



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Eduardo Zanella

**Influência dos genes *CTA1* e *CTT1* na tolerância ao furfural em  
*Saccharomyces cerevisiae* recombinante**

Florianópolis  
2023

Eduardo Zanella

**Influência dos genes *CTA1* e *CTT1* na tolerância ao furfural em  
*Saccharomyces cerevisiae* recombinante**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biociências

Orientador(a): Prof.(a) Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Dr.(a)

Florianópolis

2023

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

Zanella, Eduardo  
Influência dos genes CTAl e CTT1 na tolerância ao  
furfural em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante /  
Eduardo Zanella ; orientador, Boris Juan Carlos Ugarte  
Stambuk, 2023.  
98 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,  
2023.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Etanol de segunda  
geração. 3. *Saccharomyces*. 4. Levedura. I. Ugarte Stambuk,  
Boris Juan Carlos. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Biociências. III. Título.

Eduardo Zanella  
**Título: Influência dos genes *CTA1* e *CTT1* na tolerância ao furfural em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Sergio Luiz Alves Junior, Dr.(a)  
Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Prof.(a) Hernán Francisco Terenzi, Dr.(a)  
BQA/CCB/UFSC

Débora Trichez, Dr.(a)  
EMBRAPA - Agroenergia

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Biotecnologia e Biociências.

---

Prof. Aguinaldo Roberto Pinto, Dr.  
Coordenador do PPGBTC

---

Prof. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2023.

Pelo apoio e amor incondicional, aos meus pais dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas e todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao professor Dr. Boris Stambuk pela oportunidade, paciência, orientação e amizade.

Aos Laboratórios: de Defesas Celulares (Prof<sup>o</sup>. Dr. Alcir Luiz Dafre); Bioquímica de Insetos (Prof<sup>o</sup>. Carlos Peres Silva); Biologia Molecular Estrutural – Labime (Prof<sup>o</sup>. Dr. Hernán Terenzi); Laboratório de Experimentação em Neuropatologias (Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcelo Farina) e Laboratório de Engenharia Biológica (Prof. Dr. Luismar Marques Porto e a Dra Karina Cesca) pelo compartilhamento de equipamentos e reagentes. Agradeço, em especial, ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcelo Farina pelo auxílio com os tratamentos estatísticos.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

Aos meus colegas de laboratório pela amizade e parceria ao longo desses sete anos. Vocês foram únicos! Quero agradecer, em especial, ao Leonardo Kretzer (o Lêo) pelas discussões; vezes acaloradas; À Cristina L. Rüntzel pela incansável ajuda na estatística; e à Isadora Cernach pela pronta ajuda em tudo.

A todos os meus amigos, em especial Wendell da Silva Santos e Silmar Dalla Corte pelas nossas sinceras amizades e pela companhia em nossas viagens.

A minha grande amiga e irmã Angela Alves dos Santos. Faço minhas as palavras da sua tese: “Nossas vidas se cruzaram no mestrado e nossa amizade se transformou em irmandade”. Você e Tainá são amizades para a vida!

A 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.

Ao mais novo integrante da minha vida, meu companheiro Hérick Claudino Mendes, pelo amor, paciência (PACIÊNCIA!) e companheirismo nesses últimos momentos do doutoramento.

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

As agências de fomento CAPES, FAPESC e CNPq pelo financiamento do projeto e bolsa de doutorado.

