

EDUARDO ZANELLA

**INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS FURÂNICOS EM LEVEDURAS  
ASSIMILADORAS DE PENTOSE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

FLORIANÓPOLIS  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

ZANELLA, EDUARDO  
INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS FURÂNICOS EM LEVEDURAS  
ASSIMILADORAS DE PENTOSSES / EDUARDO ZANELLA ;  
orientador, Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, 2018.  
89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Biociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. etanol 2G. 3.  
Saccharomyces cerevisiae . 4. YN134C. 5. furfural.  
I. Stambuk, Boris Juan Carlos Ugarte . II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III.  
Título.

**"Influência de compostos furânicos em leveduras assimiladoras de pentoses"**

Por

**Eduardo Zanella**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (02/2018/PPGBT) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



---

Prof. Dr. Mario Steindel

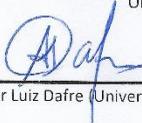
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



---

Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador



---

Dr. Alcir Luiz Dafre (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr. Diogo Robl (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 08 de março de 2018.



Dedico essa dissertação à minha família.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Boris Stambuk pela oportunidade, paciência, orientação e principalmente por ter aceito um químico em seu grupo de pesquisa.

Aos Laboratórios de Defesas Celulares (Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre) e Bioquímica de Insetos (Prof. Carlos Peres Silva) pelo compartilhamento de equipamentos e reagentes.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural, em especial a M.Sc. Elis Amaral Rosa, pelo auxílio e disponibilização do cromatógrafo nas análises de HPLC.

À professora Dr. Maria da Graça Nascimento e a mestranda Juana Goulart Stollmaier que intermediaram a realização das análises de HPLC na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. Agradeço também ao técnico da Central de Análises - Nilton Cesar Pereira pelo pronto atendimento.

À minha amiga Tainá Bueno pela amizade e auxílio com os *softwares* de imagens.

À todos os meus amigos de Pato Branco.

Aos meus pais, José e Faustina, e a minha irmã Gabriela, que sempre me apoiaram durante toda a vida.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de leveduras – LBMBL: Angela, Marília, Leonardo, Bruna, Wallace, João, Eduardo R., Gabriela K, Eike e Gabriela G; aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica de Insetos: Cristina e Théo; pela amizade e companheirismo, pelo aceite dos convites pra tomar uma gelada, e principalmente por me aturarem. Vocês foram únicos e indispensáveis!

Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial às amigas Angela Alves dos Santos e Marília Marques Knychala por me ajudarem nos passos iniciais do meu contato com a biologia molecular, mesmo em momentos de desespero; pelas conversas francas e principalmente pela amizade verdadeira. Vocês foram essenciais para o sucesso dos meus experimentos e levarei as vossas amizades para toda a vida.

À UFSC e o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biotecnologia pela oportunidade.

Às agências de fomento CAPES, FINEP e CNPq pelo financiamento.

À VTT Brasil – Pesquisa e Desenvolvimento pelo financiamento desse projeto.



*“Nada no mundo se compara à persistência. Nem o talento; não há nada mais comum do que homens mal sucedidos e com talento. Nem a genialidade; a existência de gênios não recompensados é quase um provérbio. Nem a educação; o mundo está cheio de negligenciados educados. A persistência e determinação são, por si sós, onipotentes. O slogan “não desista” já salvou e sempre salvará os problemas da raça humana”.*

*Calvin Coolidge*



## RESUMO

A fermentação eficiente dos açúcares presentes em hidrolisados da biomassa lignocelulósica, principalmente pentoses e hexoses, é um passo primordial para a produção do etanol de segunda geração (etanol 2G). Essa eficiência pode ser afetada pela presença de compostos inibidores que são formados nos processos de pré-tratamento dessa biomassa. Dentre esses compostos estão os compostos furânicos, furfural e o 5-hidroximetilfurfural (HMF), dois aldeídos que, em concentrações elevadas, afetam negativamente as células e conseqüentemente a produção do etanol 2G. A fim de atenuar tal problemática, a busca por micro-organismos naturalmente capazes de fermentar pentoses e de tolerar tais aldeídos é uma alternativa que vem sendo explorada por diversos grupos de pesquisa. Por outro lado, a construção de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando a engenharia genética, também tem sido uma alternativa para contornar essa problemática. Dessa maneira, o presente trabalho se propôs a realizar a caracterização de leveduras isoladas da microbiota Brasileira, assimiladoras de pentoses, através do crescimento celular em glicose e xilose com concentrações crescentes de furfural e HMF, avaliando também a produção de etanol por tais leveduras. Ademais, foi construída uma linhagem de *S. cerevisiae* industrial recombinante (EZY-01), fermentadora de xilose, que sobre-expressa o gene *YNL134C* que codifica uma aldeído redutase, com o intuito de melhorar a tolerância dessa ao furfural. Foram determinadas as cinéticas de crescimento aeróbios, fermentações e co-fermentações em batelada simples, em meios contendo glicose e/ou xilose e presença ou não de furfural. Nossos resultados demonstram que para as 12 cepas de leveduras selvagens avaliadas, concentrações de 0,5 g L<sup>-1</sup> de furfural ou HMF já foram suficientes para aumentar a fase lag e/ou inibir o crescimento celular das leveduras, principalmente quando a fonte de carbono foi xilose. Observou-se também que a produção de etanol foi afetada negativamente na presença desses dois compostos furânicos. Notou-se que as cepas de *Candida queiroziae* e *Spathaspora suhii* foram as mais tolerantes ao furfural em meios contendo glicose. Já em meios contendo xilose as leveduras que se destacaram como mais tolerantes a este mesmo inibidor foram *Sp. brasiliensis*, *Sp. roraimanensis* e *Sp. suhii*. Estas mesmas espécies foram mais tolerantes à presença de HMF, tanto em glicose como em xilose. Nossos resultados demonstraram que a região promotora do gene *YNL134C* na cepa de *S. cerevisiae* industrial recombinante foi modificada com êxito, promovendo um nível de transcrição 100 vezes maior do gene,

quando comparada a linhagem parental. Durante o crescimento aeróbio em glicose e presença de furfural a cepa que sobre-expressa o gene *YNL134C* teve sua fase *lag* diminuída (de 30 a 17 h) e sua taxa de crescimento específico aumentada (de 0,62 a 0,93 h<sup>-1</sup>). No entanto, não foi possível observar diferenças quando a fonte de carbono foi xilose. Além disso, nas fermentações e co-fermentações de glicose/xilose, em batelada simples, novamente não foram observadas diferenças entre as linhagens de levedura industriais. Dessa maneira, embora a sobre-expressão do gene *YNL134C* tenha melhorado a utilização da glicose na presença de furfural, não houve melhora na fermentação de xilose, limitando a utilização dessa estratégia para a produção de etanol de segunda geração.

**Palavras-chave:** furfural; *YNL134C*; *Saccharomyces cerevisiae*; etanol 2G; aldeído redutase.

## ABSTRACT

The efficient fermentation of sugars present in the hydrolysates of lignocellulosic biomass, mainly pentoses and hexoses, is a primordial step for second-generation ethanol (2G ethanol) production. This efficiency can be affected by the presence of inhibitory compounds that are formed in the pre-treatment processes of this biomass. Among these, furan compounds, furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF), are aldehydes that at high concentrations negatively affect the cells, and consequently the production of 2G ethanol. In order to attenuate this problem, search for naturally microorganisms capable of ferment pentoses and tolerate these aldehydes is an alternative that has been explored by several research groups. Otherwise, the construction of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains, using genetic engineering, has also been an alternative to overcome this problem. Therefore, the present work proposed the characterization of pentose-assimilating yeasts isolated from Brazilian microbiomes, through cell growth in glucose and xylose with increase concentrations of furfural and HMF, and evaluating the production of ethanol by these yeasts. In addition, a recombinant industrial xylose fermenting *S. cerevisiae* strain was developed (EZY-01), over-expressing the *YNL134C* gene that encodes for an aldehyde reductase, in order to improve its tolerance to furfural. The kinetics of aerobic growth, batch fermentations and batch co-fermentations of glucose and/or xylose in the presence, or not, of furfural were determined. Our results show that for the 12 wild-type yeasts strains evaluated, concentrations of 0,5 g L<sup>-1</sup> of furfural or HMF were already sufficient to increase the *lag* phase and/or to inhibit yeast cell growth, especially when the carbon source was xylose. It was also observed that ethanol production was adversely affected by the presence of these two furan compounds. We notice that the strains of *Candida queiroziae* and *Spathaspora suhii* were more tolerant to furfural with glucose. In xylose the yeasts strains that outstand as more tolerant to this inhibitory compound were *Sp. brasiliensis*, *Sp. roraimanensis*, and *Sp. suhii*. These same yeasts were more tolerant to HMF with either glucose or xylose. Our results demonstrated that the promoter region of the *YNL134C* gene in the recombinant industrial strain was successfully modified, promoting a 100-fold higher transcription level of the gene, when compared to the parental strain. During aerobic growth in glucose in the presence of furfural, the recombinant strain had a decreased lag-phase (from 30 to 17 h), and its specific growth rate increased (from 0.62 to 0.93 h<sup>-1</sup>). However, it was not possible to observe differences when the carbon source was xylose. In addition, in batch

fermentations and batch glucose/xylose co-fermentations no differences were observed between the industrial yeast strains. Therefore, although the over-expression of the *YNL134C* gene improved the use of glucose in the presence of furfural, there was no improvement with xylose, limiting the use of this strategy for second-generation ethanol production.

**Keywords:** furfural; *YNL134C*; *Saccharomyces cerevisiae*; 2G bioethanol; aldehyde reductase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. ....	22
Figura 2 - Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	24
Figura 3 -Desestruturação da biomassa lignocelulósica.....	25
Figura 4 – Formação de compostos inibitórios durante o processo de pré-tratamento.....	26
Figura 5 – Vias de conversão do 2-furaldeído (furfural) e 5-(hidroximetil)-2-furaldeído (HMF). ....	28
Figura 6 - Metabolismo da xilose pela via da XR-XDH (xilose redutase e xilitol desidrogenase). ....	29
Figura 7 - Sobre-expressão do gene <i>YNLI34C</i> .....	40
Figura 8 – Cinética de crescimento em microescala da levedura <i>Sp. suhii</i> XMD-16.2.....	48
Figura 9 – Confirmação da construção da linhagem EZY-01 que sobre-expressa o gene <i>YNLI34C</i> .....	57
Figura 10 – Análise da expressão do gene <i>YNLI34C</i> por qRT-PCR. ...	58
Figura 11 – Crescimentos aeróbios das linhagens MP-P5 e EZY-01 em meio sintético contendo 2% de glicose e 2% de xilose. ....	62
Figura 12 – Crescimentos aeróbios das linhagens MP-P5 e EZY-01 em meio sintético contendo 2% de glicose e 2% de xilose como fonte de carbono, acrescidos de 2 g L <sup>-1</sup> de furfural.....	63
Figura 13 – Fermentação em batelada simples em meios sintéticos contendo 4% de glicose e 4 % de xilose das linhagens MP-P5 e EZY-01..	65
Figura 14 - Fermentação em batelada simples em meios sintéticos contendo 4% de glicose e 4 % de xilose, ambos acrescentados 2,0 g L <sup>-1</sup> de furfural.....	69
Figura 15 – Co-fermentação em batelada simples em meios sintéticos contendo 4% de glicose e 4 % de xilose das linhagens MP-P5 e EZY-01..	70
Figura 16 – Co-fermentação em batelada simples em meios sintéticos contendo 4% de glicose, 4% de xilose e furfural (2,0 g L <sup>-1</sup> ) das linhagens MP-P5 e EZY-01.....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Espécies e linhagens de leveduras utilizadas. ....	36
Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados .....	40
Tabela 3 – Velocidade específica de crescimento, produção de etanol e duração da fase <i>lag</i> dos crescimentos em microescala em glicose como fonte de carbono e quantidades crescentes de compostos furânicos. ....	51
Tabela 5 – Valores de inibição de 50% da velocidade específica de crescimento (IC-50) pelos inibidores furânicos para as cepas de leveduras analisadas crescidas em glicose ou xilose. ....	53
Tabela 4 – Velocidade específica de crescimento, produção de etanol e duração da fase <i>lag</i> dos crescimentos em microescala em xilose como fonte de carbono e quantidades crescentes de compostos furânicos. ....	54
Tabela 6 – Parâmetros cinéticos das fermentações em batelada simples, contendo 4% de glicose ou xilose, das linhagens MP-P5 e EZY-01. ....	65
Tabela 7 – Parâmetros cinéticos das fermentações em batelada simples, contendo 4% de glicose ou xilose, ambos acrescidos de 2,0 g L <sup>-1</sup> de furfural, das linhagens MP-P5 e EZY-01. ....	67

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1 O ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL .....	21
1.2 A BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E O ETANOL 2G .....	23
1.3 O PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTO E A FORMAÇÃO DE INIBIDORES NA PRODUÇÃO DO ETANOL 2G. ....	24
1.4 A METABOLIZAÇÃO DA XILOSE E A ENGENHARIA GENÉTICA DE LEVEDURAS .....	28
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>35</b>
3.1 MEIOS DE CULTURA .....	35
3.2 LINHAGENS DE LEVEDURAS UTILIZADAS E MEIOS DE CULTURA .....	35
3.3 CRESCIMENTO CELULAR EM MICROESCALA .....	37
3.3.1 Cálculo da velocidade específica de crescimento, estimativa da fase <i>lag</i> e <i>ic-50</i> .....	38
3.4 SOBRE-EXPRESSÃO DO GENE <i>YNLI34C</i> EM <i>S. CEREVISIAE</i> MP-P5 .....	38
3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS DE QRT-PCR .....	42
3.6 CRESCIMENTOS AERÓBIOS E DETOXIFICAÇÃO DO FURFURAL .....	42
3.7 FERMENTAÇÃO E CO-FERMENTAÇÃO EM BATELADA SIMPLES .....	43
3.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	43
3.8.1 Determinação enzimática de etanol.....	43
3.8.2 Determinação de açúcares e metabólitos via <i>clae</i> .....	44

3.9 CÁLCULO DOS PARÂMETROS DA CINÉTICA FERMENTATIVA .....	44
3.9.1 Consumo total de açúcar .....	44
3.9.2 Velocidade de consumo de açúcar .....	45
3.9.3 Produtividade volumétrica de etanol.....	45
3.9.4 Fator de rendimento em etanol.....	45
3.9.5 Eficiência máxima de produção de etanol .....	46
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
4.1 EFEITO DO FURFURAL E HMF NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS SELVAGENS FERMENTADORAS DE XILOSE .....	47
4.2 CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM RECOMBINANTE DE <i>S.</i> <i>CEREVISIAE</i> QUE SOBRE-EXPRESSA O GENE <i>YNL134C</i> .....	56
4.4 CRESCIMENTOS AERÓBIOS E DETOXIFICAÇÃO DO FURFURAL.....	59
4.5 FERMENTAÇÃO EM BATELADA SIMPLES .....	64
4.6 CO-FERMENTAÇÃO GLICOSE/XILOSE EM BATELADA SIMPLES .....	70
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL

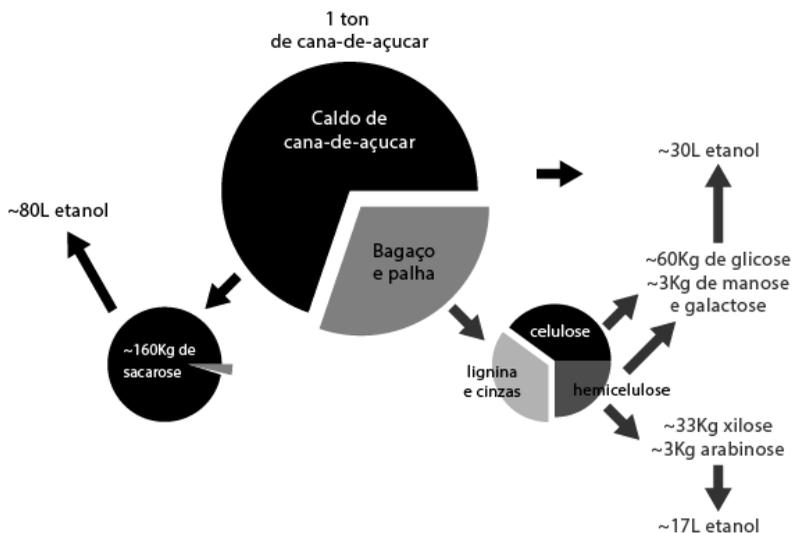
Nas últimas décadas grande destaque tem sido dado à complementação da matriz energética atual, dependente de combustíveis fósseis, por combustíveis oriundos de fontes renováveis, dentre eles o etanol. No Brasil, o etanol começou a ser produzido em larga escala na década de 1970 com o intuito de contornar a problemática dos altos preços dos barris de petróleo, estes afetados pela crise econômica e política daquela época. Para tal feito, foi instituído no país o PROÁLCOOL – Programa Nacional do Alcool visando o estímulo à produção em larga escala de etanol – um substituto à gasolina, a partir da sacarose da cana-de-açúcar, produto esse já cultivado em nosso país em grande quantidade (GOLDENBERG, 2006;2008). De fato, a produção desse biocombustível foi estimulada pela crescente preocupação dos danos ambientais, causados pelo uso excessivo dos combustíveis fósseis, e também pelo início do comércio de carros *flex*, movidos a gasolina ou etanol, no ano de 2003 (GOLDENBERG, 2008).

