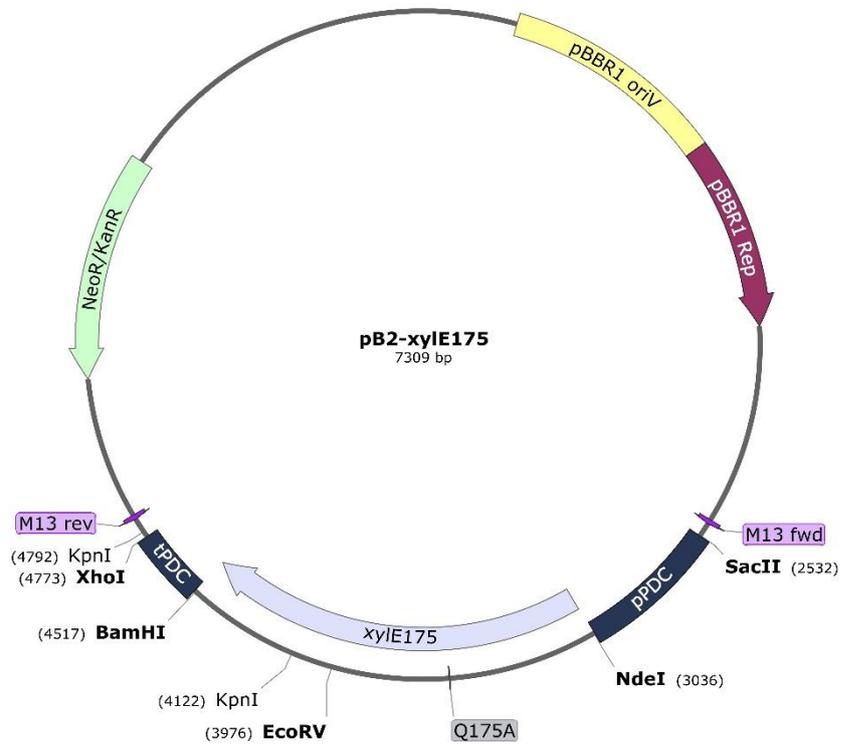
### 8.1 Mapas de restrição dos vetores de expressão dos genes XDH







## 8.2 Mapas de restrição dos vetores de expressão contendo o gene *xylE*



## 8.3 Artigo publicado – Resultados apresentados no Capítulo II



Article

# Engineering *Zymomonas mobilis* for the Production of Xylonic Acid from Sugarcane Bagasse Hydrolysate

Christiane Ribeiro Janner Herrera<sup>1</sup>, Vanessa Rodrigues Vieira<sup>1</sup>, Tiago Benoliel<sup>1</sup> , Clara Vida Galvão Corrêa Carneiro<sup>1,2</sup>, Janice Lisboa De Marco<sup>1</sup>, Lídia Maria Pepe de Moraes<sup>1</sup>, João Ricardo Moreira de Almeida<sup>2</sup> and Fernando Araripe Gonçalves Torres<sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil; chrisrjanner@gmail.com (C.R.J.H.); nessa.vrv@gmail.com (V.R.V.); tbenoliel@gmail.com (T.B.); claravidac@hotmail.com (C.V.G.C.C.); janicedemarco@uol.com.br (J.L.D.M.); lmoraes@unb.br (L.M.P.d.M.)
- <sup>2</sup> Laboratório de Genética e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Embrapa, Agroenergia, W3 Norte, Brasília 70770-901, DF, Brazil; joao.almeida@embrapa.br
- \* Correspondence: ftorres@unb.br

**Abstract:** Sugarcane bagasse is an agricultural residue rich in xylose, which may be used as a feedstock for the production of high-value-added chemicals, such as xylonic acid, an organic acid listed as one of the top 30 value-added chemicals on a NREL report. Here, *Zymomonas mobilis* was engineered for the first time to produce xylonic acid from sugarcane bagasse hydrolysate. Seven coding genes for xylose dehydrogenase (XDH) were tested. The expression of XDH gene from *Paraburkholderia xenovorans* allowed the highest production of xylonic acid ( $26.17 \pm 0.58 \text{ g L}^{-1}$ ) from  $50 \text{ g L}^{-1}$  xylose in shake flasks, with a productivity of  $1.85 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and a yield of  $1.04 \pm 0.04 \text{ g AX/gX}$ . Deletion of the xylose reductase gene further increased the production of xylonic acid to  $56.44 \pm 1.93 \text{ g L}^{-1}$  from  $54.27 \pm 0.26 \text{ g L}^{-1}$  xylose in a bioreactor. Strain performance was also evaluated in sugarcane bagasse hydrolysate as a cheap feedstock, which resulted in the production of  $11.13 \text{ g L}^{-1}$  xylonic acid from  $10 \text{ g L}^{-1}$  xylose. The results show that *Z. mobilis* may be regarded as a potential platform for the production of organic acids from cheap lignocellulosic biomass in the context of biorefineries.

**Keywords:** xylose; lignocellulosic biomass; xylonic acid; *Zymomonas mobilis*



**Citation:** Herrera, C.R.J.; Vieira, V.R.; Benoliel, T.; Carneiro, C.V.G.C.; De Marco, J.L.; de Moraes, L.M.P.; de Almeida, J.R.M.; Torres, F.A.G. Engineering *Zymomonas mobilis* for the Production of Xylonic Acid from Sugarcane Bagasse Hydrolysate. *Microorganisms* 2021, 9, 1372. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071372>

Academic Editor: Edward A. Bayer

Received: 19 May 2021

Accepted: 18 June 2021

Published: 24 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

To be able to change the economy from a fossil oil-based to a bio-based one, it is of utmost importance to achieve the harnessing of the entire potential of the lignocellulosic biomass [1], since it is the only carbon-rich material source available on earth other than fossils [2]. The sustainable processing of biomass in the context of biorefinery would lead to the productions of a wide range of products [3,4], including chemicals. The carbohydrate portion of lignocellulosic biomass consists predominately of the hexose sugar glucose, being the amount of xylose present in the hemicellulosic fraction highly dependent on the type of lignocellulosic material. For instance, xylose makes up approximately 23% of carbohydrates present in the sugarcane bagasse [5]. The utilization of this pentose is highly desirable for biomass valorization. Moreover, the separation of the hemicellulosic hydrolysate from the cellulosic fraction may be advantageous for an efficient conversion of xylose into valuable compounds.

Xylose has been widely considered in the production of ethanol [6–11], but it can also be used in the production of other high-value products such as xylitol [12] and levulinic acid [13]. It may also be in the production of xylonic acid, an organic acid listed as one of the top 30 value-added chemicals on a NREL report [14]. Sixteen of these chemicals are carboxylic acids; this underlines their importance as building blocks in the chemical industry, and its production from renewable sources is also possible [15].

Xylonic acid has a wide range of applications. In the pharmaceutical and cosmetic industries, it can be used as an additive in antiaging and skin renovation products to enhance skin penetration [16], as an antimicrobial agent [17] and in adsorption and retention of vitamin C [18]. Xylonic acid is also a 1,2,4-butanetriol precursor [19] and can be used as dispersant in cement [20], as well as a green solvent and catalyst for organic reactions [21]. In general, it is an alternative to gluconic acid, having the advantage of not competing with the food industry [22].