## RESUMO

A obtenção de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de remediar os efeitos deletérios dos diversos compostos inibidores, formados nos processos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, ainda é um dos gargalos na produção de etanol de segunda geração. Dentre esses compostos, o furfural – um aldeído furânico, apresenta-se como um dos mais prejudiciais a essa levedura. Nesse sentido, a remediação do acúmulo de espécies reativas (ER) causado por esse aldeído, é um dos objetivos para a obtenção de uma cepa robusta e eficiente. Dessa forma, este trabalho teve como hipótese norteadora que o distresse causado por furfural, em *S. cerevisiae*, pode ser remediado pela superexpressão e/ou deleção das catalases A e T, codificadas pelos genes *CTA1* e *CTT1*, respectivamente. Para isso, foram utilizadas técnicas de engenharia genômica, como a integração de módulos de superexpressão e/ou a deleção, para modificar a expressão da(s) catalase(s) no genoma dessa levedura. Verificou-se que a correta integração do(s) módulo(s) de superexpressão no genoma da levedura, ocasionou o aumento da atividade da(s) catalase(s), tanto nas linhagens laboratoriais como na linhagem industrial recombinante. Por outro lado, onde ocorreu a substituição do(s) gene(s) que codifica(m) a(s) catalase(s) a atividade dessa enzima foi indetectável. A linhagem onde o gene *CTA1* estava superexpresso (cepa sCTA1) apresentou significativamente menores níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de ER quando comparadas à linhagem parental. Observou-se, ainda, que as linhagens apresentaram diminuição nos níveis dessas enzimas quando crescidas na presença de furfural ou quando a atividade foi avaliada *in vitro* na presença desse aldeído. Nos crescimentos em microescala, na presença de glicose e furfural, a cepa laboratorial sCTA1 apresentou maior crescimento, em relação a cepa parental, na presença de glicose e furfural. Entretanto, quando crescidas na presença de glicose, xilose e furfural, as linhagens mostraram longa fase *lag* ( $\cong$  96h) e não houve diferenças no crescimento celular. Em cofermentações glicose/xilose e furfural a cepa sCTA1 detoxificou esse aldeído mais rápido e, como consequência, consumiu glicose nas primeiras 12 h com velocidade 25% maior que sua cepa parental. Isso refletiu em maior produção de etanol nesse mesmo tempo. Ainda, nas mesmas condições, a linhagem industrial recombinante MPC5H1CA1 apresentou maior consumo de glicose e produção de etanol, nas duas primeiras horas do ensaio fermentativo, se comparadas a linhagem parental. Porém, quando essa linhagem foi submetida a fermentação em hidrolisado lignocelulósico, não foi possível observar claras diferenças no consumo de glicose e xilose e produção de etanol, embora a produção de glicerol foi atenuada, indicando um menor estresse nessas células. Portanto, em conjunto, nossos resultados demonstraram a contribuição da catalase *CTA1* na tolerância ao furfural em linhagens de *S. cerevisiae*.

**Palavras-chave:** catalase; defesas antioxidantes; inibidores; etanol de segunda geração; hidrolisados lignocelulósicos.

## ABSTRACT

Obtaining a strain of *Saccharomyces cerevisiae* capable of remedying the harmful effects of the various inhibitory compounds formed in the pre-treatment processes of lignocellulosic biomass still is one of the bottlenecks in the production of second-generation ethanol. Among these compounds, furfural – a furan aldehyde, is one of the most harmful to this yeast. In that case, the prescription of the accumulation of reactive species (RE) caused by this aldehyde is one of the alternatives to obtain a robust and efficient strain. Thus, this work had as a guiding hypothesis the potential of the overexpression and/or deletion of catalases A and T (encoded by *CTA1* and *CTT1* genes, respectively) to remedy the distress caused by furfural in *S. cerevisiae*. To do that, genomic engineering techniques were used, such as integrating overexpression modules and/or replacing catalase(s) in the genome of this yeast. It was verified that the correct integration of the overexpression module(s) in the yeast genome caused an increase in the catalase(s) activity, both in laboratory and industrial strains. On the other hand, when the catalase genes were, enzyme activity was undetectable. The strain in which the *CTA1* gene was overexpressed (sCTA1 strain) had significantly lower levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ER when compared to the wild-type strain. It was also observed that the strains showed a decrease in the levels of these enzymes when grown in the presence of furfural or when the activity was evaluated in vitro with this aldehyde. In microscale growth, the sCTA1 strain showed greater growth than the parental strain in the presence of glucose and furfural. Despite growing in the presence of glucose, xylose, and furfural, the strains showed a long lag phase ( $\cong$  96h), and there was no difference in cell growth. In co-fermentation with glucose/xylose and furfural, the sCTA1 strain detoxified this aldehyde faster and, consequently, consumed glucose in the first 12 hours at a rate 25% higher than its parental strain. This was reflected in higher ethanol production at the same time. Also, under the same conditions, the strain MPC5H1CA1 showed higher glucose consumption and ethanol production in the first two hours of the fermentation assay if compared to the parental strain. However, when this strain was submitted to fermentation in lignocellulosic hydrolysate, it was impossible to observe apparent differences in glucose and xylose consumption and ethanol production, although glycerol production was attenuated, indicating less stress in these cells. Therefore, altogether, our results demonstrated the contribution of CTA1 catalase to furfural tolerance in *S. cerevisiae* strains.