Na safra 2017/2018, segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), estima-se que a produção de etanol combustível chegue a 26,5 bilhões de litros, totalizando aproximadamente 645 milhões de toneladas de cana-de-açúcar processadas (CONAB, 2017). No cenário mundial o Brasil é o segundo maior produtor de etanol, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América (BRASIL, 2017). O etanol no nosso país é produzido a partir da fermentação da sacarose, proveniente do caldo da cana-de-açúcar, processo esse realizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Como consequência dessa grande quantidade de cana-de-açúcar processada, resíduos oriundos da moagem da cana e do próprio cultivo são gerados. De acordo com Soccol et al. (2010) a partir de uma tonelada de cana-de-açúcar, estima-se que são gerados entre 270-280 Kg de bagaço além de aproximadamente 200 Kg de palha. Essa biomassa é utilizada, majoritariamente, na própria usina para geração de calor/eletricidade, ou ainda, parte dela deixada na própria plantação para ser decomposto por micro-organismos (CORTEZ et al., 2008). No entanto, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar são ricos em açúcares fermentescíveis podendo, também, ser convertidos em etanol, que nesse caso é chamado de etanol de segunda geração ou etanol 2G (PESSOA Jr et al., 2005; STAMBUK et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2016). Nota-se, portanto, que a produção do etanol de segunda geração é dependente

da fermentação dos açúcares presentes no bagaço e na palha da cana-de-açúcar (KUHAD et al., 2011). Estima-se que a fermentação eficiente dos açúcares presentes nessa biomassa aumentaria aproximadamente 50% da produção de etanol sem o aumento de áreas cultiváveis (STAMBUK et al., 2008; GOLDEMBERG, 2008).

Conforme mostrado na Figura 1, a partir de uma tonelada de cana-de-açúcar podem ser gerados aproximadamente 80 litros de etanol de primeira geração. No entanto, com a utilização dos açúcares presentes no bagaço e na palha da cana estima-se que possam ser gerados mais 47 litros de etanol (2G), aumentando assim a produção total, a partir de uma tonelada de cana, para 127 litros (STAMBUK et al., 2008).

Figura 1 - Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. A tecnologia atual de processamento de cana de açúcar e produção de etanol combustível a partir da sacarose é ilustrada à esquerda na figura, enquanto que os avanços tecnológicos necessários para a produção de etanol a partir de bagaço e palha de cana são ilustrados no lado direito da figura.



Fonte: adaptado de Stambuk et al. (2008).

De forma muito positiva, o Brasil é beneficiado na produção de etanol de segunda geração, a partir do bagaço e da palha de cana-de-

açúcar, uma vez que: a) possui alta quantidade de resíduos gerados pela produção do etanol de primeira geração; b) não há necessidade de aumento da área de cultivo, nem tampouco demandam novas terras cultiváveis; c) não competem com cultivares da linha alimentícia devido ao seu baixo valor nutricional (SARKAR et al., 2012; BERREZA e RAGAUSKAS, 2016).

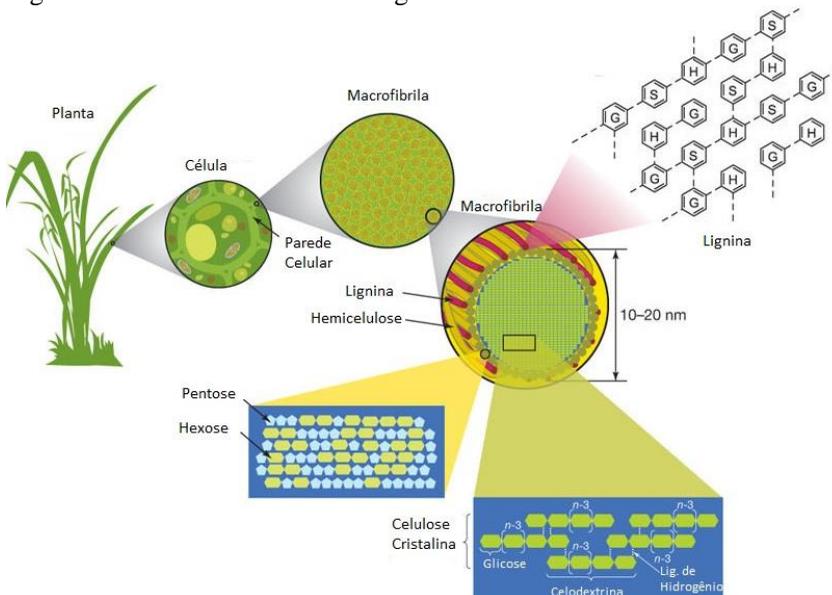
## 1.2 A BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E O ETANOL 2G

A biomassa lignocelulósica é estruturada entre três principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina (Figura 2) e aparecem em diferentes percentuais para distintas biomassas (SANTOS et al., 2012). Essa biomassa lignocelulósica é o maior componente estrutural das plantas lenhosas e não lenhosas e representa a maior fonte de energia renovável existente no mundo (HIMMEL et al., 2007). A celulose, encontrada em maior quantidade na biomassa, é um polímero linear de monômeros de glicose, ligados entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (ZHANG et al., 2012). A hemicelulose, o segundo maior constituinte dessa biomassa, é um heteropolissacarídeo composto por pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose, e galactose). Esse heteropolímero é geralmente classificado de acordo com o açúcar mais abundante na sua cadeia principal, sendo que o mais encontrado em gramíneas, que é o caso da cana-de-açúcar, é a xilana, um polissacarídeo formado por unidades de xilose ligadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (GÍRIO et al., 2010; SANTOS et al., 2012). Já a lignina é uma molécula complexa, amorfa, formada por compostos fenólicos, e tem o papel de dar rigidez, suporte e proteção a planta (POLIZELI et al., 2005; SARKAR et al., 2012). Dessa forma, os hidrolisados de biomassa lignocelulósica possuem dois principais açúcares: a glicose e a xilose. Gírio et al. (2010) e Dos Santos et al. (2016), estimaram que a xilose pode compor até 25% dos açúcares fermentescíveis em alguns hidrolisados. Dessa maneira, um micro-organismo que fermente eficientemente não somente a glicose mas também a xilose é um passo essencial para a produção em larga escala do etanol 2G.

### 1.3 O PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTO E A FORMAÇÃO DE INIBIDORES NA PRODUÇÃO DO ETANOL 2G.

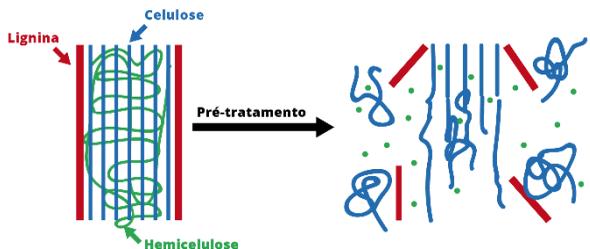
Para que os açúcares estejam disponíveis para a assimilação dos micro-organismos, são necessários dois principais processos. O primeiro é a desestruturação da lignocelulose, chamado de pré-tratamento (Figura 3), e o segundo é a hidrólise da celulose e da hemicelulose. No primeiro processo, o intuito é quebrar a estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica (ABDEL-FATTAH e ABDEL-NADY, 2012; ZHAO et al., 2015). No segundo o objetivo é liberar monômeros dos açúcares presentes na celulose e na hemicelulose, sendo eles a glicose e a xilose, em maior quantidade, respectivamente.

Figura 2 - Estrutura da biomassa lignocelulósica.



Fonte: adaptado de Potters, Goethem e Schutte (2010).

Figura 3 -Desestruturação da biomassa lignocelulósica – o processo de pré-tratamento



Fonte: adaptado de Hsu et al. (1980).

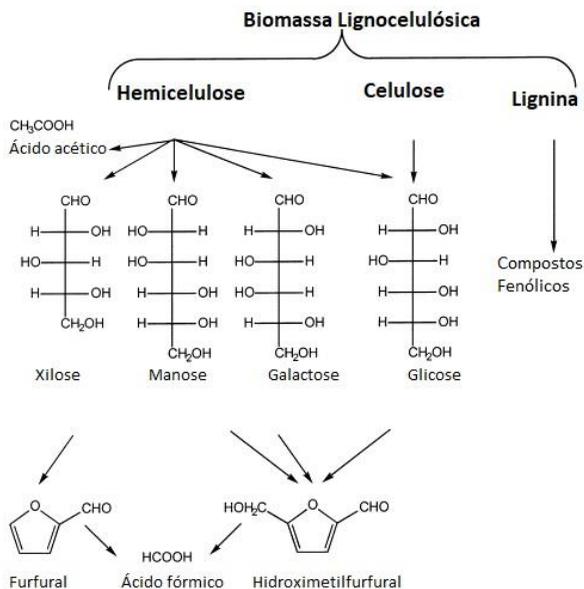
A celulose pode ser hidrolisada em glicose por enzimas específicas, chamadas de celulasas, ou por agentes químicos como o ácido sulfúrico. Já a porção hemicelulósica, por sua vez, pode também ser hidrolisada por agentes químicos ou enzimas chamadas de hemicelulasas (MOSIER et al., 2005). O processo de pré-tratamento vem sendo estudado há vários anos com o objetivo de garantir uma eficiente liberação dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica. Dentre as principais formas utilizadas para tal feito destacam-se: i) os tratamentos químicos que utilizam ácidos ou bases com a finalidade de solubilizar especialmente a celulose e a hemicelulose; ii) os tratamentos físicos que objetivam aumentar a reatividade do material frente as enzimas hidrolíticas; iii) os tratamentos biológicos com o intuito de degradar seletivamente o material através de enzimas específicas.

Além do processo de pré-tratamento, a produção do etanol 2G é dependente, como citado anteriormente, da hidrólise da celulose e hemicelulose, além dos processos de fermentação dos açúcares e a recuperação do etanol, a destilação. A hidrólise separada do processo de fermentação é chamada de SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*). Já quando o processo de hidrólise é realizado concomitantemente ao processo fermentativo é chamado de SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) (MOSIER et al., 2005; CASSELLS et al., 2017). Ainda nesse sentido existe aquele processo onde a sacarificação da celulose, liberando glicose, e da hemicelulose, liberando xilose e arabinose primordialmente, aliado a co-fermentação desses açúcares é realizado ao mesmo tempo, sendo chamado de SSCF (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*) (MOSIER et al., 2005; ZHANG E BAO, 2017).

Diversos estudos tem focado na problemática do processo de pré-tratamento, sendo que o processo considerado mais rentável, até o momento, visto sua eficiência e baixo custo, é a utilização dos ácidos fortes, em especial o sulfúrico, aliado a altas temperaturas (ZHENG, PAN E ZHANG, 2009; ARANTES et al., 2011; DOS SANTOS, 2016). Entretanto, esses processos geram subprodutos indesejados, como aldeídos furânicos, ácidos fracos e compostos fenólicos, que são tóxicos para as células, influenciando assim na produção de etanol (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000; KLINKE, THOMSEN, AHRING, 2004).

A partir da desidratação das hexoses é gerado o 5-hidroximetilfurfural (HMF) (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000; ALMEIDA et al., 2007; JÖNSSON, et al., 2013). Da desidratação das pentoses, presentes na hemicelulose, o principal subproduto é o furfural (TAHERZADEH et al, 2000; PALMQVIST, et al, 2000), este com particularidades indesejáveis devido a sua abundância e efeito tóxico (HEER e SAUER, 2008). Os ácidos acético e fórmico, são gerados, respectivamente, a partir da desacetilação da hemicelulose e da degradação do furfural e HMF (Figura 4).

Figura 4 – Formação de compostos inibitórios durante o processo de pré-tratamento.



Fonte: adaptado de Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000).

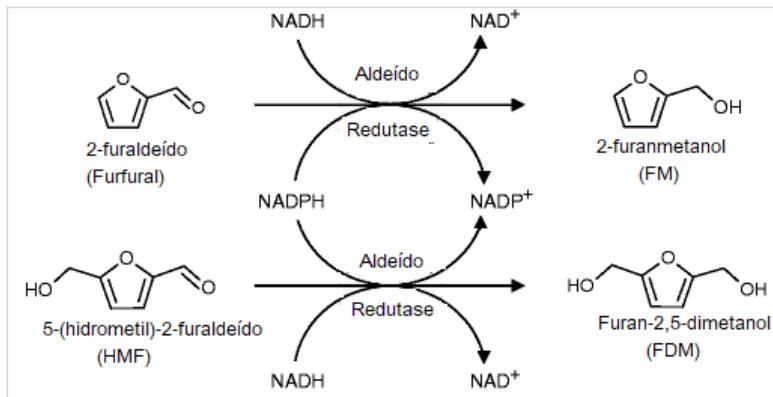
A concentração total de furanos que já foram relatados em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando ácido clorídrico, em concentrações que variam de 0,94 a 3,41 g L<sup>-1</sup>, essas dependentes da concentração do ácido utilizado (CHANDEL et al., 2007). Concentrações que variam entre 1,0 e 2,0 g L<sup>-1</sup> de furfural já foram relatados por Nieves et al. (2011), em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado com explosão a vapor. Ainda, de acordo com os mesmos autores, as concentrações de HMF nesse hidrolisado foi menor que 0,1 g L<sup>-1</sup>.

Dentre os efeitos negativos produzidos por esses dois compostos em micro-organismos estão: i) a inibição da glicólise na levedura *S. cerevisiae*, causada pelo furfural (BANERJEE, BHATNAGAR e VISWANATHAN, 1981); ii) inibição da atividade enzimática em geral, danos ao DNA e inibição da síntese proteica e de RNA foram citados por Taherzadeh et al. (2000) e Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), tanto para o furfural como para o HMF. Ademais, a diminuição da taxa de crescimento e o prolongamento da fase *lag* em diversas leveduras já foram relatadas como efeito da presença desses compostos (LIU et al., 2004; TIAN et al., 2009; ALLEN et al., 2010).

Allen et al. (2010) mostraram que o furfural induz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), causando danos nas mitocôndrias, vacúolos, citoesqueleto de actina e à cromatina nuclear. ERO são geradas em células como subprodutos metabólicos, cuja acumulação pode ser aumentada por fatores ambientais, envelhecimento celular ou mutações gênicas (MORAITIS e CURRAN, 2004; DRAKULIC et al., 2005). Espécies reativas de oxigênio incluem o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e o radical hidroxila (OH<sup>-</sup>) que conforme citado anteriormente causam danos expressivos nas células.

Com o intuito de proteção alguns micro-organismos, dentre eles *S. cerevisiae*, reduz o furfural ao seu respectivo álcool, o 2-furilmetanol (FM) ou álcool furfúrico, através de uma gama de reações de oxirredução mediadas por desidrogenases/reductases, composto esse menos tóxico à célula (HEER E SAUER, 2008; LIU et al., 2004; LIU, SLININGER e GORSICH, 2005). De forma muito similar o HMF é reduzido a furan-2,5-dimetanol (FDM) também menos tóxico para as células (Figura 5). Apesar do processo de detoxificação ocorrer *in situ* a demanda energética para tal fim acarreta efeitos desfavoráveis ao processo (NAVARRO, 1994; PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000; TAHERZADEH et al., 2000; ALMEIDA et al., 2007).

Figura 5 – Vias de conversão do 2-furaldeído (furfural) e 5-(hidroximetil)-2-furaldeído (HMF) em 2-furanmetanol (FM) e furan-2,5-dimetanol (FDM) acoplados com NADH e/ou NADPH e catalisados por aldeído redutases.



Fonte: adaptado de Liu (2011)

Dessa forma, vários estudos se destinam a encontrar e/ou construir micro-organismos que sejam tolerantes ao furfural e o HMF (LIU et al., 2004; GORSICH et al., 2006; CUNHA-PEREIRA, 2011; WANG et al., 2017; BAZOTI et al., 2017).

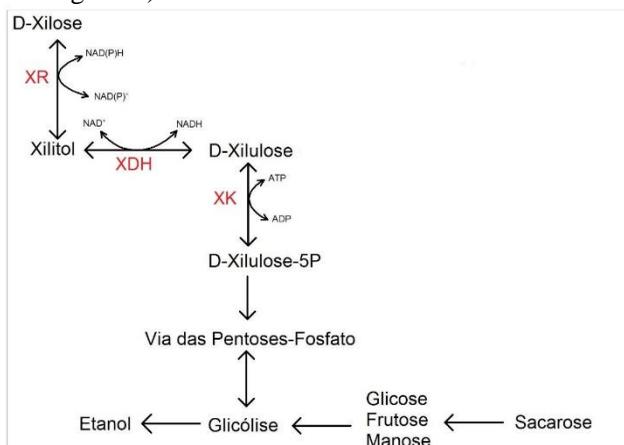
#### 1.4 A METABOLIZAÇÃO DA XILOSE E A ENGENHARIA GENÉTICA DE LEVEDURAS

A levedura *S. cerevisiae* é o principal micro-organismo utilizado na fermentação para produção de etanol de primeira geração, visto suas características particulares de sobreviver e adaptar-se às condições específicas do meio fermentativo industrial. Dentre as mais relevantes estão: sobrevivência a altas concentrações de etanol, pH ácido e a pressão osmótica exercida pela alta concentração de açúcar no caldo, fatores esses que eliminam outros micro-organismos como bactérias e leveduras selvagens (PRETORIUS et al., 2000; QUEROL ET AL., 2003; THOMSON et al., 2005).