The microbial production of xylonic acid has been known since the 19th century [23], but it was only in the 1980's that it attracted interest due to its similarity to gluconic acid along with the possibility of using cheap lignocellulosic biomass as raw material for its production. A comparison of *Pseudomonas fragi* and *Gluconobacter oxydans* strains for native production of xylonic acid from hemicellulosic biomass showed that the latter was more efficient due to its better tolerance towards inhibitors present in hemicellulose hydrolysates [24]. Besides *G. oxydans*, *Paraburkholderia sacchari* is also a native producer of xylonic acid, and, more recently, volumetric productivities as high as  $4.69 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [25] and  $7.7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [26] were achieved by *G. oxydans* and *P. sacchari*, respectively. This native production of xylonic acid is possible due to the presence of an alternative xylose oxidation pathway discovered in *P. fragi* [27]. In this pathway, xylose is converted into xylonolactone by xylose dehydrogenase (XDH), which in turn is converted into xylonate by xylonolactonase (XL), even though xylonolactone can also undergo spontaneous hydrolysis to form xylonate. The pathway continues for three more steps to form  $\alpha$ -ketoglutarate, an intermediate of the tricarboxylic acid cycle [28].

Other microorganisms were also engineered to produce xylonic acid by the heterologous expression of XDH genes with or without co-expression of XL. The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* [29,30] and *Kluyveromyces lactis* [31], as well as the bacteria *Escherichia coli* [32,33] and *Corynebacterium glutamicum* [34], were modified in such a way. In *E. coli*, for instance, a metabolic engineering approach using programmable switches resulted in productivities up to  $7.12 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [35], showing the potential of prokaryotic systems for xylonic acid production. In these studies, the XDH genes employed were either *xyd1* from *Trichoderma reesei* or *xydB* from *Caulobacter crescentus*. Bioprocess development may need the search of new XDH genes which could ultimately lead to more efficient strains [36].

*Zymomonas mobilis* is a facultative anaerobe bacterium that aroused interest in the industrial production of ethanol and other value-added products. It utilizes the Entner-Doudoroff pathway, which allows fermentation with 50% less ATP production than Embden-Meyerhof-Parnas pathway, leads to a lower biomass yield and a higher uptake rate of sugars when compared to yeasts [37]. A high level production of native organic acids has been achieved in *Z. mobilis* [38] and strains with tolerance to inhibitors found in biomass hydrolysates have been isolated [37], others being engineered for the same purpose [39]. The tolerance to inhibitors is an important phenotype when utilizing lignocellulosic biomass hydrolysate, since its pre-treatment generate molecules such as furfural and 5-hydroxymethylfurfural as products of sugar degradation, being acetic acid ubiquitous in this material [40].

Given these features, we sought in this work the engineering of *Z. mobilis* for the production of xylonic acid from sugarcane bagasse hydrolysate as an inexpensive lignocellulosic feedstock. Using a rich medium, *Z. mobilis* achieved a productivity as high as  $1.85 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and a yield of  $1.04 \pm 0.04 \text{ g}_{\text{AX}} / \text{g}_{\text{X}}$ . When sugarcane bagasse hydrolysate was used as a cheap feedstock, *Z. mobilis* was able to produce  $11.13 \text{ g L}^{-1}$  xylonic acid from  $10 \text{ g L}^{-1}$  xylose, showing that this bacterium may be regarded as a potential platform for the production of organic acids from lignocellulosic biomass.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Strains and Growth Conditions

*Z. mobilis* ZM4 (ATCC 31821) was used in this work as the host for xylonic acid production. It was routinely grown in regular RM medium (20 g L<sup>-1</sup> glucose, 10 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 2 g L<sup>-1</sup> potassium phosphate monobasic, 1 g L<sup>-1</sup> ammonium sulphate and 1 g L<sup>-1</sup> magnesium sulphate) at 30 °C. For solid medium, 15 g L<sup>-1</sup> agar was added. The initial pH of the medium was 6.0.

*E. coli* strains DH5 $\alpha$  and XL10-Gold were utilized for cloning purposes. Cells were routinely grown in an LB medium (10 g L<sup>-1</sup> peptone, 10 g L<sup>-1</sup> NaCl and 5 g L<sup>-1</sup> yeast extract) at 37 °C. For a solid medium, 15 g L<sup>-1</sup> agar was added. After transformation, cells were plated in solid medium containing the appropriated antibiotic (30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> chloramphenicol or 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> spectinomycin). All plasmids were amplified in *E. coli* JM110 in order to demethylate the DNA prior to *Z. mobilis* transformation.

### 2.2. Strains Construction

#### 2.2.1. Strains Overexpressing XDH

Putative genes encoding for XDH were identified previously through the construction of phylogenetic trees [36]. In this work we expressed seven XDH genes which were named with a 2 letter code: CC (*xydB* from *C. crescentus*—accession # WP\_010918706.1), TR (*xydI* from *T. reesei*—accession # XP\_006961719.1), BS (*Brevundimonas subvibrioides*—accession # WP\_013270350.1), HL (*Halomonas lutea*—accession # WP\_019016846.1), AP (SAR116 cluster alpha proteobacterium HIMB100—accession # WP\_009605364.1), BX (*Paraburkholderia xenovorans*—accession # ABE37211.1) and YM (*Phaeoacremonium minimum*—accession # XP\_007915223.1).

Genes encoding XDH were synthesized de novo and cloned into pMA-T (Epoch Biosciences). Specific genes were amplified from these plasmids and cloned as NdeI-BglII fragments by using In-Fusion HD EcoDry (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) or NEBuilder HiFi DNA Assembly (New England Biolabs, Ipswich, MA, United States of America) into vector pBBR1MSC1 (chloramphenicol-resistance marker) [41], which was previously modified to contain the promoter and transcriptional termination regions from the *pdC* gene from *Z. mobilis* [42]. Plasmids constructed in this study were called pB1-XDH followed by the name of the cloned XDH gene. Primers used for these amplifications are listed in Table S1.

Gene BX was also co-expressed with XL from *P. xenovorans* (KEGG entry Bxe\_C1362) in *Z. mobilis*. To achieve this, XL was synthesized de novo by Integrated DNA Technologies (IDT—Coralville, IA, USA) as a linearized DNA fragment and cloned into pB1-XDH BX digested with BglII in order to form an operon controlled by the *pdC* promoter. The resulting plasmid was called pB1-BXL.

*Z. mobilis* was transformed by electroporation. Briefly, cells were grown until an OD<sub>600</sub> of 0.3 and washed twice with 10% glycerol. Cells were electroporated in a 0.2 cm cuvette using the following parameters: 2.5 kV, 200  $\Omega$  and 25  $\mu$ F. After the pulse, cells were recovered by adding 900  $\mu$ L RM medium following incubation at 30 °C with agitation of 600 rpm in a dry bath incubator for 4 to 18 h. Once recovered, cells were plated in solid RM medium with the appropriated antibiotic (100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> chloramphenicol or 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> spectinomycin) for selection of transformants. Plates were incubated at 30 °C for 48 to 96 h. Table 1 shows the strains overexpressing XDH.