**Keywords:** catalase; antioxidant defenses; inhibitors; second-generation ethanol; lignocellulosic hydrolysates.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura simplificada da biomassa lignocelulósica.....   | 17 |
| Figura 2 - Formação de inibidores a partir do pré-tratamento físico-químico da biomassa lignocelulósica .....  | 19 |
| Figura 3 - Vias de redução do 2-furaldeído (furfural) em 2-furanmetanol (álcool furfurílico) acoplados com NADH e/ou NADPH e catalisados por aldeído redutases.....  | 20 |
| Figura 4 - Alternativas de vias heterólogas de metabolização de xilose em <i>S. cerevisiae</i> .....   | 23 |
| Figura 5 - Principais sistemas de defesas antioxidantes em <i>S. cerevisiae</i> .....  | 25 |
| Figura 6 - Localização celular das principais enzimas do sistema de defesa antioxidante em <i>S. cerevisiae</i> .....  | 26 |
| Figura 7 - Inserção dos genes <i>Kan<sup>r</sup></i> e <i>Ble<sup>r</sup></i> à montante do promotor P <sub>TDH3</sub> . ...   | 32 |
| Figura 8 - Amplificação do módulo de superexpressão e transformação na levedura CENPK-X-RDK .....  | 33 |
| Figura 9 - Amplificação do módulo de superexpressão e transformação na levedura MPC5H1 .....   | 34 |
| Figura 10 - Amplificação do módulo de deleção e transformação na levedura CENPK-X-RDK.....   | 35 |
| Figura 11 - Amplificação dos módulos de deleção e de superexpressão para transformação nas leveduras dCTA1 e sCTA1 .....   | 35 |
| Figura 12 - Amplificação do módulo de superexpressão e transformação nas leveduras dCTA1 e dCTT1.....  | 36 |
| Figura 13 - Confirmação da inserção do gene <i>Kan<sup>r</sup></i> a montante do P <sub>TDH3</sub> .....   | 43 |
| Figura 14 - Confirmação da inserção do gene <i>Ble<sup>r</sup></i> a montante do P <sub>TDH3</sub> .....   | 44 |
| Figura 15 - Confirmação da inserção do módulo de superexpressão a montante do gene <i>CTA1</i> , originando a linhagem sCTA1 .....   | 45 |
| Figura 16 - Confirmação da inserção do módulo de superexpressão a montante do gene <i>CTT1</i> , originando a linhagem sCTT1.....  | 47 |
| Figura 17 - Confirmação da inserção do módulo de superexpressão a montante do gene <i>CTT1</i> , originando a linhagem sCTA1-sCTT1.....  | 47 |
| Figura 18 - Confirmação da inserção do módulo de superexpressão a montante do gene <i>CTA1</i> , originando a linhagem MPC5H1CA1.....  | 48 |
| Figura 19 - Confirmação da deleção do gene <i>CTA1</i> originando a linhagem dCTA1. Em A: Representação esquemática do anelamento dos iniciadores utilizados bem como o comprimento dos amplificadores.....  | 48 |
| Figura 20 - Confirmação da deleção do gene <i>CTT1</i> originando a linhagem dCTT1.....  | 49 |
| Figura 21 - Confirmação da deleção do gene <i>CTT1</i> na linhagem dCTA1 originando a linhagem dCTA1-dCTT1 .....   | 50 |
| Figura 22 - Confirmação da inserção do módulo de superexpressão na linhagem dCTA1, originando a linhagem dCTA1-sCTT1 .....   | 50 |
| Figura 23 - Confirmação da inserção do módulo de superexpressão na linhagem dCTT1, originando a linhagem dCTT1-sCTA1 .....   | 51 |
| Figura 24 - Níveis de atividade relativa da catalase nos sobrenadante dos extratos proteicos totais obtidos das diferentes linhagens crescidas em YPD ou YPD contendo 3,8 g L <sup>-1</sup> de furfural..... | 52 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 25 - Níveis de atividade relativa da catalase utilizando sobrenadante de extratos proteicos totais obtidos das diferentes linhagens crescidas em YPD.   | 57 |
| Figura 26 - Concentração média inibitória de 50% da atividade da(s) catalase(s) ( $IC_{50}$ ), <i>in vitro</i> .....   | 58 |
| Figura 27 - Níveis intracelulares de $H_2O_2$ mensurados através do Kit Amplex Red® .....  | 59 |
| Figura 28 - Níveis intracelulares de espécies reativas medidos através da sonda DCF-DA .....   | 60 |
| Figura 29 - Cinética de crescimento celular em microescala e produção final de etanol.....   | 65 |
| Figura 30 - Cofermentação em batelada simples das linhagens CENPK-X-RDK (símbolos abertos) e sCTA1 (símbolos fechados) em meios ricos YP contendo $40\text{ g L}^{-1}$ de glicose e $20\text{ g L}^{-1}$ de xilose acrescidos de $3,8\text{ g L}^{-1}$ de furfural. .... | 67 |
| Figura 31 - Velocidade de consumo de glicose (A) e produção de etanol (B) durante a cofermentação em meios ricos YP contendo $40\text{ g L}^{-1}$ de glicose e $20\text{ g L}^{-1}$ de xilose acrescidos de $3,8\text{ g L}^{-1}$ de furfural .....                      | 69 |
| Figura 32 - Cofermentação em batelada simples das linhagens MPC5H1 e MPC5H1CA1 em meios ricos YP contendo $40\text{ g L}^{-1}$ de glicose e $20\text{ g L}^{-1}$ de xilose acrescidos de $3,8\text{ g L}^{-1}$ de furfural .....   | 69 |
| Figura 33 - Cofermentação em batelada simples das linhagens MPC5H1 e MPC5H1CA1 em hidrolisado hemicelulósico produzido por PEREIRA et al. (2022) e ajustado para $75\text{ g L}^{-1}$ de glicose .....   | 70 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho .....   | 29 |
| Tabela 2 - Oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados neste trabalho .....  | 31 |
| Tabela 3 – Parâmetros cinéticos das cofermentações em meios sintéticos (MS) ou hidrolisado hemicelulósico (HH), pelas cepas CENPK-X-RDK, sCTA1, MPC5H1 e MPC5H1CA1..... | 68 |