Em contrapartida, embora a *S. cerevisiae* seja uma ótima fermentadora de hexoses, naturalmente ela é incapaz de fermentar pentoses (PITKÄNEN et al., 2003; STAMBUK et al., 2008). A capacidade de algumas leveduras de metabolizar a xilose se deve a um

conjunto de reações de oxirredução mediadas por enzimas específicas (Figura 6). Nesse sentido, inúmeros trabalhos tem buscado leveduras capazes de metabolizar pentoses, dentre elas a xilose. Leveduras dos gêneros *Scheffersomyces*, *Candida*, *Spathaspora*, *Kluyveromyces*, e *Sugiyamaella* tem sido relatadas como metabolizadoras de xilose (BARBOSA et al., 2009; CADETE et al., 2009;2012; MOURO, 2012; MORAIS et al., 2013). Dentre essas, a levedura *Spathaspora passalidarum* mostrou-se capaz de converter xilose em etanol com eficiência (HOU, 2012), além de co-utilizar glicose e xilose anaerobicamente. (LONG et al., 2012). Outra espécie do gênero *Spathaspora*, a *Sp. arborariae* também apresentou capacidade de converter xilose em etanol (CADETE et al., 2009). Mouro (2012) mostrou que as leveduras *Candida shehatae*, *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora xylofermentans* e *Spathaspora suhii* obtiveram rendimento fermentativo em etanol, a partir de xilose (g etanol/ g de açúcar), de aproximadamente 0,40, quando o rendimento máximo teórico é de 0,46. Dessa maneira, a busca por novas espécies de leveduras fermentadoras de xilose e tolerantes aos compostos inibitórios, formados no processo de pré-tratamento, mostra-se uma alternativa promissora para a produção de etanol 2G. Embora inúmeras espécies de leveduras tenham sido reportadas como boas fermentadoras de pentoses, em especial a xilose, de uma forma geral essas não demonstram desempenho satisfatório, em escala industrial, se comparadas a *S. cerevisiae*.

Figura 6 - Metabolismo da xilose pela via da XR-XDH (xilose redutase e xilitol desidrogenase).



Fonte: adaptado de Kim et al. (2003).

No entanto, essas leveduras, naturalmente fermentadoras de xilose, tem sido utilizadas como fonte de genes para construção de linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes que abriguem os genes que codificam as enzimas necessárias para a metabolização da xilose (JIN et al., 2000; ELIASSON et al., 2000; MATSUSHIKA et al., 2008; HÁ et al., 2010; Li et al., 2016; LOPES et al., 2017). Dentre essas inúmeras pesquisas na construção de *S. cerevisiae* recombinantes àquelas que utilizam a expressão heteróloga das enzimas xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e a sobre-expressão ou expressão heteróloga da xiluloquinase (XK) tem ganhado destaque. Em algumas leveduras e fungos filamentosos a xilose é metabolizada por reações de oxirredução utilizando essas três enzimas (Figura 6). Primeiramente a D-xilose é reduzida a xilitol por meio da enzima XR NADPH ou NADH-dependente. Posteriormente, o xilitol é oxidado a D-xilulose pela enzima XDH NAD<sup>+</sup>-dependente. Realizada a produção de D-xilulose, essa é fosforilada pela enzima xiluloquinase (XK) resultando em D-xilulose-5P que em seguida é convertida a gliceraldeído-3P e frutose-6P, pela via das pentoses-fosfato, e posteriormente ingressando na via glicolítica, chegando a etanol (ZHOU et al., 2012).

Entretanto, alguns trabalhos tem mostrado que cepas de *S. cerevisiae*, que possuem os genes necessários para a metabolização da xilose, ainda são afetadas negativamente na presença dos inibidores formados no processo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, especialmente em relação ao furfural (FUJITOMI et al., 2012; ASK et al., 2013).

A via das pentoses-fosfato (PPP), mostrou-se de fundamental importância para tolerância ao estresse causado pelo furfural (GORSICH et al., 2006). O cofator NADPH, produzido nessa via, desempenha um papel fundamental na tolerância a esse aldeído furânico (LIU, MA e SONG, 2009). O gene *ZWF1*, participante da PPP, se mostrou o mais relevante para a tolerância ao furfural. Quando esse é silenciado, o crescimento de *S. cerevisiae* é fortemente afetado na presença de furfural (GORSICH et al., 2006). *ZWF1* codifica a glicose-6-fosfato desidrogenase (NOGAE e JOHNSTON, 1990) que regenera o cofator NADPH. O decréscimo no crescimento da levedura não pode ser afetado exclusivamente pela incapacidade de reduzir o furfural (ALLEN et al., 2010), visto que esse pode ser reduzido utilizando apenas NADH (WANG et al., 2017). Da mesma forma, Ishii et al. (2013) relataram que a sobre-expressão do gene que codifica a enzima Adh1, NADH

dependente, melhorou a fermentação de xilose em uma cepa de *S. cerevisiae* que abriga a via da metabolização da xilose XR-XDH.

A sobre-expressão gênica mostra-se uma alternativa promissora no aumento da tolerância de *S. cerevisiae*. Moon e Liu (2015) mostraram um aumento na tolerância ao furfural quando sobre-expressam os genes *YDR541C* e *YGL039W* que codificam enzimas aldeídos-redutases. Da mesma forma a sobre-expressão dos genes *ALD6* e *ADH7*, que codificam uma aldeído redutase e uma álcool-desidrogenase respectivamente, contribuíram para a melhora da tolerância de cepas de *S. cerevisiae* frente ao furfural. Ainda nesse sentido, a sobre-expressão de *ADH7* e *ARI1* que codificam enzimas da família álcool-desidrogenases, demonstrou uma maior tolerância aos inibidores furfural e HMF (PETERSSON et al., 2006; LIU et al., 2008; PARK et al., 2011). Em um trabalho recente, Zhao et al. (2015) reportaram que o gene *YNL134C* está diretamente envolvido na detoxificação de furfural por linhagens de laboratório de *S. cerevisiae*.

Por outro lado, apesar de diversos trabalhos terem mostrado um aumento na tolerância das linhagem de *S. cerevisiae* aos derivados do furano, a grande maioria se restringe-se a utilização da engenharia genética em cepas laboratoriais. Dessa maneira, a reprodutibilidade desses resultados àquelas cepas industriais fica comprometida, uma vez que essa possuem particularidades diferentes das cepas laboratoriais. Nesse contexto, o presente trabalho buscou a sobre-expressão do gene *YNL134C* em uma linhagem industrial recombinante diploide de *S. cerevisiae*, capaz de metabolizar a xilose, objetivando uma maior tolerância ao furfural. Adicionalmente, realizou-se a caracterização bioquímica de diferentes cepas de leveduras brasileiras selvagens, fermentadoras de xilose, quantificando a tolerância das mesmas frente a furfural e HMF, visando selecionar novas cepas ou genes promissores na produção de etanol 2G.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar e otimizar a tolerância de cepas de leveduras selvagens e de linhagens industriais recombinantes de *S. cerevisiae* fermentadoras de xilose, frente a compostos furânicos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar leveduras brasileiras selvagens através do crescimento em meios contendo glicose e xilose na presença de diferentes concentrações de furfural e HMF.
- Construir uma linhagem de *S. cerevisiae* industrial recombinante que sobre-exprese o gene *YNL134C*.
- Avaliar o crescimento, fermentação e detoxificação do furfural pela linhagem que sobre-expressa o gene *YNL134C*, em meios contendo glicose e/ou xilose.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MEIOS DE CULTURA

As cepas foram cultivadas em meio rico YP (10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20 g L<sup>-1</sup> de peptona) suplementados com a fonte de carbono de interesse (2% de glicose ou xilose). Foi utilizado para os ensaios de crescimento e fermentação meio sintético contendo 6,8 g L<sup>-1</sup> de YNB - *Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids* suplementado com a fonte de carbono de interesse. Quando necessário, aos meios foram adicionados 200 mg L<sup>-1</sup> de Geneticina (G418-Sigma), em condições assépticas. Para a preparação dos meios sólidos foi acrescentado ainda 2% de ágar. Todos os meios foram esterilizados por calor úmido (autoclave a 120°C por 20 min) ou por filtração com membranas de nitrocelulose (poro de 0,22 µm).

#### 3.2 LINHAGENS DE LEVEDURAS UTILIZADAS E MEIOS DE CULTURA

As cepas de leveduras utilizadas no presente trabalho estão arroladas na Tabela 1. A cepa recombinante de *S. cerevisiae* MP-P5 é derivada de uma linhagem industrial diploide (PE-2), porém transformada com o vetor integrativo AUR1::pAUR-XKXDHXR (MATSUSHIKA et al., 2008), que contém os genes necessários para a metabolização da xilose, construída por Gonçalves (2014). As linhagens selvagens utilizadas nesse trabalho foram isoladas em diferentes biomas brasileiros e foram cedidas pelo Prof. Dr. Carlos A. Rosa do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Tabela 1- Espécies e linhagens de leveduras utilizadas.

<b>Espécie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Característica</b>	<b>Fonte ou Referência</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BSY21-34B3	MAT $\alpha$ MAL2-8c his3 $\Delta$ 1 trp1-289 loxP- KanMX-loxP- P <sub>ADHI</sub> ::iSUC2	Muller (2013)
	PE-2	Linhagem industrial diplóide, isolada de plantas de produção de etanol 1G.	Basso et al. (2008)
	MP-P5	Industrial diplóide, isogênica PE-2, mas AUR1::pAUR-XKXDHXK	Gonçalves (2014)
	EZY-01	Isogênica MP-P5, mas loxP-KanMX-loxP-pADH1::YNL134C	Este trabalho
<i>Scheffersomyces stipitidis</i>	HM-45.1	Selvagem, isolada de madeira em decomposição, RJ	Mouro (2012)
<i>Candida shehatae</i>	HM-60.1a	Selvagem, isolada de madeira em decomposição, RJ	Mouro (2012)
<i>Spathaspora arborariae</i>	HM-19.1a	Selvagem, isolada de madeira em decomposição, MG	Cadete et al. (2009)
<i>Candida materiae</i>	CAR-15.1b	Selvagem, isolada de madeira em decomposição, MG	Barbosa et al. (2009)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	HB-63b	Selvagem, isolada de bagaço de cana-de-açúcar, SP	Mouro (2012)
<i>Spathaspora passalidarum</i>	HMD-2.1	Selvagem, isolada de madeira em decomposição, AM	Cadete et al. (2012)

(continua)

(continuação)

<b>Espécie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Característica</b>	<b>Fonte ou Referência</b>
<i>Spathaspora passalidarum</i>	HMD-14.2	Selvagem, isolada de madeira em decomposição, AM	Mouro (2012)
<i>Candida queiroziae</i>	IXM-6.1	Selvagem, isolada de intestino de besouro, MG	Santos (2011)
<i>Spathaspora brasiliensis</i>	HMD-19.3	Selvagem, isolada de madeira em decomposição, AM	Cadete et al. (2013)
<i>Spathaspora suhii</i>	XMD-16.2	Selvagem, isolada de madeira em decomposição, RR	Cadete et al. (2013)
<i>Spathaspora roraimanensis</i>	XMD-23.2	Selvagem, isolada de madeira em decomposição, RR	Cadete et al. (2013)
<i>Spathaspora xylofermentans</i>	HMD-23.2	Selvagem, isolada de madeira em decomposição, MG	Cadete et al. (2013)

### 3.3 CRESCIMENTO CELULAR EM MICROESCALA

As leveduras selvagens (Tabela 1) foram inoculadas em meio rico YP contendo 2% glicose e crescidas a 28°C, 160 rotações por minuto por 48 h. Alíquotas destes pré-crescimentos foram retiradas e utilizadas para inocular (absorbância de 0,1 a 600 nm) novos meios de cultivo. Os crescimentos foram avaliados em placas de 96 poços com meio sintético YNB e 2% glicose ou xilose como fonte de carbono, contendo concentrações de furfural e HMF de 0,5 a 4,0 g L<sup>-1</sup>. As placas foram seladas com AccuClear Sealing Film for qPCR (E & K Scientific), objetivando condições de crescimento limitadas por oxigênio (ou microaeróbias). As placas foram incubadas a 28°C e 160 rpm por até 96 h em um leitor multifuncional (TECAN ECHISTO INFINITE M200 PRO) e o crescimento celular determinado pela medida da densidade ótica

(DO<sub>600nm</sub>) a cada 15 minutos. Ao final do crescimento as placas foram centrifugadas a 3500 g por dois min e congeladas à -20°C para posterior análise do etanol produzido.

### 3.3.1 Cálculo da velocidade específica de crescimento, estimativa da fase *lag* e IC-50.

A análise da velocidade específica de crescimento celular ( $\mu$ ) foi determinada utilizando a Equação 1 conforme proposto por Stroppa et al. (2009). Para isso, partiu-se do princípio que a velocidade específica de crescimento, na fase exponencial, é constante e proporcional a concentração celular. Para a identificação da fase exponencial de crescimento foram plotados gráficos dos valores do logaritmo neperiano da concentração celular ( $\ln X$ ) em função do tempo ( $t$ )

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t} \quad \text{Equação (1).}$$

Onde:

$\mu$  = velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ );

$\ln X_f$  = logaritmo neperiano da concentração celular final;

$\ln X_i$  = logaritmo neperiano da concentração celular inicial;

$t$  =  $\epsilon$  é o tempo de crescimento analisado (h);

A estimativa da fase *lag* de crescimento (h) se deu por meio do modelo de Baranyi e foi determinada utilizando o *software* DMFit v3.0 (ComBase; <http://www.combase.cc/tools/>).

Os valores de IC-50 são aqueles capazes de inibir em 50 % a velocidade específica de crescimento das leveduras, e foram determinados utilizando gráficos de  $\mu$  em função da concentração do inibidor (furfural ou HMF) e ainda expressos em funções lineares ou polinomiais que melhor expressaram os dados de cada levedura analisada.

## 3.4 SOBRE-EXPRESSÃO DO GENE *YNL134C* EM *S. CEREVISIAE* MP-P5

A região promotora do gene *YNL134C* foi modificada na linhagem de *S. cerevisiae* MP-P5. Para isso, foram realizadas reações de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando a enzima de alta fidelidade (Phusion® High Fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific) e o termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf), e etapas de

recombinação homóloga, após transformação das leveduras utilizando acetato de lítio, conforme descrito por Gietz e Woods (2006).

Inicialmente, foi realizada a extração de DNA da linhagem de levedura recombinante BSY21-34B3 (MÜLLER, 2013) utilizando-se um kit comercial (YeaStar Genomic DNA Kit™, Zymo Research). Essa linhagem possui em seu genoma o gene *iSUC2* (gene que codifica a enzima invertase intracelular) que está sendo controlado pelo promotor forte e constitutivo do gene *ADHI* (que codifica a expressão da enzima álcool desidrogenase em *S. cerevisiae*) e, imediatamente à montante do promotor  $P_{ADHI}$  dessa linhagem, está o gene *Kan<sup>r</sup>*, que confere resistência ao antibiótico geneticina em leveduras. Com o intuito de amplificar o gene *Kan<sup>r</sup>* juntamente com o promotor do gene *ADHI*, foram utilizados iniciadores específicos (Tabela 2) contendo também regiões com similaridade à região promotora do gene *YNL134C* (Figura 7-A). O fragmento de DNA linear obtido, chamado “módulo de sobre-expressão” (Figura 7-B), foi utilizado para transformar a linhagem MP-P5 e, por recombinação homóloga, foi inserido na região promotora do gene *YNL134C* dessa linhagem (Figura 7-C). Dessa forma, a linhagem contendo o promotor forte e constitutivo do gene *ADHI* juntamente com o gene *Kan<sup>r</sup>* substituíram o promotor do gene *YNL134C* da linhagem MP-P5, dando origem a linhagem EZY-01. A seleção das células recombinantes se deu através de meio seletivo contendo o antibiótico geneticina, e a correta inserção do módulo de sobre-expressão verificada por novas reações de PCR e eletroforese em gel de agarose 1%.

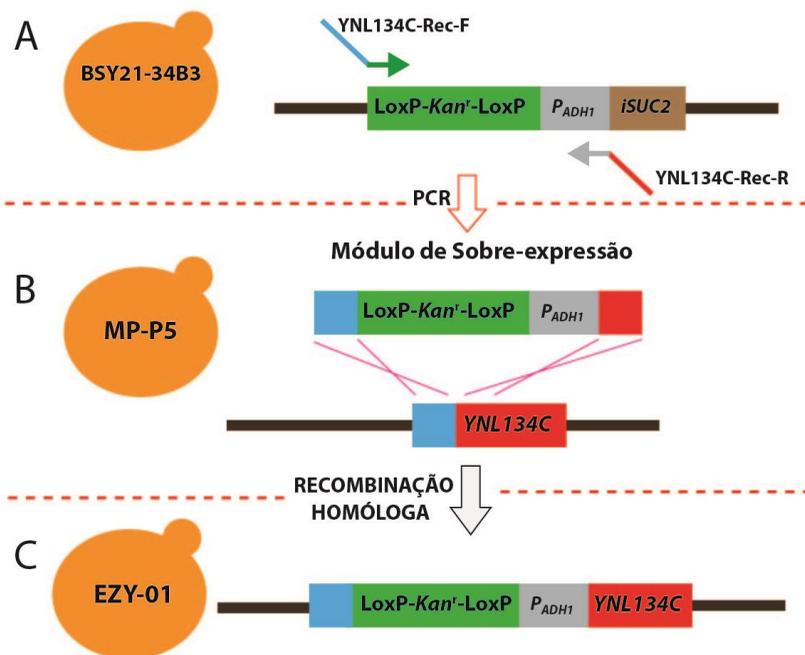
Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Aplicação
Rec- YNL134C- F	<b>ATATGGGCTCCCTCCGTTGG</b> <b>ATTGGCATCGATTAGTAAGG</b> <u>CCAGCTGAAGCTTCGTACGC</u>	Modificar a expressão do gene YNL134C
Rec- YNL134C- R V-	<b>TGACAACGGCTTTCATGGTTT</b> <b>CTGGAATCGAGGCGGACATT</b> <u>GTATATGAGATAGTTG</u>	Modificar a expressão do gene YNL134C
YNL134C- F V-	GGAGAACTGATGTGATGGCC	Verificação
YNL134C- R	CATACCAGCCGTGGTCAATG	Verificação
V-Kan-F	CCGGTTCATTTCGATTCC	Verificação
ACT1-F	TGGATTCCGGTGATGGTGTT	Quantificar a expressão
ACT1-R	CGGCCAAATCGATTCTCAA	Quantificar a expressão
qYNL134C -F	ACCCTGAATACAAGGAAGCC	Quantificar a expressão
qYNL134C -R	ACTGGGATGTGGTGGATTTC	Quantificar a expressão

Nota: As porções sublinhadas permitem a amplificação do módulo de sobre-expressão, já as porções em negrito são para a recombinação homóloga.