**Table 1.** *Z. mobilis* strains used in this work.

Strain	Genotype	Reference
ZM4	wild-type <i>Z. mobilis</i> ZM4	ATCC 31821
ZM4 CC	ZM4 containing pB1-XDH CC	This work
ZM4 BS	ZM4 containing pB1-XDH BS	This work
ZM4 HL	ZM4 containing pB1-XDH HL	This work
ZM4 AP	ZM4 containing pB1-XDH AP	This work
ZM4 BX	ZM4 containing pB1-XDH BX	This work
ZM4 TR	ZM4 containing pB1-XDH TR	This work
ZM4 TM	ZM4 containing pB1-XDH TM	This work
ZM4 BXL	ZM4 containing pB1-BXL	This work
ZM4 C-	ZM4 containing the empty vector pBBR1MCS1	This work
ZMa	ZM4, $\Delta$ ZMO0976	This work
ZMb	ZM4, $\Delta$ ZMO1237	This work
ZMc	ZM4 $\Delta$ ZMO0976, $\Delta$ ZMO1237	This work
ZMa BX	ZMa containing pB1-XDH BX	This work
ZMb BX	ZMb containing pB1-XDH BX	This work
ZMc BX	ZMc containing pB1-XDH BX	This work
ZMa C-	ZMa containing the empty vector pBBR1MCS1	This work
ZMb C-	ZMb containing the empty vector pBBR1MCS1	This work
ZMc C-	ZMc containing the empty vector pBBR1MCS1	This work

### 2.2.2. Construction of Gene Deletion Cassettes and Marker Excision

Gene deletion in *Z. mobilis* was carried out by homologous recombination. Target genes were ZMO\_RS04375 (old locus tag ZMO0976, an aldo/keto reductase) and ZMO\_RS05565 (old locus tag ZMO1237, a D-lactate dehydrogenase). Primers used for construction of gene deletion cassettes and to confirm events of integration and marker excision are listed in Table S1. Briefly, upstream and downstream sequences of ~500 bp flanking the coding regions of each gene to be deleted were amplified from the *Z. mobilis* genome. Deletion cassettes were constructed in vitro by using the NEBuilder HiFi DNA Assembly protocol (NEB). Reactions consisted of 5'-upstream and 3'-downstream amplicons, a spectinomycin resistance marker flanked by *loxP* sites and the cloning vector pPCV [43] linearized with KpnI and SacI. After amplification in *E. coli*, the resulting vectors were used to transform *Z. mobilis* following selection on plates containing spectinomycin. Gene deletion was confirmed by PCR. In order to excise the spectinomycin marker, the Cre recombinase gene was heterologously expressed. This gene was amplified from pYRCre2 vector [44] and cloned as a NdeI-BglII fragment into pBBR1MCS1 [41] as described previously. The resulting vector was transformed into the knockout strains. A single colony was streaked on RM plates with no antibiotic in order to obtain isolated colonies. Single colonies were individually transferred to three separated plates containing chloramphenicol, spectinomycin or no antibiotics. Colonies that grew only in medium without antibiotics were submitted to genomic PCR for confirmation. All strains constructed in this work are presented in Table 1.

### 2.3. Strain Selection

For the initial screening for XDH activity, fermentations were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL modified RM 1 (RM supplied with 5 g L<sup>-1</sup> glucose, 50 g L<sup>-1</sup> xylose, which was defined in this work). Cells were first grown in 100 mL of regular RM and then inoculated at OD<sub>600</sub> of 7.0 in modified RM. The high initial cell concentration was used seeking improvement in volumetric productivities and evaluate XDH activity. Xylonic acid production was carried out at 30 °C and 200 rpm. The deleted strains and the strain co-expressing BX and XL were evaluated in the same way. All tests were performed in triplicates.

#### 2.4. Xylonic Acid Production

A selected strain was grown in regular RM and inoculated at an  $OD_{600} =$  of 1.0 in a 1 L-scale laboratory bioreactor (Multifors 2, Infors AG, Basel, Switzerland) containing 500 mL modified RM 2 (RM supplied with 20 g L<sup>-1</sup> glucose, 50 g L<sup>-1</sup> xylose) at 30 °C, pH 6.0, stirring speed at 200 rpm and airflow at 0.3 vvm. The medium and conditions were defined in this work. The pH was maintained by addition of 3 M KOH and the experiment was performed in duplicates.

To investigate the ability of using lignocellulosic hydrolysate in the xylonic acid production by *Z. mobilis*, another fermentation was performed using C5 hydrolysate from sugarcane bagasse (8.5 g L<sup>-1</sup> glucose, 100 g L<sup>-1</sup> xylose, 20 g L<sup>-1</sup> acetate, 1 g L<sup>-1</sup> 5-hydroxymethylfurfural and 2 g L<sup>-1</sup> furfural), which was added at 10% in defined medium (2 g L<sup>-1</sup> potassium phosphate monobasic, 1 g L<sup>-1</sup> ammonium sulphate, 1 g L<sup>-1</sup> magnesium sulphate, 0.2 g L<sup>-1</sup> calcium chloride, 25 mg L<sup>-1</sup> sodium molybdate, 25 mg L<sup>-1</sup> ferrous sulphate, 0.05 mg L<sup>-1</sup> calcium pantothenate, 0.05 mg L<sup>-1</sup> thiamine, 0.02 mg L<sup>-1</sup> biotin and 0.05 mg L<sup>-1</sup> nicotinic acid). Glucose was supplemented to a final concentration of 20 g L<sup>-1</sup>. The fermentation was performed in a 1 L-scale laboratory bioreactor (Multifors 2) containing 500 mL of medium at 30 °C, pH 6.0, stirring speed at 200 rpm and airflow at 0.3 vvm. The pH was maintained by addition of 3 M KOH.

#### 2.5. Growth Tests in Microplates

ZM4 BXL strain had its growth compared to ZM4 BX and a negative control in microplates. A fresh culture was inoculated in 2 mL of regular RM or modified RM 2 medium with appropriate antibiotic to achieve a  $OD_{600} = 0.15$  in a 12-well plate. The culture was incubated at 30 °C and 200 rpm, and the cell growth performed in Epoch Microplate Spectrophotometer (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, United States of America) with data collection at every 30 min. This experiment was conducted in triplicates.

#### 2.6. Calculation of Productivity, Yield and Specific Growth Rate

The volumetric productivity was calculated by plotting the production of xylonic acid versus the culture time and the slope of the resulting linear regression was assumed as the volumetric productivity. Similarly, the yield is equal to the slope obtained by performing a linear regression of the plot of the production of xylonic acid versus the consumed xylose. The specific growth rate was calculated by plotting the logarithm of the cell density versus the culture time during the exponential growth phase and the slope of the linear regression was considered as the maximum specific growth rate.

#### 2.7. Analytical Methods

Extracellular glucose, xylose and xylonic acid were analyzed by HPLC (LC-20A Prominence—Shimadzu) equipped with a Rezex ROA-Organic Acid (300 × 7.8 mm) column maintained at 55 °C and using 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as mobile phase at a flow rate of 0.4 mL min<sup>-1</sup> [32]. Glucose and xylose peaks were detected with a refractive index detector (RID-10A), whereas xylonic acid peaks were detected and quantified from an UV/VIS detector (SPD-20A). Once xylonic acid and xylose have the same retention time, when the former was present the latter was indirectly quantified by subtracting the xylonic acid peak (quantified by UV) from the combined xylose and xylonic acid peaks detected by RID [34].