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>14</b> |
| 1.1      | BIOETANOL – DO PROÁLCOOL AO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....  | 14        |
| 1.2      | O PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTO E A FORMAÇÃO DO FURFURAL.....  | 18        |
| 1.3      | FURFURAL – TOXICIDADE E REMEDIAÇÃO .....  | 19        |
| 1.4      | METABOLIZAÇÃO DE XILOSE POR <i>S. CEREVISIAE</i> RECOMBINANTE: ESTADO DA ARTE .....   | 21        |
| 1.5      | O ESTRESSE OXIDATIVO E OS SISTEMAS DE DEFESAS ANTIOXIDANTES EM <i>S. CEREVISIAE</i> .....   | 24        |
| <br>     |   |           |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>28</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL.....   | 28        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 28        |
| <br>     |   |           |
| <b>3</b> | <b>METODOLOGIA</b> .....  | <b>29</b> |
| 3.1      | LINHAGENS DE LEVEDURAS UTILIZADAS E MEIOS DE CULTURA....  | 29        |
| 3.2      | ENGENHARIA GENÉTICA EM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....  | 30        |
| 3.3      | OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA(S) CATALASE(S) .....   | 36        |
| 3.4      | DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS (ER) .....   | 37        |
| 3.5      | DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – MÉTODO AMPLEX® RED ....  | 38        |
| 3.6      | CRESCIMENTO CELULAR EM MICROESCALA .....  | 38        |
| 3.7      | COFERMENTAÇÃO EM BATELA SIMPLES .....   | 39        |
| 3.8      | DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....  | 40        |
| 3.9      | CÁLCULO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS .....  | 40        |
| <br>     |   |           |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | <b>42</b> |
| 4.1      | CONSTRUÇÃO DOS MÓDULOS DE SUPEREXPRESSÃO UTILIZANDO OS GENES <i>KAN<sup>R</sup></i> , <i>BLE<sup>R</sup></i> E O PROMOTOR P <sub>TDH3</sub> ..... | 42        |
| 4.2      | OBTENÇÃO DAS LINHAGENS ONDE OS GENES <i>CTA1</i> E/OU <i>CTT1</i> ESTEJAM SUPEREXPRESSOS.....   | 44        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.3      | OBTENÇÃO DAS LINHAGENS ONDE OS GENES <i>CTA1</i> E/OU <i>CTT1</i> ESTEJAM DELETADOS. ....   | 46        |
| 4.4      | OBTENÇÃO DAS LINHAGENS COMBINANDO DELEÇÃO COM SUPEREXPRESSION DAS CATALASES.....  | 49        |
| 4.5      | ATIVIDADE DA(S) CATALASE(S) NAS LEVEDURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS.....  | 51        |
| 4.6      | O PAPEL INIBIDOR DO FURFURAL NA(S) ATIVIDADE(S) DA(S) CATALASE(S) <i>IN VITRO</i> .....   | 56        |
| 4.7      | NÍVEIS INTRACELULARES DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> E DE ESPÉCIES REATIVAS (ER)  | 58        |
| 4.8      | CRESCIMENTO CELULAR EM MICROESCALA E COFERMENTAÇÃO EM BATELADA SIMPLES .....  | 63        |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>  | <b>73</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>75</b> |
|          | <b>APÊNDICE A - Cofermentação em batelada simples das linhagens CENPK-X-RDK e SCTA1 em meios ricos YP contendo 40 g L<sup>-1</sup> de glicose e 20 g L<sup>-1</sup> de xilose. Os dados expressam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes (n=2).....</b> | <b>98</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 BIOETANOL – DO PROÁLCOOL AO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