Figura 7 - Sobre-expressão do gene *YNL134C*. O fragmento de DNA linear “Módulo de Sobre-expressão” contendo regiões de similaridade à região a montante (em azul) e no início (em vermelho) do gene *YNL134C*

e, por recombinação homóloga, foi inserido à montante desse gene na linhagem MP-P5, originando a linhagem EZY-01.



Fonte: Autoria própria (2018).

As reações de PCR para a obtenção do módulo de sobre-expressão foram realizadas no termociclador com as seguinte programação: desnaturação inicial de 98°C por 30 segundos; seguidas de 35 ciclos com desnaturação inicial de 98°C por 10 segundos, anelamento dos iniciadores à 46°C por 30 segundos, extensão das fitas à 72°C por 1,5 minutos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Para a confirmação da correta inserção do módulo de sobre-expressão foi utilizada a enzima GoTaq® DNA Polimerase (Promega). As condições da reação da PCR, no termociclador, foram: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguidas de 35 ciclos de com desnaturação inicial de 95°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores à 57°C por 4,5 minutos, extensão das fitas à 72°C por 3 minutos e uma extensão final de 5 min à 72°C.

### 3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS DE QRT-PCR

Com o intuito de analisar a expressão gênica do gene *YNLI34C* da linhagem recombinante EZY-01 foi realizado um ensaio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) utilizando o gene *ACT1* como gene calibrador. Para tanto, as células foram pré-crescidas até sua fase exponencial em meio rico (YP) suplementado com 2 % de glicose e coletadas por centrifugação (5000 g à 4°C por 5 min) e lavadas com água deionizada. Posteriormente, o RNA total das células foi extraído utilizando o kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen) seguindo instruções do fabricante. Em seguida 1,0 µg de RNA total foram utilizados para a síntese de cDNA utilizando o QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen), novamente seguindo instruções do fabricante. A reação de qRT-PCR foi realizada utilizando o QuantiFast® SybrGreen PCR Kit (Qiagen). Os oligonucleotídeos específicos para o gene *YNLI34C* utilizados estão arrolados na Tabela 2. Foram utilizados para tal reação 1 mM de cada par de oligonucleotídeos e 50 ng de cDNA em cada reação. As reações de qRT-PCR foram realizadas utilizando o equipamento Rotor-Gene® (Qiagen) com os seguintes ciclos: incubação inicial de 95°C por 5 min; 40 ciclos a 95°C por 10 segundos e 53°C por 30 segundos; e uma incubação final de 95°C por 2 min. Os resultados obtidos foram processados utilizando o *software* específico do equipamento. Para cada ensaio foi gerada uma curva de dissociação (curva de Melting) para confirmação de apenas um produto. Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas. Os valores de expressão gênica representam uma quantificação relativa obtida através do cálculo do DeltaDelta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) que representa a diferença entre o  $\Delta Ct$  da amostra, em relação ao gene de interesse (gene *YNLI34C*), e o  $\Delta Ct$  da amostra calibradora (gene *ACT1*).

### 3.6 CRESCIMENTOS AERÓBIOS E DETOXIFICAÇÃO DO FURFURAL

A fim de determinar o perfil cinético de crescimento aeróbios das linhagens MP-P5 e EZY-01 essas leveduras foram pré-inoculadas em meio rico YP suplementado com 2 % de glicose por 24 h. A seguir, as células foram inoculadas em meio YNB contendo, ou não, 2,0 g L<sup>-1</sup> de furfural, e suplementados com a fonte de carbono de interesse (glicose ou xilose) em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 1/5 de seu volume ( $DO_{600nm}$  inicial= 0,1) e incubadas a 28°C e 160 rpm. Alíquotas foram retiradas, em tempos pré-determinados, para determinação do crescimento celular, medindo a absorbância ( $DO_{600nm}$ ) em

espectrofotômetro. Nos mesmos tempos, outras alíquotas foram retiradas, centrifugadas (3500 g por 4 min) e o sobrenadante armazenado (-20°C) para posterior análise da detoxificação de furfural à 2-furan-metanol via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os crescimentos foram realizados em duplicatas biológicas.

### 3.7 FERMENTAÇÃO E CO-FERMENTAÇÃO EM BATELADA SIMPLES

Para os ensaios fermentativos em batelada simples a levedura EZY-01 foi crescida em 100 mL de meio rico YP, suplementado com 2% da fonte de carbono de interesse, até sua fase exponencial. As culturas foram centrifugadas a 4°C e as células lavadas com água destilada estéril e ressuspensas em água destilada estéril até atingirem uma concentração celular de 20 g L<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 10 mL da suspensão celular foi adicionada à 10 mL de meio sintético YNB contendo 8% de glicose e/ou xilose como fontes de carbono e acrescidos ou não de 4 g L<sup>-1</sup> de furfural, em frascos de 25 mL com tampa fechada. Os frascos foram incubados sob agitação orbital (200 rpm) a 28°C. Em tempos pré-determinados, amostras foram retiradas desses meios para determinação do crescimento celular por densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro e, ainda, outras amostras foram retiradas, centrifugadas e o sobrenadante armazenado para posterior determinação dos perfis de consumo de açúcares e produção de metabólitos via CLAE, bem como a detoxificação do furfural. As fermentações foram realizadas em duplicatas biológicas.

### 3.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

#### 3.8.1 Determinação enzimática de etanol

O etanol produzido nas microplacas (item 3.3) foi quantificado enzimaticamente por reação da enzima álcool oxidase oriunda de *Pichia pastoris* (Sigma) com peroxidase de raiz forte (*Toyobo*), através de metodologia adaptada de Salgado et al. (2000) e Rodionov, Keppen e Sukhacheva (2002). Para tanto, 10 µL de amostra foram incubados em placas de 96 poços com 200 µL do reagente enzimático (0,5 U/mL de álcool oxidase, 4 U/mL de peroxidase, 14 mM de 4-aminoantipirina e 60 mM de fenol). As placas então foram incubadas em leitor multifuncional (TECAN ECHISTO INFINITE M200 PRO) por 1 h e, após esse período, a absorbância foi medida a 505 nm. A concentração final de etanol foi calculada utilizando uma curva de calibração construída com soluções padrão de etanol (0 – 10 g L<sup>-1</sup>).

### 3.8.2 Determinação de açúcares e metabólitos via CLAE

A determinação dos açúcares e os metabólitos produzidos foram realizados utilizando CLAE nas condições que seguem, conforme metodologia validada por Gouveia et al. (2009): Cromatógrafo líquido (Jasco X-LC); coluna: Aminex HPX-87H (Biorad Organic Acid column); fase móvel: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM; fluxo: 0,6 mL min<sup>-1</sup>; temperatura do forno: 45 °C; detector: índice de refração; volume de injeção: 10 µL. A concentração dos açúcares e dos metabólitos foram determinadas utilizando curvas-padrão construídas nas mesmas condições das amostras. A quantificação do furfural foi determinada utilizando CLAE segundo metodologia proposta por Yuan e Chen (1998), nas seguintes condições: Cromatógrafo líquido (PROMINENCE – Shimadzu); coluna: Aminex HPX-87H (Biorad Organic Acid column); fase móvel: acetonitrila/água 80/20 (v/v) com 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; fluxo: 0,8 mL min<sup>-1</sup>; temperatura do forno: 25 °C; detector: UV-VIS (280 nm); volume de injeção: 10 µL. As concentrações de furfural foram determinadas por meio de curva-padrão construída nas mesmas condições das amostras. A conversão de furfural à 2-furan-metanol foi determinada por CLAE conforme metodologia adaptada de Yuan e Chen (1998), nas seguintes condições: Cromatógrafo líquido (Shimadzu - 2020); coluna: Phenomenex - C18; fase móvel: acetonitrila/água 80/20 (v/v); fluxo: 0,6 mL min<sup>-1</sup>; temperatura do forno: 25 °C; detector: UV-VIS (215 nm); volume de injeção: 10 µL. As concentrações de 2-furan-metanol foram determinadas por meio de curva-padrão construída nas mesmas condições das amostras.

## 3.9 CÁLCULO DOS PARÂMETROS DA CINÉTICA FERMENTATIVA

### 3.9.1 Consumo total de açúcar

O consumo total do açúcar (glicose ou xilose) (% C.A) foi calculado pela razão entre o açúcar consumido e o açúcar inicial presente no meio, de acordo com a Equação 2. O montante de açúcar consumido é expresso em porcentagem.

$$\% \text{ C.A} = \left( \frac{\text{açúcar}_0 - \text{açúcar}_f}{\text{açúcar}_0} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

$açúcar_0$  = concentração inicial de açúcar expressa em  $g L^{-1}$

$açúcar_f$  = concentração final de açúcar, expressa em  $g L^{-1}$

### 3.9.2 Velocidade de consumo de açúcar

A velocidade de consumo de açúcar (V) foi calculada entre a razão do açúcar consumido e o tempo de fermentação, de acordo com a Equação 3. A velocidade de consumo de açúcar é expressa em  $g L^{-1} h^{-1}$ .

$$V = \left( \frac{açúcar_0 - açúcar_f}{t} \right) \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

$açúcar_0$  = concentração inicial de açúcar expressa em  $g L^{-1}$

$açúcar_f$  = concentração final de açúcar, expressa em  $g L^{-1}$

t = tempo, expresso em horas.

### 3.9.3 Produtividade volumétrica de etanol

A produtividade volumétrica de etanol (Q) foi calculada pela razão entre a concentração final de etanol e a concentração de etanol no tempo zero e o tempo de fermentação, conforme Equação 4. A produtividade volumétrica de etanol é expressa em  $g L^{-1} h^{-1}$ .

$$Q = \left( \frac{Et_f - Et_0}{t} \right) \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

$Et_f$  = concentração final de etanol, expressa em  $g L^{-1}$

$Et_0$  = concentração final de etanol, expressa em  $g L^{-1}$

t = tempo, expresso em horas.

### 3.9.4 Fator de rendimento em etanol

O fator de rendimento do processo fermentativo ( $Y_{E/S}$ ) é a razão entre a concentração máxima de etanol produzido e a quantidade de açúcar consumida pelas células, de acordo com a Equação 4.

$$Y_{E/S} = \left( \frac{Et_f - Et_0}{açúcar_0 - açúcar_f} \right) \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

$Et_f$  = concentração final de etanol, expressa em  $g L^{-1}$

$E_{t0}$  = concentração final de etanol, expressa em  $g L^{-1}$

$açúcar_0$  = concentração inicial de açúcar expressa em  $g L^{-1}$

$açúcar_f$  = concentração final de açúcar, expressa em  $g L^{-1}$

### 3.9.5 Eficiência máxima de produção de etanol

A eficiência máxima da produção de etanol ( $\eta\%$ ) foi calculada utilizando a razão entre o fator de rendimento em etanol e o coeficiente máximo teórico de transformação de cada açúcar, 0,51 para a glicose e 0,46 para a xilose, conforme descrito por Kim et al. (2013). A eficiência máxima da produção de etanol é expressa em porcentagem.

$$\eta\% = \left( \frac{Y_{E/S}}{(0,46 \text{ ou } 0,51)} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação} \quad (6)$$

Onde:

$Y_{E/S}$  = fator de rendimento em etanol

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITO DO FURFURAL E HMF NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS SELVAGENS FERMENTADORAS DE XILOSE

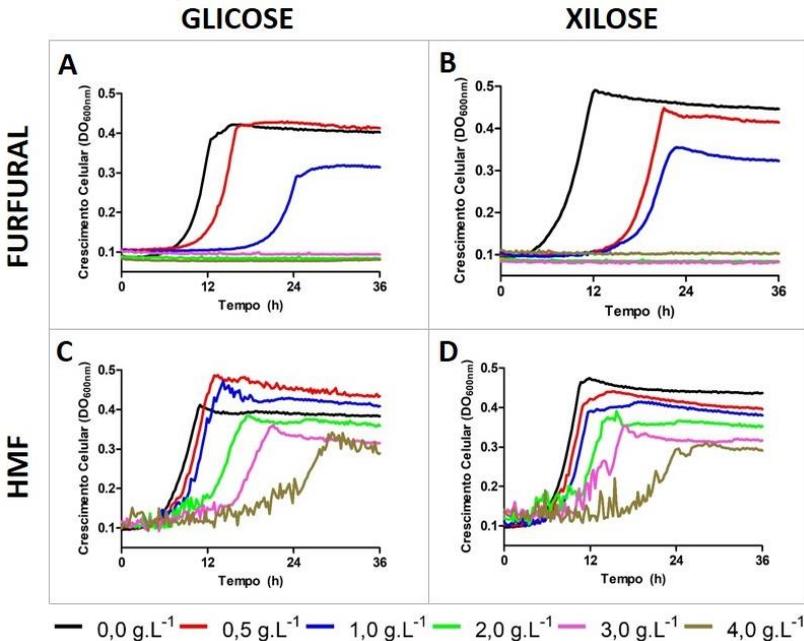
A descoberta de um micro-organismo que fermenta eficientemente as pentoses e hexoses presentes nos hidrolisados da biomassa lignocelulósica, e que sejam tolerantes aos inibidores formados no pré-tratamento, são de suma importância para a produção eficiente do etanol 2G. Dessa maneira, avaliamos o efeito de dois inibidores, o furfural e o HMF, em 12 leveduras selvagens isoladas da microbiota brasileira dos gêneros *Spathaspora*, *Scheffersomyces*, *Candida* e *Kluyveromyces* (Tabela 1). Na Figura 8 pode-se observar a influência do furfural e HMF nas cinéticas de crescimento em microescala pela levedura *Sp. suhii* XMD-16.2 em meios contendo concentrações crescentes dos inibidores e glicose ou xilose como fonte de carbono. Como é possível observar nesta figura, a presença do furfural e HMF afeta não só a velocidade específica de crescimento, como a duração da fase *lag*.

Na Figura 8 é também possível observar que o furfural apresenta um efeito inibitório maior, quando comparado com o HMF. A Figura 9 mostra o efeito dos inibidores nas velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ), produção de etanol e fase *lag* da levedura *Sp. suhii*. Utilizamos essa levedura como modelo para apresentação dos resultados graficamente, uma vez que essa foi aquela que apresentou maiores tolerâncias aos inibidores testados. Já os resultados desses parâmetros para as outras leveduras analisadas podem ser vistos nas Tabelas 3 e 4.

Como podemos observar, as velocidades específicas de crescimento (Figura 9, gráficos A e D) foram afetadas negativamente tanto na presença de furfural como HMF. Ademais, essa diminuição de  $\mu$  foi mais afetada com a fonte de carbono xilose, se comparadas aos crescimentos onde a fonte era glicose. Além disso, concentração de 2,0 g L<sup>-1</sup> de furfural já foram suficientes para inibir totalmente o crescimento da levedura, tanto em glicose como em xilose. Da mesma forma, o tempo de fase *lag* (Gráficos B e E) foi acrescido maiormente na presença de furfural do que em HMF. Enquanto a fase *lag* na presença de 1,0 g L<sup>-1</sup> de furfural em glicose foi de aproximadamente 20 h, na mesma concentração de HMF a fase *lag* foi pouco mais de 5 h. Por consequência a produção de etanol (Gráficos C e F) seguiu o mesmo perfil: furfural afetou mais a produção de etanol do que HMF quando a fonte de carbono era glicose, apresentando um perfil de dose-dependência, enquanto que quando a

fonte de carbono foi xilose ambos os compostos furânicos afetaram a produção de etanol de forma semelhante.

Figura 8 – Cinética de crescimento em microescala da levedura *Sp. suhii* XMD-16.2. Os gráficos A e B representam os crescimentos em microescala contendo furfural e 2 % de glicose (A) ou xilose (B). Os gráficos C e D representam os crescimentos em microescala contendo HMF e 2 % de glicose (C) ou xilose (D).



De acordo com a Tabela 3, pode-se observar que a maioria das cepas analisadas obtiveram uma inibição total do crescimento com apenas  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de furfural quando a fonte de carbono foi glicose, sendo que as leveduras *Sp. arborariae* HM-19.1a, *C. materiae* CAR-15.1b, *Sp. xylofermentans* HMD-23.2 e *Sp. passalidarum* HMD-14.2 não toleraram nem a menor concentração de furfural testada ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ), no entanto esta não parece ser uma característica comum a todas as leveduras *Sp. passalidarum* já que a linhagem HMD-2.1 tolerou esta concentração do inibidor. As únicas leveduras capazes de crescer em  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de furfural foram as leveduras *C. shehatae* HM-60.1a, *K. marxianus* HB-63b, e *Sp. brasiliensis* HMD-19.3. Por outro lado, nessa mesma fonte de carbono, mas quando na presença de HMF a cepa *Sp. brasiliensis* HMD-19.3 foi

capaz de tolerar até 3,0 g L<sup>-1</sup> desse inibidor, e as leveduras *Sp. arborariae* HM-19.1a e *Sp. passalidarum* HMD-14.2 toleraram bem até 2,0 g L<sup>-1</sup> de furfural. Da mesma forma, nossos resultados mostram que a produção de etanol e a duração da fase *lag* foram afetadas de forma mais drástica na presença de furfural do que na presença de HMF.