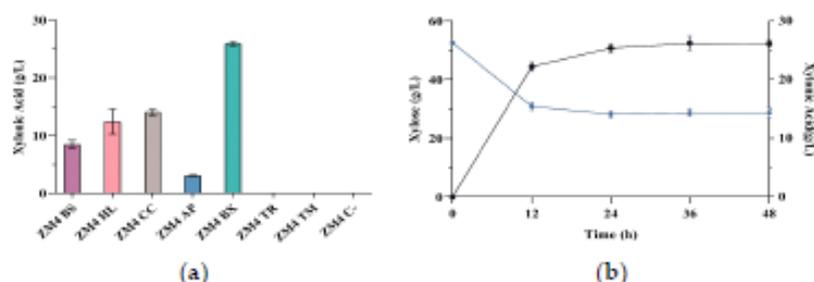
### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Xylonic Acid Production by *Z. mobilis* Expressing XDH Genes

*Z. mobilis* has the potential to establish a novel platform for the production of different molecules of biotechnological interest, playing a critical role in the replacements of petrochemical products [45]. This includes the production of aldonic acids, such as xylonic acid, due to the presence of the enzyme glucose-fructose oxidoreductase (GFOR), which is responsible for the conversion of fructose and glucose into sorbitol and gluconolactone, respectively [46]. GFOR also shows affinity for xylose, converting 42% of this sugar to

xylonic acid in the presence of fructose [47]. However, GFOR has a disadvantage due to its requirement of a co-substrate, fructose, which is expensive and would lead to by-product formation [47]. Alternatively, the heterologous expression of a xylose dehydrogenase gene may be accomplished for the same purpose.

To evaluate the ability of *Z. mobilis* to produce xylonic acid from XDH, seven different genes were overexpressed in this bacterium (Table 1), including a control (CC) from *C. crescentus* which is widely used in microbial metabolic engineering for the production of this organic acid. The seven strains were cultivated in a modified RM medium containing 5 g L<sup>-1</sup> glucose as a carbon source and 50 g L<sup>-1</sup> xylose as the substrate for xylonic acid production. The efficiencies of these strains towards the production of xylonic acid after 48 h of cultivation in shake flasks are shown in Figure 1a; Table 2 shows the production and productivity achieved by each strain in this experiment. The expression of five different prokaryotic XDH genes resulted in different levels of xylonic acid production. Interestingly, *Z. mobilis* strains expressing the two eukaryotic XDH genes, TR and TM, did not produce detectable amounts of xylonic acid, hence they were not further used in this work. Remarkably, strain ZM4 BX, which carries the XDH gene from *P. xenovorans*, showed a ~2-fold improvement in xylonic acid production when compared to the control ZM4 CC. In this particular experiment, ZM4 BX produced  $26.17 \pm 0.58$  g L<sup>-1</sup> xylonic acid with a yield of  $1.04 \pm 0.04$  g<sub>AX</sub>/g<sub>X</sub>, which represents 93.7% of the maximum theoretical yield, showing that almost all consumed xylose is being converted into xylonic acid. In this experiment, after 24 h growth, there was no significant production of xylonic acid nor consumption of xylose which is probably due to acidification, since the medium was not buffered and the final pH reached  $3.00 \pm 0.13$  (Figure 1b).



**Figure 1.** (a) Production of xylonic acid by *Z. mobilis* strains expressing different XDH genes from the following microorganisms: *Brevundimonas subvibrioides* (BS); *Halomonas lutea* (HL); *Caulobacter crescentus* (CC); SAR116 cluster alpha proteobacterium HIMB100 (AP); *Paraburkholderia xenovorans* (BX); *Trichoderma reesei* (TR) and *Phaeoacremonium minimum* (TM). Fermentation was performed in shake flasks for 48 h at 30 °C in modified RM 1 medium containing 50 g L<sup>-1</sup> xylose. (b) Time course production of xylonic acid (dark blue circles) and xylose consumption (light blue diamonds) of ZM4 BX. The strain was grown in shake flasks with 50 g L<sup>-1</sup> xylose at 30 °C.

It is noteworthy that the productivity of  $1.85 \pm 0.06$  g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> presented by ZM4 BX is higher than that observed for other engineered microorganisms described in the literature. By comparing volumetric productivities, ZM4 BX is amongst the best engineered strains for xylonic acid production. For instance, when the yeast *S. cerevisiae* was engineered to produce xylonic acid, it achieved productivities of 36 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [29] and 0.24 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [30] when expressing *xyd1* from *T. reesei* or co-expressed *xydB* and *xydC* from *C. crescentus*, respectively. Bacteria such as *E. coli* and *C. glutamicum* were engineered to xylonic acid production as well. An *E. coli* strain expressing *xydB* from *C. crescentus* achieved a productivity of 1.09 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [32], and strains of *C. glutamicum* expressing the same gene achieved productivities of 1.02 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [34] and 0.93 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [48]. A similar value (productivity of 1.8 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) was also encountered for two *E. coli* strains engineered to produce xylonic acid [33,49]. The best productivity described so far for engineered microorganisms was achieved by *E. coli* expressing *xydB* from *C. crescentus* and

further engineered by the construction of protein circuits, leading to a productivity of  $7.12 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [35]; this result underlines the use of synthetic biology approaches for strain engineering. In regard to native producers, volumetric productivities of  $4.69 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [25] and  $7.7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [26] were achieved by *G. oxydans* and *P. sacchari*, respectively. Although higher than that obtained by *Z. mobilis*, this bacterium may present some advantages that can be exploited for the value-added materials production, such as the presence of an energetically uncoupled metabolism with high catabolic flux rates and the small fraction of substrate that is converted into biomass [50]. Based on the performance of ZM4 BX for xylonic acid production, this strain was chosen for further analysis.

**Table 2.** Production and productivity achieved by *Z. mobilis* strains overexpressing different XDH genes.

Strain	Xylonic Acid	
	Production ( $\text{g L}^{-1}$ )	Productivity ( $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )
ZM4 CC	$14.01 \pm 0.70$	$0.96 \pm 0.03$
ZM4 BS	$8.47 \pm 0.97$	$0.63 \pm 0.02$
ZM4 HL	$12.45 \pm 3.05$	$0.88 \pm 0.11$
ZM4 AP	$3.10 \pm 0.20$	$0.24 \pm 0.01$
ZM4 BX	$26.17 \pm 0.58$	$1.85 \pm 0.06$
ZM4 TR	n.d.	n.d.
ZM4 TM	n.d.	n.d.
ZM4 C-	n.d.	n.d.

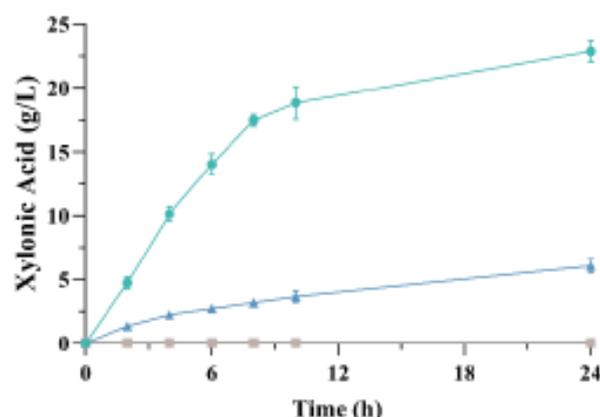
n.d.: not detected.

### 3.2. Simultaneous Expression of XDH and XL Genes

Although xylonic acid production may be achieved only by expressing XDH since xylonolactone undergoes spontaneous dehydration to form this organic acid, we reasoned that the expression of XL would improve production, as previously observed in *E. coli* [33]. For this reason, the gene encoding XL from *P. xenovorans* was expressed in ZM4 BX.