O aumento populacional mundial elevou conseqüentemente a demanda por diversas fontes energéticas, dentre elas os combustíveis de origem fóssil, como os derivados de petróleo e o carvão. No entanto, a ampla queima dos combustíveis fósseis para gerar eletricidade, calor e para abastecer o transporte, tem aumentado os níveis de dióxido de carbono na atmosfera, contribuindo para as mudanças climáticas (SUBRAMANIAM e MASRON, 2021). Nesse contexto, a utilização de biocombustíveis é de grande importância para contornar esse problema; sendo, nos últimos anos, especialmente pautada em políticas governamentais e organizacionais (BRASIL, 2021a).

Em 2015, vários países, incluindo o Brasil, firmaram o Acordo de Paris durante a 21ª Conferência das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (COP21), com o objetivo de reduzir as emissões de gases do efeito estufa e limitar o aquecimento global (BRASIL, 2016). Em 2021, durante a COP26, os países reafirmaram os objetivos propostos no Acordo de Paris e mantiveram o tratado para a descarbonização da economia mundial (ARORA e MISHRA, 2021). Como consequência, o mundo vem intensificando as agendas para substituição/complementação da matriz energética mundial, a fim de torná-la mais renovável e menos poluente. Nesse sentido, o Brasil através do *RenovaBio* (BRASIL, 2021a), a Europa através do *Renewable Energy Directive (RED) 2018/2021* (EUR-LEX, 2018) e os Estados Unidos da América (US, 2021) criaram programas para essa substituição/complementação das suas matrizes energéticas, pelos quais estabeleceram metas para diminuir as emissões de gases poluentes. O alcance dessas metas, no entanto, provavelmente dependerá do amplo uso de três principais fontes energéticas: hidrogênio, eletricidade e biocombustíveis (FULTON, 2015).