Já de acordo com a Tabela 4, quando a fonte de carbono foi xilose, apenas as cepas de *Sp. brasiliensis* HMD-19.3, *K. marxianus* HB-63b, *C. shehatae* HM-60.1a e *Sc. stipitis* HM-45.1 foram capazes de tolerar até 1,0 g L<sup>-1</sup> de furfural. Por outro lado, todas as cepas analisadas, com exceção da cepa *Sc. stipitis* HM-45.1, foram capazes de suportar concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup> de HMF quando na presença de xilose, e a levedura *Sp. brasiliensis* HMD-19.3 se destaca por ser tolerante em até 4,0 g L<sup>-1</sup> de HMF na presença de xilose.

O forte efeito inibitório desses dois compostos furânicos pode também ser observado na Tabela 5.

Os valores de IC-50 quando na presença de furfural são notavelmente menores, tanto em glicose como em xilose, do que aqueles em HMF, demonstrando novamente que o furfural causou uma maior inibição de todas as leveduras analisadas. Da mesma forma, a inibição se deu de forma mais acentuada quando a fonte de carbono foi xilose, se comparada aos crescimentos em meio contendo glicose.

De fato, diversos trabalhos já demonstraram a diminuição da velocidade específica de crescimento, produção de etanol e aumento da fase *lag* em algumas leveduras. Delgenes, Moletta e Navarro (1996) já demonstraram que as leveduras *C. sheatae* e *Sc. stipitis* tiveram crescimentos diminuídos em 90 e 99 %, respectivamente, na presença de 2 g L<sup>-1</sup> de furfural e quando a fonte de carbono foi xilose. A produção de etanol também foi afetada de forma negativa em cerca de 90% para ambas as cepas. Os mesmos autores relatam que na presença de 3 g L<sup>-1</sup> de HMF e quando a fonte de carbono foi xilose, os crescimentos de *C. sheatae* e *S. stipitis* foram afetados negativamente em cerca de 70 %, enquanto que a produção de etanol foi diminuída em 90 %. Por outro lado, quando um hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar foi detoxificado anteriormente por troca iônica, a levedura *C. sheatae* apresentou um melhor desempenho no rendimento máximo de produção de etanol quando comparado aquele hidrolisado que continha aproximadamente 2 g L<sup>-1</sup> de compostos furânicos totais (CHANDEL et al., 2007). Oliva et al. (2006) demonstraram que a velocidade específica de crescimento, rendimento em biomassa e produtividade de etanol foram afetadas na presença de furfural na levedura *K. marxianus*.

Figura 9 – Velocidades específicas de crescimento, duração da fase *lag* e produção de etanol da levedura *Sp. suhii* XMD-16.2. Na figura: os gráficos A e D representam as velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ). Os gráficos B e E representam a estimativa da duração da fase *lag* e os gráficos C e F representam a produção de etanol. Para todos os gráficos os quadrados representam os valores obtidos com furfural, e os triângulos representam aqueles obtidos com HMF.

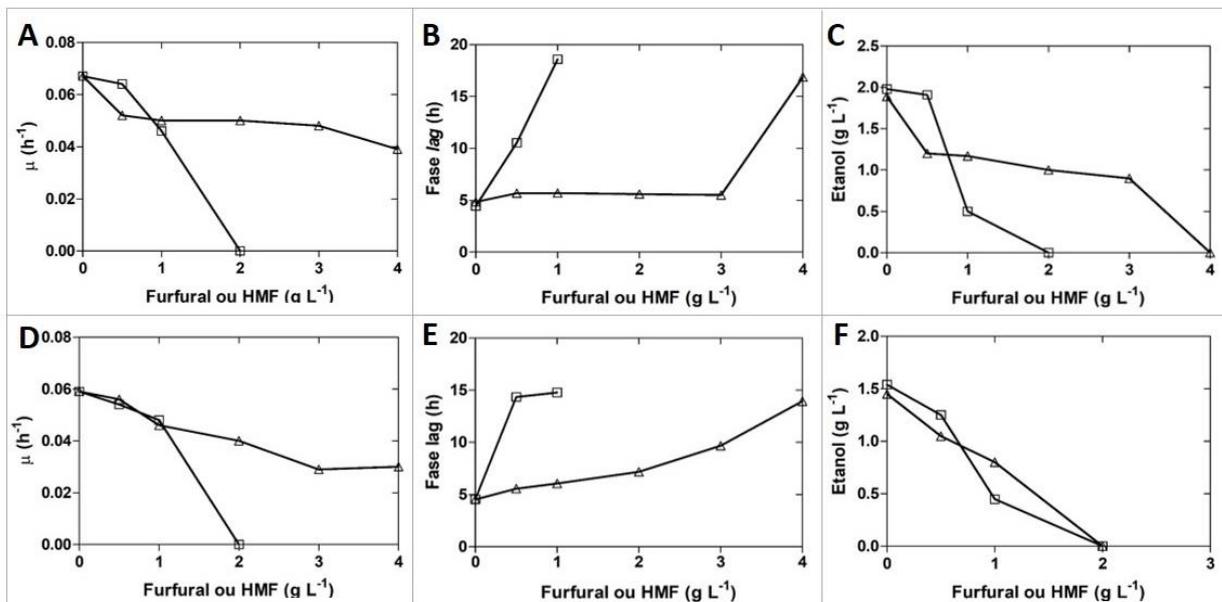


Tabela 3 – Velocidade específica de crescimento, produção de etanol e duração da fase *lag* dos crescimentos em microescala em glicose como fonte de carbono e quantidades crescentes de compostos furânicos.

Cepa	Parâmetro	Controle	Furfural (g L <sup>-1</sup> )		HMF (g L <sup>-1</sup> )				
			0.5	1.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
HM-45.1a	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.045	0.044	*	0.054	0.052	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	2.1	2.2	*	1.3	0.9	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	4,241	15,4	*	9,6	13,0	*	*	*
HM-60.1a	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.066	0.028	0.020	0.028	0.025	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	5.8	4.5	1.3	4.9	2.5	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	4,7	6,6	6,1	11,4	16,5	*	*	*
HM-19.1a	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.070	*	*	0.030	0.021	0.012	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	3.1	*	*	2.8	2.6	0.9	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	4,2	*	*	9,7	13,3	16,9	*	*
CAR-15.1b	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.061	*	*	0.036	0.021	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	1.4	*	*	1.3	0.5	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	10,1	*	*	10,4	15,7	15,7	*	*
HB-63b	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.069	0.065	0.034	0.065	0.034	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	3.0	2.8	2.8	2.8	2.6	1.2	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	5,0	5,4	10,8	5,0	6,3	7,0	*	*
HMD-2.1	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.060	0.060	*	0.060	0.032	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	6.4	4.3	*	4.7	3.2	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	1,1	3,4	*	6,5	12,6	*	*	*

(continua)

(continuação)

Cepa	Parâmetro	Controle	Furfural (g L <sup>-1</sup> )		HMF (g L <sup>-1</sup> )				
			0.5	1.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
IXM-6.1	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.054	0.049	0.048	0.049	0.048	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	1.4	*	*	1.3	0.5	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	7,5	14,7	15,6	9,4	12,4	*	*	*
HMD-19.3	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.050	0.010	*	0.060	0.060	0.060	0.050	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	1,0	1,0	0,0	0,9	0,9	0,7	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	4,5	10,5	18,6	5,6	6,7	5,0	5,1	*
XMD-23.2	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.070	0.050	0.020	0.050	0.040	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	5.9	*	*	0.5	*	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	5,1	12,6	22,0	5,4	8,6	*	*	*
HMD-23.2	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.080	*	*	0,070	0,070	0,030	0,020	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	1,5	*	*	0,5	*	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	4,2	*	*	4,3	5,0	5,5	*	*
HMD-14.2	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,072	*	*	0,041	0,036	0,015	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	7,3	*	*	4,9	3,3	0,5	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	5,9	*	*	7,1	9,9	14,9	*	*
XMD-16.2	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,067	0,064	0,046	0,052	0,050	0,049	0,048	0,039
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	1,9	1,9	0,5	1,2	1,2	1,0	0,9	
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	4,6	10,5	18,6	5,7	5,7	5,7	5,5	16,9

Nota: Todos os crescimentos foram realizados com as mesmas concentrações de furfural e HMF mas, como nenhuma cepa cresceu em concentrações maiores que 2,0 g L<sup>-1</sup> de furfural, esses dados não estão apresentados na tabela.  $\mu$  representa a velocidade específica de crescimento. \* representa que não houve crescimento e/ou produção de etanol para a cepa analisada.

Tabela 4 – Valores de inibição de 50% da velocidade específica de crescimento (IC-50) pelos inibidores furânicos para as cepas de leveduras analisadas crescidas em glicose ou xilose.

<b>Levedura</b>	<b>Açúcar</b>	<b>Furfural (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>HMF (g L<sup>-1</sup>)</b>
HM-45.1 a	glicose	0,80	1,70
	xilose	1,31	0,25
HM-60.1 a	glicose	0,39	1,46
	xilose	0,78	2,33
HM-19.1 a	glicose	0,18	0,49
	xilose	0,18	0,96
CAR-15.1 b	glicose	0,19	1,01
	xilose	0,60	0,41
HB-63b	glicose	1,08	0,45
	xilose	1,08	0,45
HMD-2.1	glicose	0,79	0,99
	xilose	0,33	0,80
IXM-6.1	glicose	1,68	1,84
	xilose	0,73	0,85
HMD-19.3	glicose	0,19	3,46
	xilose	1,68	3,08
XMD-23.2	glicose	1,36	4,23
	xilose	1,56	2,96
HMD-23.2	glicose	0,89	1,53
	xilose	0,51	1,67
HMD-14.2	glicose	0,25	2,00
	xilose	0,25	1,95
XMD-16.2	glicose	1,44	4,31
	xilose	1,63	3,01

Tabela 5 – Velocidade específica de crescimento, produção de etanol e duração da fase *lag* dos crescimentos em microescala em xilose como fonte de carbono e quantidades crescentes de compostos furânicos.

Levedura	Parâmetro	Controle	Furfural (g L <sup>-1</sup> )		HMF (g L <sup>-1</sup> )				
			0.5	1.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
HM-45.1 a	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.040	0.035	0.027	0.030	*	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	0.9	0.8	*	0.8	*	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	15,7	20,5	22,3	15,7	*	*	*	*
HM-60.1 a	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.048	0.030	0.020	0.039	0.037	0.028	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	4.2	3.3	0.7	3.6	1.4	0.8	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	6,2	16,0	23,8	9,2	10,8	*	*	*
HM-19.1 a	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.070	*	*	0.054	0.030	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	2.4	*	*	1.1	*	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	6,5	*	*	20,3	i	*	*	*
CAR-15.1b	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.068	0.041	*	0.016	0.001	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	1.4	*	*	0.9	0.8	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	8,6	19,3	*	18,2	i	*	*	*
HB-63b	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.023	0.005	0.001	*	*	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	0.2	*	*	*	*	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	3,0	7,2	17,4	*	*	*	*	*
HMD-2.1	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.065	0.020	*	0.051	0.040	0.015	0.015	0.010
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	5.6	*	*	4.4	1.8	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	7,4	16,9	*	7,0	11,0	12,3	15,8	i

(continua)

(continuação)

Levedura	Parâmetro	Controle	Furfural (g L <sup>-1</sup> )		HMF (g L <sup>-1</sup> )				
			0.5	1.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
IXM-6.1	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.043	0.034	*	0.034	*	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	1.3	*	*	0.9	0.8	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	9,2	13,8	*	7,2	16,4	*	*	*
HMD-19.3	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.046	0.044	0.043	0.039	0.045	0.042	0.026	0,015
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	0.9	0.9	0.8	0.9	0.9	0.8	0.6	0.3
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	4,6	14,3	14,8	5,6	6,0	7,2	9,7	14,0
XMD-23.2	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.081	0.041	*	0.071	0.070	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	2.8	0.5	*	1.4	*	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	6,6	8,2	*	6,0	10,5	*	*	*
HMD-23.2	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.057	*	*	0.071	0.043	0.041	0.029	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	5.9	*	*	0.5	*	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	5,5	i	*	4,3	5,1	6,1	6,3	*
HMD-14.2	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.054	0.001	*	0.040	0.022	*	*	*
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	6.4	*	*	4.4	1.7	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	7,2	17,9	*	7,8	13,3	*	*	*
XMD-16.2	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,059	0,054	0,048	0,056	0,046	0,040	0,029	0,029
	etanol (g L <sup>-1</sup> )	1,5	1,2	0,5	1,1	0,8	*	*	*
	fase lag (h <sup>-1</sup> )	4,5	14,3	14,8	5,6	6,1	7,2	9,7	13,9

Nota: Todos os crescimentos foram realizados com as mesmas concentrações de furfural e HMF mas, como nenhuma cepa cresceu em concentrações maiores que 2,0 g L<sup>-1</sup> de furfural, esses dados não estão apresentados na tabela.  $\mu$  representa a velocidade específica de crescimento. \* representa que não houve crescimento e/ou produção de etanol para a cepa analisada. i significa que não foi possível determinar a duração da fase lag para aquele experimento.

De forma semelhante em *Sp. arborariae* o furfural já foi reportado como um dos possíveis causadores da inibição de crescimento, extensão da fase *lag* e produtividade de etanol em um hidrolisado de casca de arroz (CUNHA-PEREIRA et al., 2011). Os efeitos do furfural também já foram reportados por Hou e Yan (2012) em uma linhagem de *Sp. passalidarum*.

Assim, embora a maioria das leveduras analisadas não obtiveram desempenhos notavelmente superiores aos ensaios controles (sem a presença dos inibidores), as leveduras *C. queiroziae* IXM 6.1 e *Sp. suhii* XMD-16.2 apresentaram uma maior tolerância ao furfural quando a fonte de carbono foi glicose. Já na presença desse mesmo inibidor, no entanto em xilose, as cepas *Sp. brasiliensis* HMD-19.3, *Sp. roraimanensis* XMD-23.2 e *Sp. suhii* XMD-16.2 foram as que se destacaram. Por outro lado, quando as cepas foram expostas ao HMF, as que apresentaram melhores performances, tanto em glicose como em xilose foram cepas *Sp. brasiliensis* HMD-19.3, *Sp. roraimanensis* XMD-23.2 e *Sp. suhii* XMD-16.2. Dessa maneira, estas leveduras podem ser uma importante fonte de genes de interesse biotecnológico para produção de etanol 2G.

#### 4.2 CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM RECOMBINANTE DE *S. CEREVISIAE* QUE SOBRE-EXPRESSA O GENE *YNL134C*

A sobre-expressão do gene *YNL134C* de uma linhagem laboratorial de *S. cerevisiae* mostrou-se uma alternativa promissora para a detoxificação do furfural (Zhao et al., 2015). Dessa maneira, esse trabalho se propôs a avaliar a detoxificação do furfural em uma cepa industrial (MP-P5) que possui os genes necessários para a metabolização inicial da xilose (XR, XDH e XK) construída por Gonçalves (2014). Para isso, fragmentos de DNA lineares, chamados “Módulos de Sobre-expressão”, foram confeccionados a partir de sua amplificação por PCR utilizando DNA genômico extraído da linhagem de laboratório BSY21-34B3. Os módulos resultantes dessas reações de PCR apresentavam ~3464 pb de tamanho e possuíam o gene de resistência Kan<sup>r</sup> e o promotor P<sub>ADHI</sub> na porção central, e nas extremidades, sequências homólogas às regiões imediatamente a montante e no início do gene *YNL134C*. Utilizando os módulos confeccionados a cepa MP-P5 foi transformada e, por recombinação homóloga, deu-se origem a cepa EZY-01.

A fim de confirmar a correta inserção do módulo de sobre-expressão, foram realizadas reações de PCR utilizando os pares de oligonucleotídeos V-YNL134C-F com V-YNL134C-R, e V-Kan-F

conjuntamente com V-YNL134C-R (Tabela 2). Nas reações onde utilizou-se o par V-Kan-F/V-YNL134C-R foi possível observar a amplificação de uma banda de ~1765 pb na cepa recombinante EZY-01 (Figura 9, coluna 3) e nenhuma banda na cepa parental MP-P5 (Figura 9, coluna 1). Já quando o par de oligonucleotídeos utilizado foi V-YNL134C-F/V-YNL134C-R observou-se uma banda de ~1064 pb tanto na cepa MP-P5 (Figura 9, coluna 2) quanto na EZY-01 (Figura 9, coluna 4), além de uma banda de ~3464 pb nesta cepa EZY-01, correspondente ao módulo de sobre-expressão inserido na região promotora do gene *YNL134C*. A banda de ~1064 pb observada na cepa EZY-01 corresponde a outro alelo do gene *YNL134C* que não foi modificado uma vez que se trata de uma levedura diploide.

Com o intuito de avaliar o nível de expressão do gene *YNL134C* na linhagem EZY-01 foi realizado uma qRT-PCR. O nível de expressão relativa do gene *YNL134C* na linhagem EZY-01 foi cerca de 100 vezes maior que na cepa MP-P5 (Figura 10). Dessa forma constata-se que além da correta inserção do módulo de sobre-expressão, o gene *YNL134C* na linhagem EZY-01 está de fato sobre-expresso.

Figura 9 – Confirmação da construção da linhagem EZY-01 que sobre-expressa o gene *YNL134C*. No gel de agarose: colunas 1 e 3 – iniciadores

V-Kan-F/V-YNL134C-R; colunas 2 e 4 – iniciadores V-YNL134C-F/V-YNL134C-R; coluna 5 – Marcador molecular 1 Kb Fermentas).

