

Overexpression of the Transcription Factor HAA1 to enhance *Komagataella phaffii* resistance to inhibitory compounds

Mariana Jardim Pedrosa, Leticia Maria Mallmann Ferreira, Bárbara Gomes Paes, Diogo Keiji Nakai, Livia Teixeira Duarte Brandão, João Ricardo Moreira de Almeida

¹ EMBRAPA Agroenergia, University of Brasília (UnB), Brazil

E-mail: mariana.pedrosa@colaborador.embrapa.br

Keywords: *Komagataella phaffii*, Lignocellulosic Biomass, Genetic Engineer, Transcription Factor.

The use of renewable feedstocks, like lignocellulosic biomass, is growing rapidly in industrial biotechnology because of its usage in bioprocesses. This biomass originates, principally, from agroindustry residues and can be used to obtain substances such as xylonic acid. Unfortunately, one of the biggest obstacles for the usage of lignocellulosic biomass is the microorganism response to inhibitory compounds found in renewable biomasses after they are pre-treated using hydrolyses, such as acetic acid and lignin derived aromatic compounds. Those can inhibit or even completely block the cell's metabolic activity.

In the past, genetically engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae* have shown high tolerance to lignocellulose-derived inhibitors. Therefore, the objective of this work is to evaluate the inhibitor tolerance of *Komagataella phaffii* engineered for HAA1 overexpression comparing these genetic engineered strains to a wild type strain. *K. phaffii* has been employed in several bioprocesses and gained attention for the production of bio-based chemicals and the transcription factor HAA1 was chosen since his activation express a series of cellular responses against those metabolic inhibitions.

The experiment results demonstrate that the overexpression of the transcription factor HAA1 improves the yeast's resistance to acetic acid. Interestingly, yeast cultivation allowed increased consumption of acetic acid and a rise in extracellular pH and cellular growth. Therefore, those genetic modifications in *K. phaffii* provide a better efficiency of this microorganism in cultures that contains inhibitory compounds and, consequently, allows the yeast to grow on lignocellulosic biomasses.

Resumo: A biomassa lignocelulósica com finalidade de uso como recurso renovável, está se tornando essencial para a área industrial da biotecnologia. Essa biomassa é proveniente de resíduos do agronegócio e pode ser utilizada como substrato para bioprocessos com o objetivo de produzir substâncias, como o ácido xilônico, que são aproveitadas nas indústrias, principalmente nas alimentícias e automobilísticas. No entanto, a aplicação desse tipo de biomassa em bioprocessos industriais enfrenta obstáculos devido à presença de compostos químicos, como o ácido acético presente nos hidrolisados gerados, que diminuem o metabolismo microbiano. Desse modo, buscou-se melhorar geneticamente a levedura *Komagataella phaffii* para aumentar sua resistência a esses compostos. Para isso, realizou-se o estudo do gene HAA1 nativo da levedura e criação de linhagens recombinantes com o mesmo gene. O objetivo desta pesquisa é avaliar essas linhagens recombinantes para analisar se há um aumento da tolerância do ácido acético. Logo, duas linhagens modificadas para superexpressar o HAA1 e uma linhagem controle com a *K. phaffii* selvagem foram avaliadas quanto ao desempenho do seu crescimento celular e a capacidade de metabolizar ácido acético em meio YPX. Os resultados apontam que as linhagens modificadas apresentam uma maior resistência ao ácido acético, mas, tais possuem um limite e, em concentrações altas de ácido acético, essas linhagens não conseguem se adaptar ao meio e, portanto, sofrem inibição metabólica significativa prejudicando o crescimento do organismo. Em suma, a superexpressão do fator de transcrição HAA1 auxilia no enfrentamento desses empecilhos, criando, assim, um microrganismo mais resistente a esses substratos de natureza renovável, facilitando e aumentando a eficiência desses bioprocessos.

[1] B. Paes, “MOLECULAR AND PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF *Pichia pastoris* TO LIGNOCELLULOSIC HYDROLYSATE COMPONENTS.,” University of Brasília, 2021.

[2] L. M. Moraes *et al.*, “Applications of the Methylotrophic Yeast *Komagataella phaffii* in the Context of Modern Biotechnology,” *Journal of Fungi*, vol. 10, no. 6, p. 411, Jun. 2024, doi: <https://doi.org/10.3390/jof10060411>.