The strain co-expressing XDH and XL (ZM4 BXL) was evaluated for xylonic acid production. Interestingly, xylonic acid production was impaired, as shown in Figure 2. While the strain expressing only BX was able to produce  $22.88 \pm 0.83 \text{ g L}^{-1}$  xylonic acid after 24 h growth, ZM4 BXL produced only  $6.06 \pm 0.57 \text{ g L}^{-1}$ , and the strain ZM4 C- was not able to produce any xylonic acid. A similar result was observed in a *C. glutamicum* strain expressing *xylB* (xylose dehydrogenase) and *xylC* (xylonolactonase) from *C. crescentus*, which produced  $5.86 \text{ g L}^{-1}$  xylonic acid compared to  $20.04 \text{ g L}^{-1}$  produced by the strain expressing only *xylB* [34]. Once XL catalyzes the opening of the lactone ring to the linear form xylonate, we hypothesized that the intracellular pH may have dropped rapidly. In a study with a xylonic acid producing strain of *S. cerevisiae* [51], it was demonstrated that the co-expression of *xylC* with *xylB* from *C. crescentus* indeed leads to a rapid decrease of the intracellular pH to  $< 5$  compared to the strain expressing only *xylB*; this leads to a reduction on the specific growth rate and cell death. This would explain the poor performance of *Z. mobilis* when expressing both genes.

Aiming to confirm the decrease in the specific growth rate due to XL expression when xylose was present in the medium, strains ZM4 BX and ZM4 BXL were grown in medium containing only glucose or glucose plus xylose. The results showed that the strain expressing both genes grew less than ZM4 BX in the presence of xylose (Figure S1). When grown only in glucose, ZM4 BXL presented a better growth, with a maximum specific growth rate of  $0.47 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$  compared to  $0.38 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  of ZM4 BX. When xylose was added to the medium, the maximum specific growth rate of ZM4 BXL was  $0.14 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$ , 55% less than ZM4 BX ( $0.31 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ ). Given its negative effects on cell growth, XL was no longer tested in this work.



**Figure 2.** Comparative production of xylonic acid between ZM4 BX (green circles), ZM4 BXL (blue triangles) and ZM4 C- (gray squares). Strains were cultivated in shake flasks with modified RM medium containing  $50 \text{ g L}^{-1}$  xylose at  $30^\circ \text{C}$ .

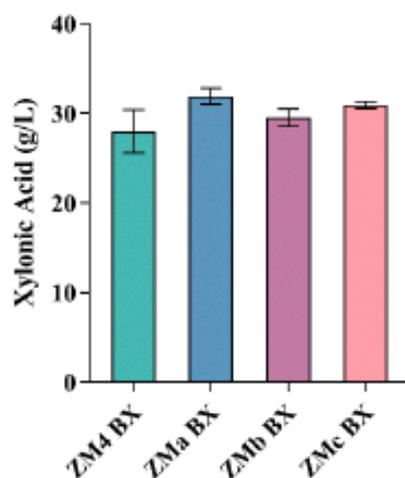
### 3.3. Inactivation of Native Competing Pathways in *Z. mobilis*

Metabolic engineering allows transforming microorganisms into efficient cell factories for the compounds of interest. Among the rational approaches used in metabolic engineering, we chose the removal of a competing pathway by gene deletion [52].

*Z. mobilis* contains a xylose reductase (XR) which produces xylitol from xylose [53]. The gene coding for XR was chosen for knockout since this enzyme could compete for xylose and generate an undesirable by-product which is toxic to the cells [54]. To reduce other by-products formation, ZMO1237 was also deleted. This gene codes for a lactate dehydrogenase which produces lactate from pyruvate mainly under aerobiosis [55], a condition that would benefit xylonic acid formation due to the co-factor recycling by the respiratory chain. Therefore, ZMO1237 was chosen for gene knockout since lactate production from glucose metabolism could interfere in biomass formation.

Deletion cassettes were constructed in pPCV vector [43] since its origin of replication is not recognized by *Z. mobilis* and thus would function as a suicide plasmid favoring the selection of integration events. After transformation, gene deletion was confirmed by PCR and selected clones were transformed with a plasmid containing Cre-recombinase in order to excise antibiotic marker (Figure S2). Using this approach, three strains were generated bearing both genes disrupted separately or together, as shown in Table 1.

These strains were transformed with pB1-XDH BX plasmid and xylonic acid production was evaluated. As shown in Figure 3 and Table 3, all tested strains produced similar amounts of xylonic acid after 24 h cultivation in xylose. Although the knockout strains showed slightly higher means of xylonic acid production, the *t*-test ( $p < 0.1$ ) showed that only ZMa BX presented a significant difference, showing that this strain was capable of producing more xylonic acid than ZM4 BX. This difference reflects that xylose is not being converted into xylitol, a toxic compound for *Z. mobilis*. The production of xylonic acid by ZMb BX was not significantly higher than ZM4 BX, which demonstrates that disruption of the lactate dehydrogenase gene does not affect xylonic acid production by this bacterium. Although ZMc also bears a deletion of ZMO0976 as ZMa, it is possible that gene knockout of ZMO1237 caused an opposite effect, since lactate dehydrogenase recycles  $\text{NAD}^+$  used as a co-factor by XDH, and should not be considered a target for *Z. mobilis* engineering for xylonic acid production.



**Figure 3.** Xylonic acid production of engineered *Z. mobilis* strains expressing BX. Strains ZM4 (wild-type), ZMa (mutant for xylose reductase), ZMc (mutant for lactate dehydrogenase) and ZMc (double mutant) were transformed with plasmid pB1-XDH BX and grown for 24 h in shake flasks with modified RM 1 medium containing 50 g L<sup>-1</sup> xylose at 30 °C.

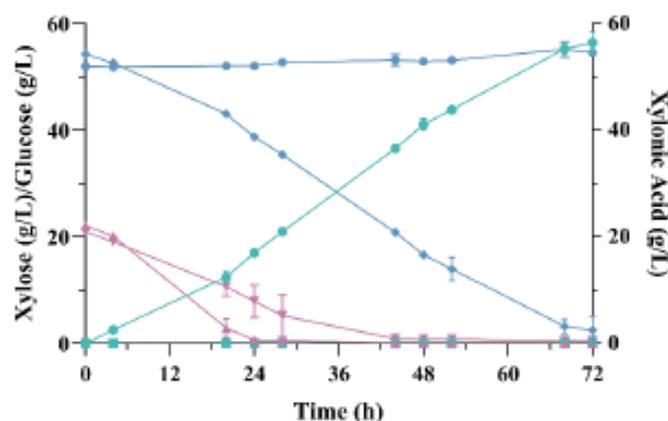
**Table 3.** Production of xylonic acid, productivity and yield achieved by engineered strains of *Z. mobilis* expressing BX after 24 h of cultivation.

Strain	Xylonic Acid		
	Production (g L <sup>-1</sup> )	Productivity (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Yield (g <sub>AX</sub> /g <sub>X</sub> )
ZM4 BX	27.99 ± 2.40	2.12 ± 0.19	1.05 ± 0.01
ZMa BX	31.90 ± 0.88	2.28 ± 0.19	1.05 ± 0.06
ZMb BX	29.55 ± 0.95	2.25 ± 0.13	1.03 ± 0.11
ZMc BX	30.91 ± 0.36	2.36 ± 0.06	1.05 ± 0.06

### 3.4. Production of Xylonic Acid in a Batch Fermentation

To produce xylonic acid under controlled conditions, strain ZMa BX was chosen due to its better xylonic acid production as compared to ZM4 BX described above. It was grown in a 1 L-scale bioreactor containing 500 mL of modified RM 2 medium in a batch fermentation mode (Figure 4). Glucose was consumed in ~28 h and the consumption of xylose began after 4 h, ending in ~72 h. At this point, ZMa BX produced 56.44 ± 1.93 g L<sup>-1</sup> xylonic acid from 54.27 ± 0.26 g L<sup>-1</sup> xylose, with a yield of 1.08 ± 0.02 g<sub>AX</sub>/g<sub>X</sub>, which represents 97.3% of the theoretical maximum. The productivity of this bioprocess was 0.99 ± 0.03 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, which was smaller than that obtained in shake flasks—this is probably due to the differences in the initial concentration of biomass in each experiment.