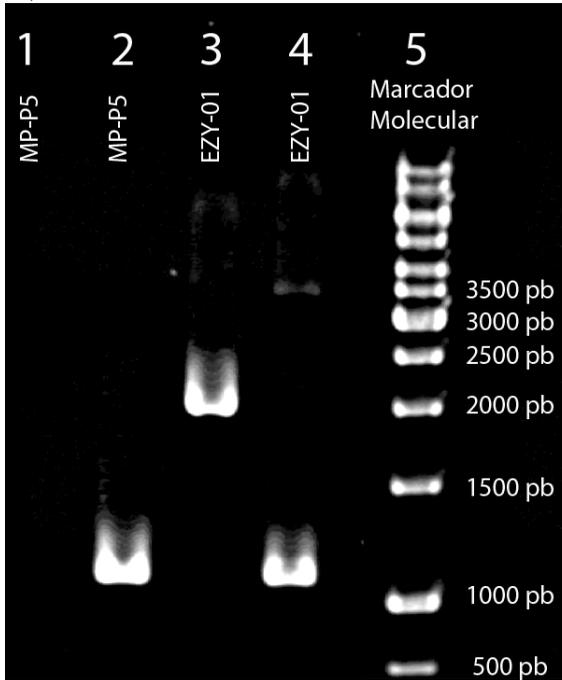
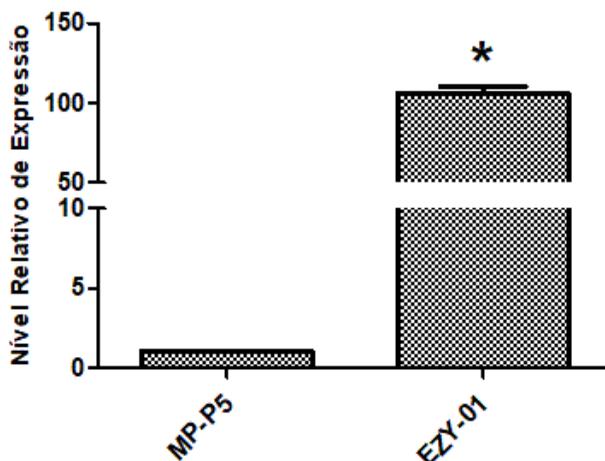


Figura 10 – Análise da expressão do gene *YNL134C* por qRT-PCR. O RNA total de cada linhagem foi extraído de amostras coletadas durante a fase exponencial de crescimento em meio rico contendo 2 % de glicose e submetido à transcrição reversa para obtenção do cDNA. A análise de expressão gênica foi determinada por qRT-PCR e os limites (*thresholds*) de cada ciclo para cada gene foram normalizados com o gene *ACT1*. A expressão relativa de cada linhagem representa a diferença na abundância dos transcritos. Na figura: as barras de erros representam os desvios-padrão de três determinações independentes; o asterisco (\*) representa a

diferença significativa ( $p < 0,05$ ) da expressão entre as duas cepas utilizando o teste *t* de Student.



#### 4.4 CRESCIMENTOS AERÓBIOS E DETOXIFICAÇÃO DO FURFURAL

Com o intuito de analisar os perfis de crescimentos aeróbios e a detoxificação do furfural à 2-furanmetanol, as cepas MP-P5 e EZY-01 foram submetidas a crescimentos em frascos agitados contendo ou não furfural na concentração de  $2,0 \text{ g L}^{-1}$ . Essa concentração foi definida utilizando os valores de furfural encontrados em hidrolisados de bagaço e/ou palha de cana-de-açúcar, conforme relatados por Chandel et al., (2007), Nieves et al., (2011), Vallejos et al., (2016) e Mesa et al., (2014).

De acordo com a Figura 11 as duas cepas apresentaram um perfil de crescimento celular similar, atingindo uma concentração celular máxima equivalente a  $\text{DO}_{600\text{nm}} \cong 10$  e, conseqüentemente, o perfil de consumo de glicose e produção de etanol foram também bastante semelhantes quando os crescimentos foram realizados contendo glicose. O consumo total da glicose se deu em torno de 24 h e a produção máxima de etanol chegou a cerca de  $5 \text{ g L}^{-1}$  para a cepa MP-P5 e pouco mais de  $6 \text{ g L}^{-1}$  na cepa EZY-01. De maneira semelhante, quando a fonte de carbono foi xilose (Figura 11), observou-se novamente um perfil de crescimento celular parecido para as duas cepas ( $\text{DO}_{600\text{nm}} \cong 6$ ). Por outro lado, diferentemente do crescimento em glicose, as duas cepas não foram capazes de consumir totalmente a xilose do meio, restando

aproximadamente  $6 \text{ g L}^{-1}$  ao final de 168 h de incubação. Da mesma forma, tanto a cepa MP-P5 quanto a cepa EZY-01 não foram capazes de produzir etanol a partir de xilose e sim, produziram apenas xilitol (cerca de  $4\text{-}5 \text{ g L}^{-1}$ ).

De forma análoga, foram realizados crescimentos aeróbios com meios contendo glicose ou xilose, na presença de  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  de furfural (Figura 12). Conforme pode ser observado nesta figura, a presença do furfural causou um significativo atraso no crescimento das duas cepas. No entanto, a cepa EZY-01 teve sua fase *lag* diminuída (de 30 a 17 h), quando comparada com a MP-P5 em glicose na presença do furfural.

Na Figura 12 podemos observar também que a velocidade específica de crescimento da linhagem EZY-01 é maior ( $0,93 \text{ h}^{-1}$ ), quando comparada com a velocidade específica de crescimento da linhagem MP-P5 ( $0,62 \text{ h}^{-1}$ ) na presença do furfural. Isso poderia ser explicado pelo fato de que a cepa EZY-01 conseguiu converter o furfural à 2-furanmetanol mais rapidamente, entre 24 e 72 h, se comparada a cepa MP-P5. De acordo com o mesmo gráfico, a concentração de furfural em cerca de 70 h de cultivo foi duas vezes menor com a cepa EZY-01 em relação a cepa MP-P5, embora ao final de 120 h todo o furfural foi convertido por ambas as cepas. Da mesma forma, a glicose foi consumida de forma mais acelerada entre 48 e 72h de crescimento pela cepa EZY-01. No entanto, ao final de 100 h de cultivo, as duas cepas foram capazes de consumir totalmente a glicose. Por outro lado, não foi possível observar grande diferença no perfil de produção de etanol para ambas as cepas, sendo que essas produziram aproximadamente  $6 \text{ g L}^{-1}$  desse metabólito ao final de 100 h de cultivo.

Quando as cepas foram submetidas ao crescimento aeróbio em meio sintético contendo xilose e  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  de furfural não foi possível observar crescimento por nenhuma das cepas (Figura 12). Diferentemente do crescimento em glicose contendo furfural, o perfil de conversão desse, para ambas as cepas, foi muito semelhante e se deu de forma mais lenta, sendo que mesmo após 120 h restava nos dois meios cerca de  $13 \text{ g L}^{-1}$  de furfural. Da mesma maneira a xilose foi consumida de forma muito mais lenta se comparada a glicose, restando no meio aproximadamente  $17 \text{ g L}^{-1}$  desse carboidrato mesmo após 120h de cultivo (Gráfico G). Em contrapartida, não foi possível observar a produção de xilitol (Gráfico H) nem de etanol (dados não mostrados) para nenhuma das cepas a partir de xilose.

A redução do furfural é realizada por *S. cerevisiae*, conforme mostrado na introdução desse trabalho. Essa redução é realizada

utilizando os cofatores NADH e/ou NADPH uma vez que a preferência por esses depende das desidrogenases/reductases (Liu et al., 2011). Recentemente, Zhao et al. (2015) demonstraram que o gene *YNL134C* (alvo desse trabalho) codifica uma enzima que possui atividade dependente apenas de NADH para a redução de furfural. De fato, conforme mostrado acima neste trabalho, o nível de expressão do gene *YNL134C* para a cepa EZY-01 foi cerca 100 vezes maior se comparado com a cepa MP-P5, sugerindo que a reação de catálise do furfural à 2-furanmetanol foi realizada de forma mais rápida quando a fonte de carbono foi glicose. A cepa EZY-01 reduziu o furfural a FM mais rápido (Figura 12-B), acarretando assim uma recuperação também mais rápida do crescimento celular (Figura 12-A). Nossos resultados corroboram com os de Zhao et al. (2015) que mostraram uma conversão do furfural e recuperação do crescimento celular mais rápido em uma cepa de *S. cerevisiae* laboratorial que sobre-expressa o gene *YNL134C*. Em contrapartida, não foi possível observar diferenças notórias no crescimento celular e conversão do furfural quando a fonte de carbono foi xilose (Figura 12-E/F). Na Figura 12-F é possível observar que mesmo após 120h de cultivo a concentração de furfural era aproximadamente  $1,5 \text{ g L}^{-1}$ , valor esse que não permitiu a recuperação do crescimento da levedura (saída da fase *lag*). De fato, alguns trabalhos demonstram que a retomada do crescimento só se dá após a concentração do furfural ser suficientemente baixa (LIU et al., 2004; LIU et al., 2005).

Figura 11 – Crescimentos aeróbios das linhagens MP-P5 e EZY-01 em meio sintético contendo 2% de glicose (A, B e C) e 2% de xilose (D, E e F) como fonte de carbono. Na figura são apresentados: o crescimento celular (A e D), consumo de glicose ou xilose (B e E) e a produção de metabólitos, etanol (C) e xilitol (F). Os resultados da linhagem MP-P5 estão representados pelos círculos brancos enquanto os da linhagem EZY-01 estão representados pelos quadrados em vermelho. Os dados apresentados representam a média de dois experimentos independentes.

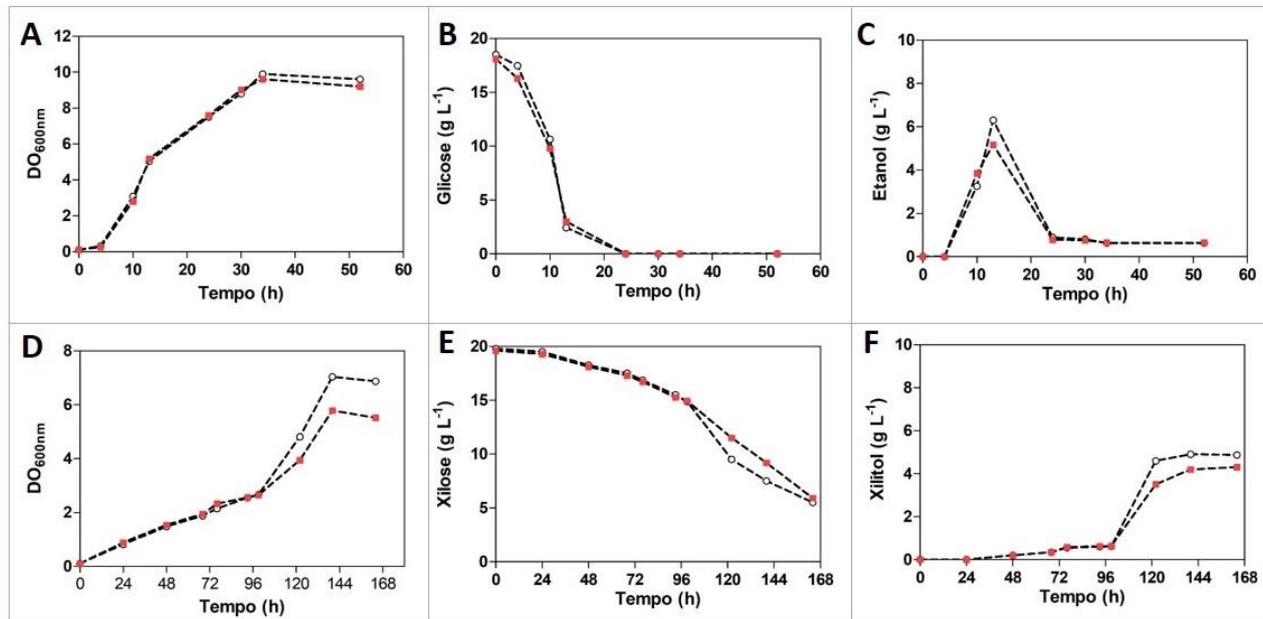
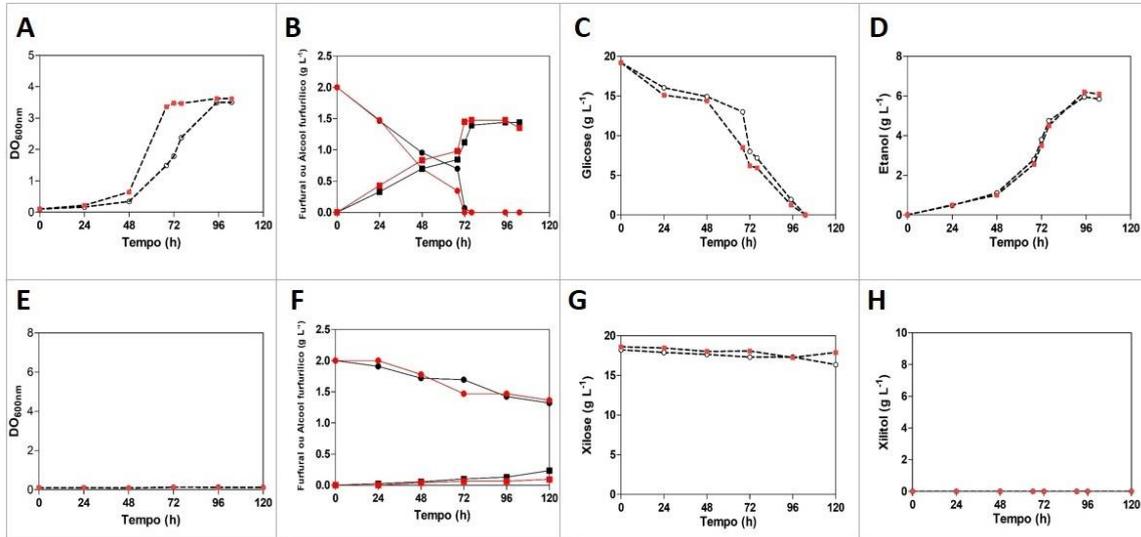


Figura 12 – Crescimentos aeróbios das linhagens MP-P5 e EZY-01 em meio sintético contendo 2% de glicose (A, B, C e D) e 2% de xilose (E, F, G e H) como fonte de carbono, acrescidos de 2 g L<sup>-1</sup> de furfural. Na figura são apresentados: o crescimento celular (A e E), conversão do furfural à FM (B e F) consumo de glicose ou xilose (C e G) e a produção de metabólitos, etanol (D) e xilitol (H). Os resultados da linhagem MP-P5 estão representados pelos círculos brancos enquanto os da linhagem EZY-01 estão representados pelos quadrados em vermelho (Figuras A, C, D, E, G e H). Nos gráficos B e F, os círculos representam o furfural e os quadrados o álcool furfurílico, bem como as cores preta e vermelha representam a linhagem MP-P5 e EZY-01, respectivamente. Os dados apresentados representam a média de dois experimentos independentes.



Embora a expressão do gene *YNLI34C* esteja 100 vezes superior na cepa EZY-01, acredita-se que esse nível de expressão não foi apropriado a ponto de observar diferenças claras na conversão do furfural a FM quando a fonte de carbono foi xilose. Por outro lado, a atividade da proteína YNL134C deve ser mensurada a fim de corroborar esses resultados. Paralelamente, especula-se que o lento consumo de xilose (cerca de  $3 \text{ g L}^{-1}$  em 120h) para ambas as cepas (Figura 12 – G) tenha sido o entrave para uma conversão eficiente do furfural. Embora alguns trabalhos terem mostrado um aumento na expressão do gene *YNLI34C* na presença de peróxido de hidrogênio (GODON et al., 1998), vanilina (WANG et al., 2016) e até mesmo na presença de etanol (MA e LIU, 2010), nenhum deles mostram o impacto desse no metabolismo da glicose tampouco no da xilose.

#### 4.5 FERMENTAÇÃO EM BATELADA SIMPLES

Após realizados os crescimentos aeróbios com as linhagens MP-P5 e EZY-01, foram realizados também fermentações em batelada simples, com altas densidades celulares e condições microaeróbias. Nessas condições a fermentação é favorecida e a concentração celular se assemelha aquelas encontradas em condições industriais de produção de etanol (AMORIM et al., 2011). Os resultados das fermentações em meios sintéticos contendo glicose ou xilose estão expressos na Figura 13 e os parâmetros fermentativos analisados podem ser vistos na Tabela 7.

Por conseguinte, as duas cepas apresentaram um perfil de produção de etanol, aproximadamente  $13 \text{ g L}^{-1}$ , e de xilitol ( $\cong 11 \text{ g L}^{-1}$ ) semelhantes. Ainda de acordo com a Figura 13 e a Tabela 7, foi possível observar que os parâmetros fermentativos analisados, produtividade de etanol, eficiência máxima de produção de etanol, velocidade de consumo de glicose ou xilose, e o fator de rendimento em etanol foram muito similares para as duas cepas, tanto em glicose, quanto em xilose. Quando a fonte de carbono foi glicose obteve-se um rendimento de etanol de 95% para ambas as cepas. Efetivamente, não há do que se contestar a performance fermentativa da cepa MP-P5, em glicose, uma vez que essa é oriunda da linhagem PE-2 – linhagem industrial diplóide, onde foi observado um rendimento de etanol de  $92,0 \pm 1,12\%$  (BASSO et al., 2008).

Figura 13 – Fermentação em batelada simples em meios sintéticos contendo 4% de glicose (A e B) e 4 % de xilose (C e D) das linhagens MP-P5 e EZY-01 (apontadas nos gráficos). Na figura e em todos os gráficos: as linhas pretas representam a concentração celular ( $DO_{600nm}$ ) e as linhas vermelhas representam o etanol; as linhas azuis representam o açúcar em questão, glicose (A e B) e xilose (C e D); e as linhas em verde representam o glicerol (A e B) e o xilitol (C e D). Os dados apresentados representam a média de dois experimentos independentes.