No contexto dos biocombustíveis, dentre eles o etanol, o Brasil é o precursor desta tecnologia. Com as crises no setor do petróleo na década de 1970, foi instituído no país o PROÁLCOOL – Programa Nacional do Álcool, visando o estímulo da produção em larga escala de etanol a partir da sacarose da cana-de-açúcar; produto, este, já cultivado no país em grande quantidade (GOLDENBERG, 2006; 2008; AMORIM et al., 2011; LOPES et al., 2016). Com o advento dos veículos com motores *flex-fuel* em 2003, o mercado brasileiro do etanol foi ainda mais estimulado (GOLDEMBERG, 2008).

Atualmente o Brasil produz cerca de 30% do etanol mundial, o que o coloca como segundo maior produtor, atrás apenas dos Estados Unidos (RFA, 2021). No eixo centro-sul do país, estima-se (agosto/2021) que a produção desse biocombustível alcançou 92% da produção nacional (CONAB, 2021). Nesse cenário, enquanto o Brasil tem quase metade da sua matriz energética renovável (45%), o mundo possui apenas 14% (BRASIL, 2021b).

O RenovaBio, a Política Nacional de Biocombustíveis implementada pelo Brasil em 2017, reforça o compromisso brasileiro com a redução das emissões de gases poluentes e busca cumprir os objetivos definidos no Acordo de Paris (BRASIL, 2021a). Dentre os princípios dessa política, está a expansão da produção e do uso dos biocombustíveis, por meio de incentivo às usinas sucroalcooleiras: os produtores de etanol devem receber títulos financeiros, na forma de créditos de descarbonização (CBios), conforme o volume e eficiência da produção. Para gerar CBios, o RenovaBio estabeleceu uma meta de substituição da gasolina por etanol que demandará provavelmente um aumento substancial na produção do biocombustível nos próximos dez anos (UNICA, 2019). Embora em 2020 o governo federal tenha proposto a revisão das metas do RenovaBio – devido aos impactos da pandemia da COVID-19 no mercado de biocombustíveis –, a intenção é adquirir quase 91 milhões de CBios até 2030, o que ainda representa 90% da meta acordada inicialmente (BOSSLE, 2020; VANDENBERGHE et al., 2022).

No Brasil, o etanol é produzido majoritariamente a partir da fermentação do caldo e/ou melaço da cana-de-açúcar, bioprocessado realizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, originando o etanol de primeira geração – E1G (LOPES et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2016; KARP et al., 2021). Esse processo produtivo do E1G brasileiro foi sendo otimizado durante todos os anos de produção extensiva. O sucesso dessa produção é atribuído ao uso de ciclos curtos de fermentação (com duração de 8 à 12 h), com a manutenção de alta densidade de células e reciclagem das leveduras (LOPES et al., 2016). Também houve melhorias agrícolas, bem como o desenvolvimento e a seleção de novas variedades de cana-de-açúcar (DELLA-BIANCA et al., 2013; RAYA et al., 2022). Por fim, conforme o processo foi amadurecendo, linhagens de leveduras industriais, robustas e altamente produtivas, foram sendo selecionadas nas próprias dornas de fermentação (STAMBUK et al., 2009; CECCATO-ANTONINI e COVRE, 2020; JACOBUS et al., 2021).

Como consequência da grande produção de E1G brasileira, são gerados subprodutos, na forma de bagaço e palha da cana-de-açúcar. Só na safra 2021/2022, o país atingiu a marca de 523 milhões de toneladas de cana-de-açúcar processadas (UNICA, 2022). Soccol et. al (2010) estimaram que cerca de 280 Kg de bagaço úmido são gerados a partir de uma tonelada de cana-de-açúcar processada. Além disso, aproximadamente 250 Kg de peso seco de palha são também geradas. Esses subprodutos, que representam cerca de 35% do conteúdo energético da planta, são utilizados majoritariamente para geração de energia na própria indústria através de combustão direta (MAGA et al., 2018).