Strain ZMa C- (negative control) was unable to utilize any xylose, which remained in the medium until the end of the fermentation. Interestingly, it also showed a slower growth rate compared to the xylonic acid producing strain, since the latter presented a specific growth rate of 0.04 ± 0.00 h<sup>-1</sup> in comparison to 0.02 ± 0.00 h<sup>-1</sup> of the negative control. Indeed, glucose was consumed within 52 h in comparison to 28 h for ZMa BX. This may be explained by the stress caused by xylose itself. Molecular responses to the presence of xylose have already been investigated in a *Z. mobilis* xylose-utilizing strain, showing that this pentose causes a more severe impact in this bacterium than that caused by acetate treatment, recruiting more genes for xylose utilization than it does for acetate [54]. Although being different strains, xylose may pose some stress in ZMa C- as well; further metabolic engineering studies are required to elucidate the mechanisms of xylose utilization by *Z. mobilis* in order to improve the harnessing of this sugar.

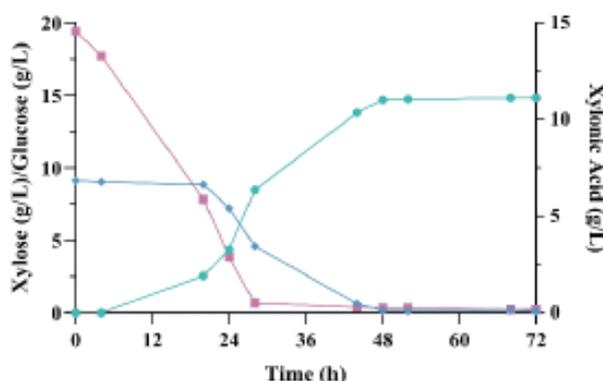


**Figure 4.** Fermentative profile of strains ZMa BX and ZMa C-. Fermentation was carried out in a bioreactor with modified RM medium containing  $50 \text{ g L}^{-1}$  xylose in batch mode at  $30^\circ \text{C}$ . Xyonic acid production by ZMa BX (green circles), xylose (blue diamonds) and glucose (purple triangles) consumption by ZMa BX; xylonic acid production by ZMa C- (green squares), xylose (blue hexagons) and glucose (purple inverted triangles) consumption by ZMa C-.

### 3.5. Use of Sugarcane Bagasse Hydrolysate in a Batch Fermentation

Sugarcane bagasse is an abundant agricultural residue in Brazil, with a production of 178 million tons in 2016 [56], which makes its utilization of utmost interest. Since *Z. mobilis* showed an efficient conversion of xylose into xylonic acid, the use of a hemicellulosic hydrolysate derived from sugarcane bagasse as an inexpensive feedstock for the production of this organic acid was pursued. This test would also represent an opportunity to assess the inhibitory effects of the hydrolysate on *Z. mobilis*.

We used a defined media containing 10% sugarcane bagasse hydrolysate which contained  $\sim 10 \text{ g L}^{-1}$  xylose. ZMa C- strain was not able to grow nor consume glucose present in the medium, whereas ZMa BX consumed it after 28 h cultivation (Figure 5). This strain achieved a xylonic acid production of  $11.13 \text{ g L}^{-1}$  with a productivity of  $0.32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , which is about one third of that obtained in rich medium, probably due to the presence of inhibitors found in lignocellulosic hydrolysate. Despite of that, the yield achieved in medium containing sugarcane bagasse hydrolysate was  $1.07 \text{ g}_{\text{AX}}/\text{g}_{\text{X}}$  after 72 h growth, which was similar for that encountered in rich medium.



**Figure 5.** Production of xylonic acid from sugarcane bagasse hydrolysate. Fermentation was carried out in a bioreactor with defined medium containing 10% hemicellulosic hydrolysate of sugarcane bagasse in batch mode at  $30^\circ \text{C}$ . Xylonic acid (green circles), xylose (blue diamonds) and glucose (purple squares).

The productivity achieved by ZMa BX in sugarcane bagasse hydrolysate is smaller than that encountered for an engineered *E. coli* strain, which was  $1.52 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [49] when a corn cob hydrolysate was used as feedstock. A modified *C. glutamicum* strain using rice straw hydrolysate as feedstock was able to produce  $42.94 \text{ g L}^{-1}$  xylonic acid from  $60 \text{ g L}^{-1}$  xylose only after 120 h incubation [48]. However, *Z. mobilis* was able to convert all xylose available in the medium containing hydrolysate into xylonic acid, showing its potential as a platform for industrial production of this organic acid.

An interesting result from this experiment was that *Z. mobilis* was able to detoxify furfural from hydrolysate, since this compound was no longer detected in the end of the fermentation (Figure S3). After 4 h of fermentation, the furfural peak in the chromatogram decreased to approximately half of its height, and the  $\text{OD}_{600}$  at this point was 1.03. Indeed, it was demonstrated that *Z. mobilis* is capable of converting furfural into its alcohol form (furfuryl), which is roughly one fourth as inhibitory as furfural [57]. This is an important attribute when considering lignocellulosic hydrolysate as feedstock for production of biotechnological valuable molecules.

#### 4. Conclusions

This work is the first report of an engineered *Z. mobilis* strain capable of producing xylonic acid from xylose. The engineered strain was able to convert xylose in sugarcane bagasse hydrolysate into xylonic acid, showing the potential of using *Z. mobilis* in an economically feasible and eco-friendly bioprocess. This work underlines the importance of exploring new genes derived from the biodiversity in order to improve metabolic pathways in the context of synthetic biology.

This process of xylonic acid production can be further optimized by changing and evaluating the fermentation parameters such as pH, air flow, inoculum concentration and medium. In this regard, the assessment of the need of adding vitamins, and its concentrations, when utilizing sugarcane bagasse hydrolysate is of utmost importance in the appraising of the economic viability of the process, thus, requiring further investigation.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms9071372/s1>, Figure S1: Growth of ZM4 BX and ZM4 BXL strains in glucose or glucose plus xylose: open triangles: ZM4 BXL on glucose; open circles: ZM4 BX on glucose; closed triangles: ZM4 BXL in glucose and xylose. closed circles: ZM4 BX on glucose and xylose, Figure S2: Deletion of genes ZMO0976 and ZMO1237 in *Z. mobilis*. After transformation, gene deletion and marker excision were assessed by PCR with specific primers. A: Deletion of ZMO0976 (confirmation primers U-ZMO0976-F/D-ZMO0976-R). M1: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), WT: wild-type ZMO0976 (−3 kb);  $\Delta 0976$ :  $\Delta \text{ZMO0976}::\text{Spc}^R$  (−3.3 kb); ZMa:  $\Delta \text{ZMO0976}$  (−2.1 kb). B: Deletion of ZMO1237 (confirmation primers Cldh-F/Cldh-R). M2: 1 kb DNA Ladder (Promega); WT: wild-type ZMO1237 (−2.2 kb);  $\Delta 1237$ :  $\Delta \text{ZMO1237}::\text{Spc}^R$  (−2.5 kb); ZMb:  $\Delta \text{ZMO1237}$  (−1.3 kb). C: Deletion of ZMO1237 in ZMa strain. M1: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); ZMa:  $\Delta \text{ZMO0976}$ —wild-type ZMO1237 (−2.2 kb);  $\Delta 1237$ :  $\Delta \text{ZMO0976}$ ,  $\Delta \text{ZMO1237}::\text{Spc}^R$  (−2.5 kb, primers Cldh-F/Cldh-R); ZMc:  $\Delta \text{ZMO0976}$ ,  $\Delta \text{ZMO1237}$  (−1.3 kb, primers Cldh-F/Cldh-R).  $\text{Spc}^R$ : spectinomycin resistance cassette. C-: reaction control, Figure S3: Stacked chromatograms showing the decrease in furfural peak (retention time ~70 min). Standard containing furfural (1); fermentation sample at time 0 h (2); fermentation sample after 4 h (3); fermentation sample after 20 h (4); Table S1: Primers used for amplification of XDH genes, construction of deletion cassettes, knockout confirmation and Cre recombinase amplification.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.R.J.H., J.L.D.M., L.M.P.d.M., J.R.M.d.A. and F.A.G.T.; methodology, C.R.J.H., J.R.M.d.A. and F.A.G.T.; formal analysis, C.R.J.H. and F.A.G.T.; investigation, C.R.J.H. and C.V.G.C.C.; resources, F.A.G.T. and J.R.M.d.A.; data curation, C.R.J.H.; writing—original draft preparation, C.R.J.H.; writing—review and editing, C.R.J.H., F.A.G.T., T.B., V.R.V. and J.R.M.d.A.; supervision, F.A.G.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by CNPq (Brazil), grant number 140380/2016-7 and CAPES (Brazil), grant PROJ-CAPEPRINT1037314P.