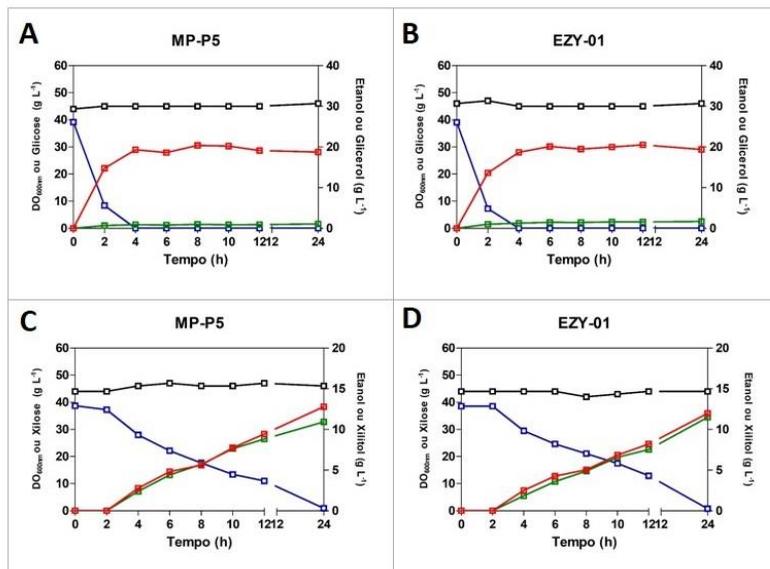


Tabela 6 – Parâmetros cinéticos das fermentações em batelada simples, contendo 4% de glicose ou xilose, das linhagens MP-P5 e EZY-01.

Cepa	Açúcar	% C.A.[%] <sup>a</sup>	V [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] <sup>b</sup>	Q [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] <sup>c</sup>	Y <sub>E/S</sub> [g g <sup>-1</sup> ] <sup>d</sup>	η <sub>p</sub> [%] <sup>e</sup>
MP-P5	Glicose	100,00	9,70	4,80	0,50	95,00
EZY-		100,00	9,70	4,80	0,50	95,00
MP-P5	Xilose	97,60	1,60	0,53	0,34	73,60
EZY-		98,00	1,60	0,50	0,32	68,80

Nota: <sup>a</sup> porcentagem de açúcar total consumido; <sup>b</sup> Velocidade de consumo de glicose ou xilose; <sup>c</sup>Produtividade volumétrica de etanol; <sup>d</sup> Fator de rendimento em etanol; <sup>e</sup> Eficiência máxima de produção de etanol

A acentuada produção de xilitol, quando a fonte de carbono foi xilose, está possivelmente atrelada ao desbalanço da atividade das enzimas XDH/XR (WALFRIDSSON et al. 1997; TAMAKAWA, IKUSHIMA e YOSHIDA, 2013; KIM et al., 2013). Da mesma maneira, a alta atividade da enzima XK pode ser um fator benéfico para a redução do acúmulo de xilitol (MATSUSHIKA e SAWAYAMA, 2011; PARACHIN et al., 2011). Por outro lado, Kim et al. (2013) sugerem que um equilíbrio constante das atividades das enzimas XR/XDH/XK seja mais importante que as atividades individuais de cada uma delas, quando o objetivo for a diminuição do acúmulo de xilitol e aumento da produção de etanol. Eliasson et al. (2000) salientam, a partir de modelagem matemática, que a relação entre os cofatores NADH/NAD<sup>+</sup> teve um impacto maior na formação de xilitol do que a relação da atividade das enzimas XR/XDH/XK. O catabolismo da xilose também está associado a fase não oxidativa da via das pentose-fosfato (METZGER e HOLLENBERG, 1994; JOHANSSON e HAHN-HÄGERDAL, 2002; KARHUMAA et al., 2005; LU e JEFFRIES, 2007;), podendo o desbalanço da atividade das enzimas XR/XDH não serem os únicos fatores da baixa taxa de conversão de xilose à etanol.

De forma idêntica foram realizadas fermentações em meios sintéticos contendo glicose ou xilose na presença 2 g L<sup>-1</sup> de furfural (seção 3.7). A performance fermentativa das linhagens MP-P5 e EZY-01, bem como a detoxificação do furfural, podem ser visualizadas na Figura 14 e na Tabela 7.

Observando a Figura 14 e a Tabela 7 pode-se notar que ambas as cepas analisadas foram capazes de consumir totalmente a glicose em cerca de 4h, mesmo contendo furfural (Gráficos A e B). De fato, o consumo da glicose parece não ter sido afetado pela presença do furfural, uma vez que o fator de rendimento em etanol ( $Y_E/s$ ) alcançou o valor máximo teórico (0,51). Ademais, o furfural foi totalmente reduzido em até duas horas de fermentação para ambas as cepas (Gráficos C e F). Ambas as cepas produziram cerca de 1 g L<sup>-1</sup> de glicerol (Gráficos A e B). O glicerol é formado, sob condições anaeróbias, normalmente para regeneração do excesso de NADH produzido no processo de biossíntese da glicose (NORDSTRÖM 1968; VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986). De outra maneira, embora não haja diferença demonstrável no perfil da conversão do furfural para ambas as cepas (Gráfico C), essa se deu de forma mais rápida do que quando em aerobiose (seção 4.4 – Figura 12-B). Esses resultados corroboram com os de Boyer et al. (1992) e Navarro

(1994) que mostraram que a taxa de redução do furfural aumenta conforme aumenta o tamanho do inóculo.

Tabela 7 – Parâmetros cinéticos das fermentações em batelada simples, contendo 4% de glicose ou xilose, ambos acrescidos de 2,0 g L<sup>-1</sup> de furfural, das linhagens MP-P5 e EZY-01.

Cepa	Açúcar	% C.A[ % ] <sup>a</sup>	V [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] <sup>b</sup>	Q [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] <sup>c</sup>	Y <sub>E/S</sub> [g g <sup>-1</sup> ] <sup>d</sup>	η <sub>%</sub> [%] <sup>e</sup>
MP-	Glicose	100,00	9,75	4,98	0,51	99,83
EZY-		100,00	10,37	5,27	0,51	99,50
MP-	Xilose	89,52	1,41	0,37	0,26	56,81
EZY-		89,02	1,34	0,35	0,26	57,28

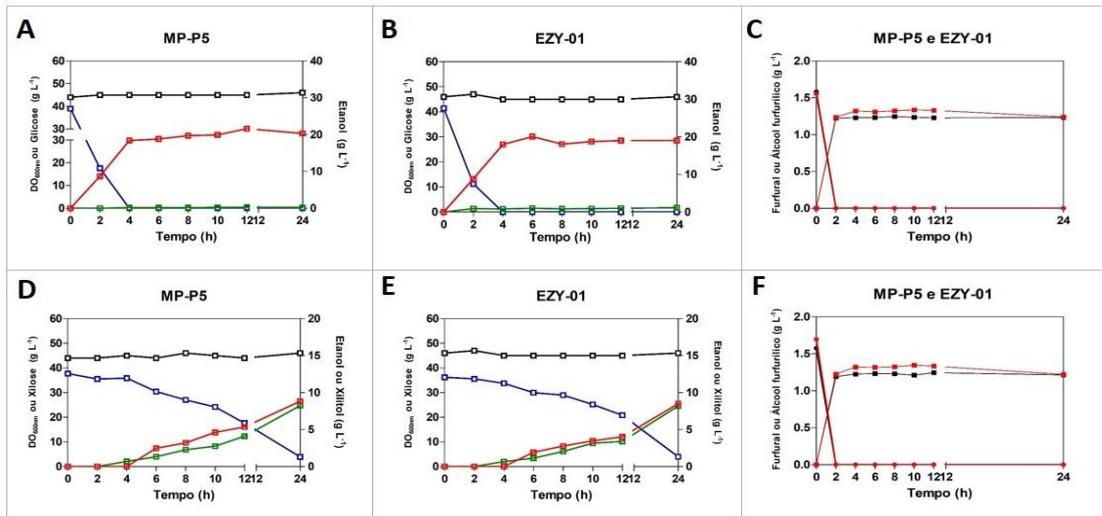
Nota: <sup>a</sup> Porcentagem de açúcar total consumido; <sup>b</sup> Velocidade de consumo de glicose ou xilose; <sup>c</sup> Produtividade volumétrica de etanol; <sup>d</sup> Fator de rendimento em etanol; <sup>e</sup> Eficiência máxima de produção de etanol.

As fermentações realizadas em meios contendo 4% de xilose e 2,0 g L<sup>-1</sup> de furfural (Figura 14 – D e E) apresentaram um maior impacto desse inibidor se comparadas aquelas onde a fonte de carbono foi glicose, especialmente para a cepa EZY-01. De acordo com a Tabela 7, o consumo total de xilose tanto para a cepa MP-P5 quanto para a EZY-01 diminuíram cerca de 8%. Ainda, de acordo com a mesma tabela, a produtividade de etanol (Q) foi afetada negativamente em 0,16 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para a cepa MP-P5 e 0,15 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para a cepa EZY-01. Além disso, a eficiência máxima de produção de etanol alcançou aproximadamente 57 % para ambas as cepas. Mais uma vez a produção de xilitol foi acentuada para as duas cepas analisadas, aproximadamente 8 g L<sup>-1</sup> (Figura 14 – D e E), embora tenha sido levemente inferior a concentração encontrada nas fermentações sem a presença de furfural (Figura 14 – C e D).

A elevada produção de xilitol a partir de xilose em *S. cerevisiae* que abriga a via XR-XDH, possivelmente está atrelada ao desbalanço da atividade dessas enzimas, conforme citado anteriormente nesse trabalho. De fato, a enzima XR pode usar tanto NADH ou NADPH como cofator (RIZZI et al., 1988). Já a enzima XDH utiliza estritamente NAD<sup>+</sup> como cofator (WATANABE, KODAKI e MAKINO, 2005). Dessa forma, em leveduras onde a utilização do NADPH é preferencial pela enzima XR, ocorre um desbalanço, pois não há regeneração do cofator NAD<sup>+</sup> acarretando no acúmulo de xilitol (KÖTTER e CIRIACY, 1993). Esse desbalanço foi contornado, em organismos naturalmente fermentadores de xilose, quando foram adicionadas aos meios fermentativos substâncias que são aceptores de elétrons, tais como aldeídos e cetonas

(ALEXANDER, 1986; BRUINENBERG et al., 1983, LIGTHELM et al., 1989). Ademais, a produção de xilitol foi diminuída em um hidrolisado lignocelulósico conforme relatado por Johansson et al. (2001), possivelmente pela regeneração do  $\text{NAD}^+$  causado por algum componente desse hidrolisado. Antes da adição de furfural na fermentação de xilose por *S. cerevisiae* que abriga a via XR/XDH, oriunda de *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, o xilitol era o principal produto dessa fermentação (WAHLBOM e HAHN-HÄGERDAL, 2002). Felizmente, os mesmos autores apontam que a excreção de xilitol foi cessada quando adicionado o furfural e retomada quando a redução desse se deu por completa. Dessa maneira, mesmo a enzima alvo desse trabalho (YNL134C) utilizar estritamente NADH, regenerando  $\text{NAD}^+$ , o que acarretaria em uma diminuição do acúmulo de xilitol, isso não foi possível de ser observado em nossas fermentações em glicose ou xilose.

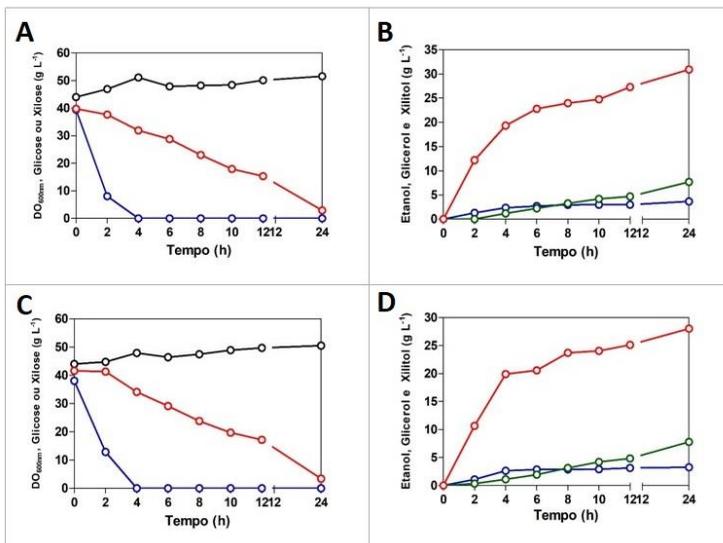
Figura 14 - Fermentação em batelada simples em meios sintéticos contendo 4% de glicose (A, B e C) e 4 % de xilose (D, E e F), ambos acrescentados 2,0 g L<sup>-1</sup> de furfural, das linhagens MP-P5 e EYZ-01 (apontadas nos gráficos). Na figura, nos gráficos A, B, D e E as linhas pretas representam a concentração celular (DO<sub>600nm</sub>); as linhas azuis representam o açúcar em questão (glicose A e B; xilose D e E); as linhas vermelhas representam o etanol e as linhas verdes o glicerol (A e B) ou xilitol (D e E). Já nos gráficos C e F os círculos representam o furfural e os quadrados o álcool furfurílico, bem como as cores preta e vermelha representam a linhagem MP-P5 e EYZ-01, respectivamente. Os dados apresentados representam a média de dois experimentos independentes.



#### 4.6 CO-FERMENTAÇÃO GLICOSE/XILOSE EM BATELADA SIMPLES

Sabendo que os hidrolisados lignocelulósicos contêm uma mistura de açúcares, primordialmente glicose e xilose, foram realizadas co-fermentações desses. Os resultados das co-fermentações em batelada simples estão expostos na Figuras 15.

Figura 15 – Co-fermentação em batelada simples em meios sintéticos contendo 4% de glicose e 4 % de xilose das linhagens MP-P5 (primeira linha) e EZY-01 (segunda linha). Na figura: As linhas pretas representam a concentração celular ( $DO_{600nm}$ ); as linhas azuis e vermelhas, nos gráficos A e C, representam a glicose e a xilose, respectivamente; as verdes e azuis, nos gráficos B e D, representam o xilitol e o glicerol, respectivamente; as linhas vermelhas, nos gráficos B e D, representam o etanol. Os apresentados representam a média de dois experimentos independentes.



Conforme a Figura 15, ambas as cepas foram capazes de consumir totalmente a glicose em cerca de quatro horas de fermentação (Gráficos A e C). Já a xilose foi consumida cerca de 92 % e se deu de forma gradual e lenta (Gráficos A e C). Em consequência, a produção de etanol ( $\cong 30 g L^{-1}$ ), glicerol ( $\cong 3 g L^{-1}$ ) e de xilitol ( $\cong 7 g L^{-1}$ )

também foi muito semelhante tanto para a cepa MP-P5 quanto para a cepa EZY-01 (Gráficos B e D). Da mesma forma, foram conduzidas co-fermentações em batelada simples (glicose/xilose) adicionadas furfural ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$  de furfural) e os resultados dessas estão expressos na Figura 16.

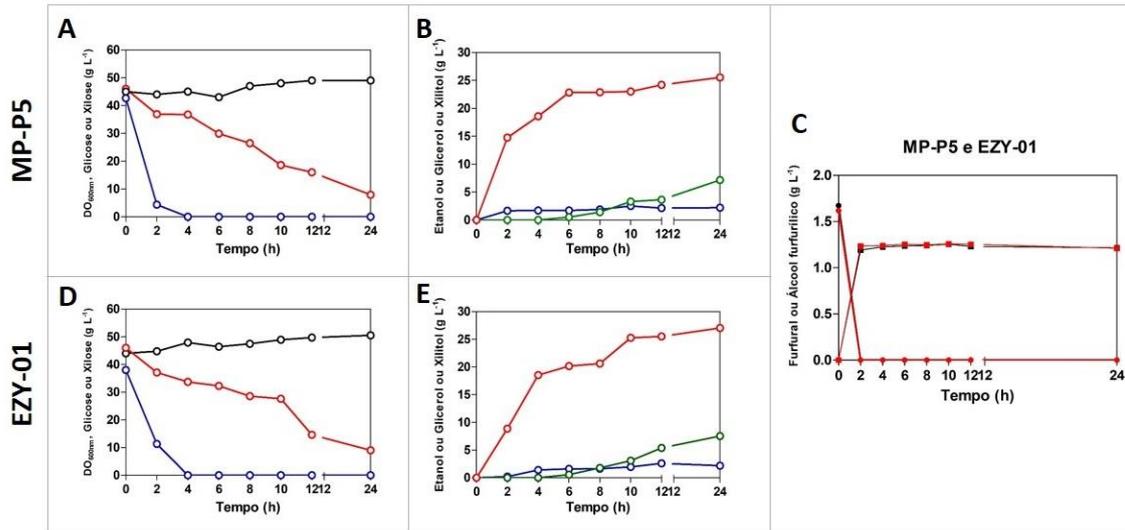
De acordo com a Figura 16, novamente ambas as cepas foram capazes de consumir totalmente a glicose nas quatro primeiras horas de fermentação (Gráficos A e D). No que diz respeito a xilose, essa foi consumida de forma lenta e gradual tanto para a cepa MP-P5 (Gráfico A) quanto para a cepa EZY-01 (Gráfico D). Ao analisarmos o gráfico C da mesma figura, não foi possível observar diferença notável no perfil de conversão do furfural em álcool furfúrico (FM) para as duas cepas analisadas, sendo que ambas foram capazes de converter totalmente o furfural em até duas horas de fermentação. O perfil fermentativo da glicose e xilose, parece não ter sido afetado pela sobre-expressão do gene *YNL134C* (seção 4.5). No entanto, quando em co-fermentação, a velocidade do consumo da glicose (entre 0 e 2h), na cepa EZY-01, foi prejudicado de alguma maneira se confrontado com a da cepa MP-P5. Por outro lado, a produção final de etanol não foi afetada. Entretanto, ao final de 24h de fermentação a concentração da xilose presente no meio fermentativo foi maior, para ambas as cepas, se comparadas às co-fermentações sem a presença de furfural. De fato, a inibição enzimática, o desequilíbrio redox e até o acúmulo de acetaldéido e espécies reativas de oxigênio intracelular, à medida que o furfural é reduzido, já foram reportadas como responsáveis pela diminuição de rendimentos fermentativos na presença de glicose (BANERJEE, BHATNAGAR e VISWANATHAN, 1981; PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000; Allen et al., 2010). Por outro lado, a razão pela qual há um aumento na sensibilidade na fermentação de xilose na presença de furfural não está bem estabelecida (LIU et al., 2009).

Alguns autores sugerem que a tolerância aos compostos inibidores, formados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, pela levedura *S. cerevisiae*, não é dependente somente dos danos causados por esses, mas também da fonte de carbono à ser fermentada visto que em xilose a levedura é mais afetada do que em glicose (ASK et al., 2013; DEMEKE et al., 2013; WALLACE-SALINAS et al., 2014; WANG et al., 2014). De fato, Toon et al. (1997) já reportaram um decréscimo (de 92,8 à 63%) na conversão de xilose por *S. cerevisiae*, em um hidrolisado enzimático de biomassa de milho contendo  $0,18 \text{ g L}^{-1}$  de furfural. Ainda, a levedura *S. cerevisiae* só fermenta efetivamente a xilose em hidrolisados de biomassa caso esses sejam detoxificados previamente ou que ocorra o

reciclo de células (HELLE et al., 2003). Da mesma maneira, Helle et al., (2003) mostraram que quando a taxa de crescimento de *S. cerevisiae* foi diminuída em 50%, a taxa fermentativa em xilose decaiu 80 % enquanto que em glicose a diminuição foi de apenas 10%, em um licor de digestão de madeira, quando na presença de 1,5 g L<sup>-1</sup> de furfural.

A ação do furfural, mesmo sendo convertido rapidamente, na fermentação da xilose, não está completamente elucidada, de modo que preliminarmente, observa-se que a sobre-expressão do gene *YNLI34C* não tenha gerado efeitos notórios na produção final de etanol em anaerobiose.

Figura 16 – Co-fermentação em batelada simples em meios sintéticos contendo 4% de glicose, 4% de xilose e furfural (2,0 g L<sup>-1</sup>) das linhagens MP-P5 (primeira linha) e EZY-01 (segunda linha). Na figura: nos gráficos A e D as linhas pretas representam a concentração celular (DO<sub>600nm</sub>); as linhas azuis e vermelhas, nos gráficos A e D representam a glicose e a xilose, respectivamente; as linhas verdes e azuis, nos gráficos B e E, representam o xilitol e o glicerol, respectivamente; as linhas vermelhas, nos gráficos B e E, representam o etanol. No gráfico C os círculos representam o furfural e os quadrados o álcool furfurílico (FM), bem como as linhas nas cores preta e vermelha representam a linhagem MP-P5 e EZY-01, respectivamente. Os dados apresentados representam a média de dois experimentos independentes





## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem concluir que:

- Nos crescimentos em microescala das cepas de leveduras selvagens, contendo diferentes concentrações de furfural e HMF, foi observado que todas as cepas tiveram diminuição da velocidade específica de crescimento, aumento da fase *lag* e diminuição na produção de etanol em concentrações iguais ou superiores à 0,5 g L<sup>-1</sup> de furfural e HMF. Esses efeitos foram mais visíveis quando a fonte de carbono foi xilose. Ademais, o furfural demonstrou ser mais tóxico do que o HMF. Destacam-se as cepas *C. queiroziae* IXM 6.1 e *Sp. suhii* XMD-16.2 como as mais resistentes na presença de furfural quando a fonte de carbono foi glicose. *Sp. brasiliensis* HMD-19.3, *Sp. roraimanensis* XMD-23.2 e *Sp. suhii* XMD-16.2 foram as cepas que se destacaram como mais resistentes nesse mesmo inibidor, quando crescidas na presença de xilose. Já em HMF as cepas *Sp. brasiliensis* HMD-19.3, *Sp. roraimanensis* XMD-23.2 e *Sp. suhii* XMD-16.2 mostraram-se como as mais tolerantes tanto em glicose como em xilose.
- Nos crescimentos aeróbios na presença de furfural a cepa EZY-01 apresentou uma diminuição da fase *lag* e aumento da velocidade de crescimento específico. Na presença de furfural as linhagens industriais recombinantes foram incapazes de crescer e consumir a xilose.
- Nos ensaios fermentativos em batelada simples e co-fermentação glicose/xilose em batelada simples, na presença ou não de furfural, não foram observadas diferenças notáveis no consumo do(s) açúcar(es) e produção de etanol entre a linhagem EZY-01, que sobre-expressa o gene *YNL134C*, e sua parental MP-P5.



## 6 REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A. F.; ABDEL-NABY, M. A. Pretreatment and enzymic saccharification of water hyacinth cellulose. **Carbohydrate polymers**, v. 87, n. 3, p. 2109-2113, 2012.
- ALEXANDER, N. J. Acetone stimulation of ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 203-207, 1986.
- ALLEN, S.A. et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 2, 2010.
- ALMEIDA, J. R. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p.340-349, 2007.
- AMORIM, H.V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.91, p.1267-1275, 2011.
- ARANTES, V. et al. Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 541-555, 2011.
- ASK, M. et al. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology For Biofuels**, v. 6, n. 1, p.22-30, 2013.
- BANERJEE, N.; BHATNAGAR, R. VISWANATHAN, L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 226-228, 1981.
- BARBOSA, A. C. et al. *Candida materiae* sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood in the Atlantic Rain Forest. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2104-2106, 2009.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BAZOTI, S. F. et al. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, p.582-587, 2017.

BEZERRA, T. L.; RAGAUSKAS, Art J.. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts And Biorefining**, v. 10, n. 5, p.634-647, 2016.

BOYER, L. J. et al. The effects of furfural on ethanol production by *saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n. 1, p. 41-48, 1992.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética (EPE). **Análise da conjuntura de biocombustíveis: Ano de 2016**. Rio de Janeiro. 2017. 70p.

BRUINENBERG, P. M. et al. The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. **European journal of applied microbiology and biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 287-292, 1983.

CADETE, R. M. et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 9, n. 8, p. 1338-1342, 2009.

CADETE, R. M. et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel d-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 2, p. 421-431, 2013.

CASSELLS, B. et al. Hybrid SSF/SHF Processing of SO<sub>2</sub> Pretreated Wheat Straw—Tuning Co-fermentation by Yeast Inoculum Size and Hydrolysis Time. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 181, n. 2, p.536-547, 2017.

CHANDEL, A. K. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p.1947-1950, 2007.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira – Cana-de-Açúcar**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_08\\_24\\_08\\_59\\_54\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_2o\\_lev\\_-\\_17-18.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_24_08_59_54_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_17-18.pdf)>. Acesso em: 31 nov.2017.

CORTEZ, L.A.B.; LORA, E.E.S.; GÓMEZ, E.O. **Biomassa para Bioenergia**. UNICAMP, Campinas, 2008.

CUNHA-PEREIRA, F. da et al. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p.4218-4225, 2011.

DELGENES, J.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.220-225, 1996.

DEMEKE, M.M et al. Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol production. **Biotechnology For Biofuels**, v. 6, n. 1, p.120-137, 2013.

DOS SANTOS, L.V. et al. Second-generation ethanol: the need is becoming a reality. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p.40-57, 2016.

DRAKULIC, T. et al. Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in. **Fems Yeast Research**, v. 5, n. 12, p.1215-1228, 2005.

ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in Mineral Medium Chemostat Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, p.3381-3386, 2000.

FUJITOMI, K.; SANDA, T.; HASUNUMA, T. KONDO, A. Deletion of the *PHO13* gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. **Bioresource Technology**. v.111, p. 161166, 2012.

GIETZ, R. D.; WOODS, Robin A. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. **Yeast Protocol**, p. 107-120, 2006.

GÍRIO, F.M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4775-4800, 2010.

GODON, C. et al. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 35, p. 22480-22489, 1998.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**. v.1, p.6, 2008.

GOLDEMBERG, J. The ethanol program in Brazil. **Environmental Research Letters**, v. 1, n. 1, 2006.

GONÇALVES, D.L. **Influência dos transportadores de açúcares na fermentação de xilose por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2014.

GORSICH, S. W. et al. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 71, n. 3, p.339-349, 2005.

HA, S.-J. et al. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.108, p.504-509, 2010.

HEER, D.; SAUER, U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. **Microbial biotechnology**, v. 1, n. 6, p. 497-506, 2008.

HELLE, Steve et al. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p.786-792, 2003.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HOU, J. et al. Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic engineering**, v. 11, n. 4-5, p. 253-261, 2009.

HOU, X.; YAO, S.. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2591-2601, 2012.

HOU. X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v 94, p. 205-214, 2012.

HSU, T.A.; LADISCH, M.R.; TSAO, G.T. Alcohol from cellulose. **Chem. Technol.** v. 10, n. 5, p. 315-319. 1980.

JIN, Y. et al. Optimal Growth and Ethanol Production from Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Require Moderate D-Xylulokinase Activity. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p.495-503, 2003.

JIN, Y. S. et al. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing genes for xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Pichia stipitis*. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 564-567, 2000.

JOHANSSON, B. et al. Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4249-4255, 2001.

JOHANSSON, B.; HAHN-HÄGERDAL, B. The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001. **FEMS Yeast Res**, v. 2, p. 277–282, 2002.

JÖNSSON, J.L.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology For Biofuels**, v. 6, n. 1, p.16-26, 2013.

KARHUMAA, K. et al. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, p. 5, 2007.

KIM, S. R. et al. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p.851-861, 2013.

KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 776-783, 1993.

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.

KUHAD, R. C. et al. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p.4950-4962, 2011.

LI, X. et al. Comparison of xylose fermentation by two high-performance engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Reports**, v. 9, p.53-56, 2016.

LOPES, D. D. et al. Draft Genome Sequence of the d-Xylose-Fermenting Yeast *Spathaspora xylofermentans* UFMG-HMD23. 3. **Genome announcements**, v. 5, n. 33, p.815-817, 2017.

LIGTHELM, M. E. et al. Effect of hydrogen acceptors on D-xylose fermentation by anaerobic culture of immobilized *Pachysolen*

*tannophilus* cells. **Biotechnology and bioengineering**, v. 33, n. 7, p. 839-844, 1989.

LIU, Z. L. et al. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2, 5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 345-352, 2004.

LIU, Z. L. et al. Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 743-753, 2008.

LIU, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 90, n. 3, p.809-825, 2011.

LIU, Z. L.; MA, M.; SONG, M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Molecular Genetics And Genomics**, v. 282, n. 3, p.233-244, jun. 2009.

LIU, Z. L.; SLININGER, J.P.; GORSICH, W.S. Enhanced Biotransformation of Furfural and Hydroxymethylfurfural by Newly Developed Ethanologenic Yeast Strains. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 121, n. 1-3, p.0451-0460, 2005.

LONG, T.M.; SU, Y.K.; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L.B.; JEFFRIES, T.W. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Appl Environ Microbiol.** v.70, p.5494-5500, 2012.

LOPES, D.D. et al. Influence of genetic background of engineered xylose-fermenting industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 11, p.1575-1588, 2017.

LU, C.; JEFFRIES, T. Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 6072–6077, 2007.

MA, M.; LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 87, n. 3, p.829-845, 2010.

MATSUSHIKA, A. et al. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p.2392-2398, 2009.

MATSUSHIKA, A. et al. Expression of protein engineered NADP<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 243-255, 2008.

MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *saccharomyces cerevisiae* requires high activity of xylose reductase and moderate xylulokinase activity. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 106, n. 3, p.306-309, 2008.

MESA, L. et al. Restructuring the processes for furfural and xylose production from sugarcane bagasse in a biorefinery concept for ethanol production. **Chemical Engineering And Processing: Process Intensification**, v. 85, p.196-202, 2014.

METZGER, M. H.; HOLLENBERG, C. P. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* transketolase gene and expression in a xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 42, p. 319–325, 1994.

MOON, J.; LIU, Z. L. Direct enzyme assay evidence confirms aldehyde reductase function of Ydr541cp and Ygl039wp from *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 32, n. 4, p. 399-407, 2015.

MORAITIS, C.; CURRAN, Brendan P. G.. Reactive oxygen species may influence the heat shock response and stress tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 21, n. 4, p.313-323, 2004.

MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p.673-686, 2005.

MOURO, A. **Fermentação de xilose e celbiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2012.

MÜLLER, G. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a fermentação de sacarose para a produção de álcool combustível no Brasil**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2013.

NAVARRO, R.A. Effects of furfural on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Mathematical models. **Current Microbiology**, v. 29, n. 2, p.87-90, 1994.

NI, H.; LAPLAZA, J. M.; JEFFRIES, T. W.. Transposon Mutagenesis To Improve the Growth of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on D-Xylose. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 73, n. 7, p.2061-2066, 2007.

NIEVES, I. et al. Effect of reduced sulfur compounds on the fermentation of phosphoric acid pretreated sugarcane bagasse by ethanologenic *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p.5145-5152, 2011.

NOGAE, I.; JOHNSTON, M. Isolation and characterization of the ZWF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Gene**, v. 96, n. 2, p.161-169, dez. 1990.

NORDSTRÖM, K.. Yeast growth and glycerol formation II. Carbon and redox balances. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 74, n. 5, p. 429-432, 1968.

OLIVA, M. et al. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1223-1228, 2006.

PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J. S.; HAHN-HÄGERDAL, B.. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnology and bioengineering**, v. 62, n. 4, p. 447-454, 1999.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p.25-33, 2000.

PARACHIN, N. S. et al. Kinetic modelling reveals current limitations in the production of ethanol from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 5, p.508-517, 2011.

PARK, S. et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 6 reduces inhibitory effect of furan derivatives on cell growth and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 10, p. 6033-6038, 2011.

PESSOA-JR, Adalberto et al. Perspectives on Bioenergy and Biotechnology in Brazil. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 121, n. 1-3, p.0059-0070, 2005.

PETERSSON, A. et al. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. **Yeast**, v. 23, n. 6, p. 455-464, 2006.

PITKÄNEN, J. et al. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metabolic Engineering**, v. 5, n. 1, p.16-31, 2003.

POLIZELI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from Fungi: properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. 67: 577- 591, 2005.

POTTERS, G.; GOETHEM, D.V.; SCHUTTE, F. Promising Biofuel Resources: Lignocellulose and Algae. **Nature Education**. v.3. p.9-14. 2010.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

QUEROL, A. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p.3-10, 2003.

RIZZI, M. et al. Xylose fermentation by yeasts. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 29, n. 2-3, p. 148-154, 1988.

RODRIGUEZ-PEÑA, J. The *YGR194c (XKS1)* gene encodes the xylulokinase from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Microbiology Letters**, v. 162, n. 1, p.155-160, 1998.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p.19-27, 2012.

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4820-4825, 2010.

STAMBUK, B. U. et al. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of scientific and industrial research**. V. 67, p. 918-926, 2008.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTASON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Physiological effects of 5-hydroxymethyl-furfural (HMF) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 53, p.701-708, 2000.

THOMSON, J.M. et al. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. **Nature Genetics**, v. 37, n. 6, p.630-635, 2005.

TIAN, S. et al. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 5, p.656-660, 2009.

VALLEJOS, M. E. et al. Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. **Industrial Crops And Products**, v. 91, p.161-169, 2016.

VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. Alexander. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology reviews**, v. 1, n. 3-4, p. 199-224, 1986.

WAHLBOM, C. F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic

fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 2, p.172-178, 2002.

WALFRIDSSON, M. et al. Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* *xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4648-4651, 1996.

WALLACE-SALINAS, V. et al. Re-assessment of *YAPI* and *MCR1* contributions to inhibitor tolerance in robust engineered *Saccharomyces cerevisiae* fermenting undetoxified lignocellulosic hydrolysate. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p.56-68, 2014.

WANG, H. et al. YKL071W from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a novel aldehyde reductase for detoxification of glycolaldehyde and furfural derived from lignocellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-14, 2017.

WANG, X. et al. Comparative metabolic profiling revealed limitations in xylose-fermenting yeast during co-fermentation of glucose and xylose in the presence of inhibitors. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 1, p. 152-164, 2014.

WANG, X. et al. Identification and functional evaluation of the reductases and dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae* involved in vanillin resistance. **Bmc Biotechnology**, v. 16, n. 1, p.16-31, 2016.

WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Complete Reversal of Coenzyme Specificity of Xylitol Dehydrogenase and Increase of Thermostability by the Introduction of Structural Zinc. **The Journal of Biological Chemistry**. v.11, p.10340-10349, 2005.

YUAN, J.; CHEN, F. Separation and Identification of Furanic Compounds in Fruit Juices and Drinks by High-Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p.1286-1291, 1998.

ZHANG, Q.; BAO, J. Industrial cellulase performance in the simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of corn stover for high-titer ethanol production. **Bioresources And Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p.1-7, 2017.

ZHANG, Z.; DONALDSON, A.A.; MA, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advances**. v.30, p.913-919, 2012.

ZHAO, X. et al. YNL134C from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a novel protein with aldehyde reductase activity for detoxification of furfural derived from lignocellulosic biomass. **Yeast**, v. 32, n. 5, p.409-422, 2015.

ZHENG, Y; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International journal of agricultural and biological engineering**, v. 2, n. 3, p. 51-68, 2009.