**Institutional Review Board Statement** Not applicable.

**Informed Consent Statement** Not applicable.

**Data Availability Statement** The data used and/or analyzed in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Pleissner, D.; Dietz, D.; van Duuren, J.B.J.H.; Wittmann, C.; Yang, X.; Lin, C.S.K.; Venus, J. Biotechnological production of organic acids from renewable resources. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2017**, *166*, 373–410. [CrossRef]
- Ahorsu, R.; Medina, E.; Constantí, M. Significance and Challenges of Biomass as a Suitable Feedstock for Bioenergy and Biochemical Production: A Review. *Energies* **2018**, *11*, 3366. [CrossRef]
- IEA. *Bio-Based Chemicals: A 2020 Update*; IEA: Paris, France, 2020.
- Cherubini, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.* **2010**, *51*, 1412–1421. [CrossRef]
- Aristidou, A.; Penttilä, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr. Opin. Biotech.* **2000**, *11*, 187–198. [CrossRef]
- Agrawal, M.; Mao, Z.; Chen, R.R. Adaptation Yields a Highly Efficient Xylose-Fermenting *Zymomonas mobilis* Strain. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 777–785. [CrossRef] [PubMed]
- Jun, H.; Jiayi, C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for increased bioconversion of lignocellulose to ethanol. *Indian J. Microbiol.* **2012**, *52*, 442–448. [CrossRef] [PubMed]
- Kim, S.R.; Kwee, N.R.; Kim, H.; Jin, Y.S. Feasibility of xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing endogenous aldose reductase (GRE3), xylitol dehydrogenase (XYL2), and xylulokinase (XYL3) from *Scheffersomyces stipitis*. *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 312–321. [CrossRef]
- Diao, L.; Liu, Y.; Qian, F.; Yang, J.; Jiang, Y.; Yang, S. Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *Saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution. *BMC Biotechnol.* **2013**, *13*, 110. [CrossRef]
- Moysés, D.N.; Reis, V.C.B.; de Almeida, J.R.M.; de Moraes, L.M.P.; Torres, F.A.G. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Challenges and Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 207. [CrossRef]
- Liu, L.; Jin, M.; Huang, M.; Zhu, Y.; Yuan, W.; Kang, Y.; Kong, M.; Ali, S.; Jia, Z.; Xu, Z.; et al. Engineered Polyploid Yeast Strains Enable Efficient Xylose Utilization and Ethanol Production in Corn Hydrolysates. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 1–11. [CrossRef]
- Morais Junior, W.G.; Pacheco, T.F.; Trichez, D.; Almeida, J.R.M.; Gonçalves, S.B. Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *Candida tropicalis* JA2 strain. *Yeast* **2019**, *36*, 349–361. [CrossRef]
- Hu, X.; Jiang, S.; Wu, L.; Wang, S.; Li, C.Z. One-pot conversion of biomass-derived xylose and furfural into levulinic esters via acid catalysis. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 2938–2941. [CrossRef] [PubMed]
- Werpy, T.; Petersen, G. *Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*; National Renewable Energy Lab.: Golden, CO, USA, 2004.
- Braga, M.; Ferreira, P.M.; Almeida, J.R.M. Screening method to prioritize relevant bio-based acids and their biochemical processes using recent patent information. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **2020**, *15*, 231–249. [CrossRef]
- Gupta, S.K. Hydroxy Acid Complexes for Antiaging and Skin Renovation 2009. U.S. Patent No. 7,547,454, 16 June 2009.
- Pujos, P.; Jijakli, M.H. Compositions for Use against One or More Pathogens 2014. U.S. Patent No. 8,828,450, 9 September 2014.
- Markham, R.G. Compositions and Methods for Administering Therapeutically Active Compounds 1992. Australian Patent AU-B-43288/89. Australian Patent AU-B-43288/89, 19 March 1992.
- Niu, W.; Molefe, M.N.; Frost, J.W. Microbial Synthesis of the Energetic Material Precursor 1,2,4-Butanetriol. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12998–12999. [CrossRef] [PubMed]
- Chun, B.W.; Dair, B.; Macuch, P.J.; Wiebe, D.; Porteneuve, C.; Jeknavorian, A. The Development of Cement and Concrete Additive. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2006**, *129–132*, 645–658. [CrossRef]
- Ma, J.; Zhong, L.; Peng, X.; Sun, R. D-Xyloic acid: A solvent and an effective biocatalyst for a three-component reaction. *Green Chem.* **2016**, *18*, 1738–1750. [CrossRef]
- Toivari, M.H.; Nygård, Y.; Penttilä, M.; Ruohonen, L.; Wiebe, M.G. Microbial D-xyloic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96*, 1–8. [CrossRef]
- Bertrand, M.G. Action de la bactérie du sorbose sur le sucre de bois. In *Comptes Rendus des Séances de L'Académie des Sciences*; Gauthier-Villars: Paris, France, 1898; pp. 124–127.
- Buchert, J.; Puls, J.; Poutanen, K. Comparison of *Pseudomonas fragi* and *Gluconobacter oxydans* for production of xyloic acid from hemicellulose hydrolysates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, *28*, 367–372. [CrossRef]
- Zhou, X.; Lü, S.; Xu, Y.; Mo, Y.; Yu, S. Improving the performance of cell biocatalysis and the productivity of xyloic acid using a compressed oxygen supply. *Biochem. Eng. J.* **2015**, *93*, 196–199. [CrossRef]
- Bondar, M.; Fonseca, M.M.R.; Cesário, M.T. Xyloic acid production from xylose by *Paraburkholderia sacchari*. *Biochem. Eng. J.* **2021**, *170*, 107982. [CrossRef]

27. Weimberg, R. Pentose Oxidation by *Pseudomonas fragi*. *J. Biol. Chem. Chem.* **1961**, *236*, 629–635. [\[CrossRef\]](#)
28. Valdehuesa, K.N.G.; Ramos, K.R.M.; Nisola, G.M.; Bañares, A.B.; Cabulong, R.B.; Lee, W.K.; Liu, H.; Chung, W.J. Everyone loves an underdog: Metabolic engineering of the xylose oxidative pathway in recombinant microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 7703–7716. [\[CrossRef\]](#)
29. Toivari, M.H.; Ruohonen, L.; Richard, P.; Penttilä, M.; Wiebe, M.G. *Saccharomyces cerevisiae* engineered to produce D-xylonate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 751–760. [\[CrossRef\]](#)
30. Toivari, M.H.; Nygård, Y.; Kumpula, E.P.; Vehkomäki, M.L.; Benčina, M.; Valkonen, M.; Maaheimo, H.; Andberg, M.; Koivula, A.; Ruohonen, L.; et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of D-xylose to D-xylonate. *Metab. Eng.* **2012**, *14*, 427–436. [\[CrossRef\]](#)
31. Nygård, Y.; Toivari, M.H.; Penttilä, M.; Ruohonen, L.; Wiebe, M.G. Bioconversion of D-xylose to D-xylonate with *Kluyveromyces lactis*. *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 383–391. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Liu, H.; Valdehuesa, K.N.G.; Nisola, G.M.; Ramos, K.R.M.; Chung, W.J. High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 244–248. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Cao, Y.; Xian, M.; Zou, H.; Zhang, H. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the Production of Xylonate. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67305. [\[CrossRef\]](#)
34. Yim, S.S.; Choi, J.W.; Lee, S.H.; Jeon, E.J.; Chung, W.J.; Jeong, K.J. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Consolidated Conversion of Hemicellulosic Biomass into Xylonic Acid. *Biotechnol. J.* **2017**, *12*. [\[CrossRef\]](#)
35. Gao, C.; Hou, J.; Xu, P.; Guo, L.; Chen, X.; Hu, G.; Ye, C.; Edwards, H.; Chen, J.; Chen, W.; et al. Programmable biomolecular switches for rewiring flux in *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
36. Almeida, J.R.M.; Rodrigues, C.M.; Justen, F.; Ramos, T.G.S. Komagataella phaffii Recombinante Produtora de Ácido Xilônico e Método Para a Produção de Ácido Xilônico a Partir de Xilose 2019. Brazilian Patent BR 102018001359-9, 22 March 2019.
37. Rogers, P.L.; Jeon, Y.J.; Lee, K.J.; Lawford, H.G. *Zymomonas mobilis* for Fuel Ethanol and Higher Value Products. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2007**, *108*, 263–288. [\[CrossRef\]](#)
38. Carra, S.; Rodrigues, D.C.; Beraldo, N.M.C.; Folle, A.B.; Delagustin, M.G.; de Souza, B.C.; Reginatto, C.; Polidoro, T.A.; da Silveira, M.M.; Bassani, V.L.; et al. High lactobionic acid production by immobilized *Zymomonas mobilis* cells: A great step for large-scale process. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2020**, *43*, 1265–1276. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Wang, W.; Wu, B.; Qin, H.; Liu, P.; Qin, Y.; Duan, G.; Hu, G.; He, M. Genome shuffling enhances stress tolerance of *Zymomonas mobilis* to two inhibitors. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 1–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Klinke, H.B.; Thomsen, A.B.; Ahring, B.K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *66*, 10–26. [\[CrossRef\]](#)
41. Kovach, M.E.; Elzer, P.H.; Hill, D.S.; Robertson, G.T.; Farris, M.A.; Roop, R.M.; Peterson, K.M. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **1995**, *166*, 175–176. [\[CrossRef\]](#)
42. Benoliel, T.; Rubini, M.R.; de Souza Baptistello, C.; Janner, C.R.; Vieira, V.R.; Torres, F.A.; Walmsley, A.; de Moraes, L.M.P. Physiological effects of overexpressed sigma factors on fermentative stress response of *Zymomonas mobilis*. *Braz. J. Microbiol.* **2020**, *51*, 65–75. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Janner, C.R.; Brito, A.L.P.; Moraes, L.M.P.; Reis, V.C.B.; Torres, F.A.G. pPCV, a versatile vector for cloning PCR products. *Springerplus* **2013**, *2*, 441. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Betancur, M.O.; Reis, V.C.B.; Nicola, A.M.; De Marco, J.L.; de Moraes, L.M.P.; Torres, F.A.G. Multicopy plasmid integration in *Komagataella phaffii* mediated by a defective auxotrophic marker. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. He, M.X.; Wu, B.; Qin, H.; Ruan, Z.Y.; Tan, F.R.; Wang, J.L.; Shui, Z.X.; Dai, L.C.; Zhu, Q.L.; Tang, X.Y.; et al. *Zymomonas mobilis*: A novel platform for future biorefineries. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*, 101. [\[CrossRef\]](#)
46. Zachariou, M.; Scopes, R.K.K. Glucose-Fructose Oxidoreductase, a New Enzyme Isolated from *Zymomonas mobilis* That Is Responsible for Sorbitol Production. *J. Bacteriol.* **1986**, *167*, 863–869. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Satory, M.; Furlinger, M.; Haltrich, D.; Kulbe, K.D.; Pittner, F.; Nidetzky, B. Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnol. Lett.* **1997**, *19*, 1205–1208. [\[CrossRef\]](#)
48. Sundar, M.S.L.; Susmitha, A.; Rajan, D.; Hannibal, S.; Sasikumar, K.; Wendisch, V.F.; Nampoothiri, K.M. Heterologous expression of genes for bioconversion of xylose to xylonic acid in *Corynebacterium glutamicum* and optimization of the bioprocess. *AMB Express* **2020**, *10*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
49. Zhang, Y.; Guo, S.; Wang, Y.; Liang, X.; Xu, P.; Gao, C.; Ma, C. Production of D-Xylonate from Corn Cob Hydrolysate by a Metabolically Engineered *Escherichia coli* Strain. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7*, 2160–2168. [\[CrossRef\]](#)
50. Kalneniemi, U.; Pappas, K.M.; Bettenbrock, K. *Zymomonas mobilis* metabolism: Novel tools and targets for its rational engineering. *Adv. Microb. Physiol.* **2020**, *77*. [\[CrossRef\]](#)
51. Nygård, Y.; Maaheimo, H.; Mojzita, D.; Toivari, M.; Wiebe, M.; Resnekov, O.; Pesce, C.G.; Ruohonen, L.; Penttilä, M. Single cell and in vivo analyses elucidate the effect of xylC lactonase during production of D-xylonate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **2014**, *25*, 238–247. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Lee, J.W.; Na, D.; Park, J.M.; Lee, J.; Choi, S.; Lee, S.Y. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 536–546. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Agrawal, M.; Chen, R.R. Discovery and characterization of a xylose reductase from *Zymomonas mobilis* ZM4. *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 2127–2133. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

54. Yang, S.; Franden, M.A.; Brown, S.D.; Chou, Y.C.; Pienkos, P.T.; Zhang, M. Insights into acetate toxicity in *Zymomonas mobilis* 8b using different substrates. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*, 14. [[CrossRef](#)]
55. Yang, S.; Tschaplinski, T.J.; Engle, N.L.; Carroll, S.L.; Martin, S.L.; Davison, B.H.; Palumbo, A.V.; Rodriguez, M.; Brown, S.D. Transcriptomic and metabolomic profiling of *Zymomonas mobilis* during aerobic and anaerobic fermentations. *BMC Genomics* **2009**, *10*, 34. [[CrossRef](#)]
56. Conab. *Perfil do Setor do Açúcar e Etanol no Brasil*; Conab: Brasília, Brazil, 2019.
57. Franden, M.A.; Pilath, H.M.; Mohagheghi, A.; Pienkos, P.T.; Zhang, M. Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*, 99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]