No entanto, pesquisas vêm investigando a utilização dessa e de outras biomassas (resíduos agroindustriais) para a geração não só de energia elétrica, mas também de biomoléculas e biomateriais de valor agregado, em um conceito chamado de biorrefinaria de segunda geração (2G) (KARP et al., 2021; ROSSI et al., 2021; VANDENBERGHE et al., 2022; ROGOSKI et al., 2022). Entre os produtos oriundos dessa indústria 2G, destaca-se o etanol de segunda geração – E2G, produzido a partir da fermentação dos carboidratos presentes no material lignocelulósico (ROBAK e BALCEREK, 2018). Nessa perspectiva, Stambuk et al. (2008) já estimaram que a utilização eficiente desse resíduo da produção de etanol 1G, para gerar o etanol 2G, poderia aumentar em até 50% a produção de etanol no Brasil sem a necessidade de aumento de áreas cultiváveis.

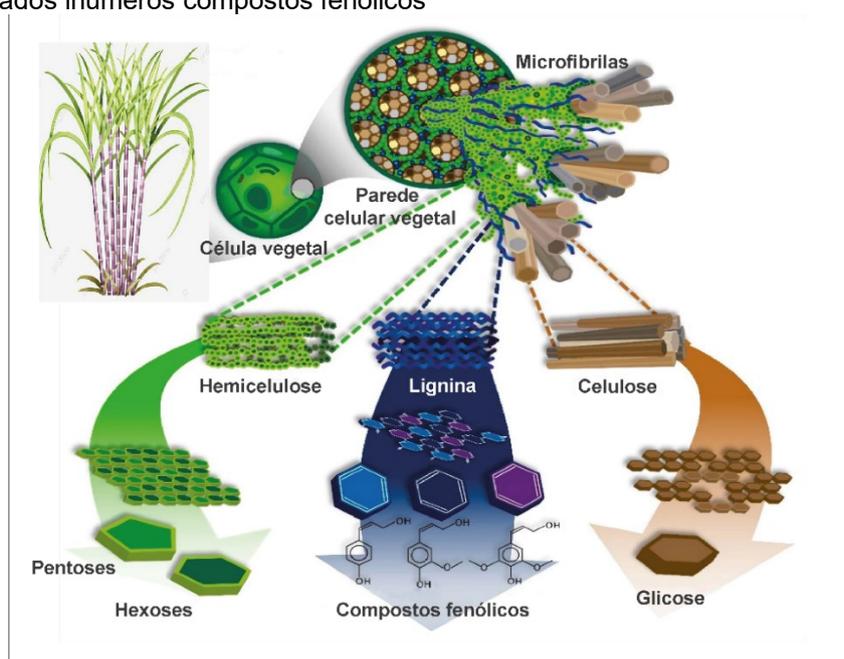
No cenário do E2G, o Brasil apresenta grande potencial produtivo uma vez que os resíduos da produção de E1G (bagaço e palha) não competem com produtos alimentares visto o seu baixo valor nutricional. Assim, essa produção de E2G pode ajudar a atingir as metas ambientais brasileiras propostas pelo RenovaBio (SARKAR et al., 2012; BEZERRA e RAGAUSKAS, 2016; VANDENBERGHE et al., 2022). Por outro lado, enquanto os Estados Unidos da América possuem diversas usinas para a produção de E2G, o Brasil possui apenas duas em operação – GRANBIO e RAÍZEN. Embora essas duas companhias tenham, juntas, o potencial para produzir aproximadamente 100 milhões de litros de E2G por ano, isso representa menos de 1% do etanol total produzido no país (ROSSI et al, 2021). Além disso, ainda existem desafios em relação à viabilidade técnica e econômica desse processo, sobretudo em relação ao processamento inicial da biomassa lignocelulósica (KARP et al., 2021). Nesse sentido, Alves-Junior et al. (2022) consideram que o setor industrial não parece estar plenamente convencido dos ganhos econômicos gerados pela produção do E2G.

Um dos gargalos na produção do E2G é a composição química da biomassa lignocelulósica – em geral extremamente recalcitrante (ZHU e PAN, 2022). A biomassa da cana-de-açúcar é formada por: (a) celulose, um homopolímero linear de glicoses unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4; (b) hemicelulose, um heteropolissacarídeo composto por pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose); (c) lignina, macromolécula amorfa composta em maior quantidade por fenólicos; e (d) outros, que incluem extrativos e cinzas. Esta biomassa composta, em percentual de base seca, de 35-45% de celulose, 26-35% hemicelulose, 11-25% lignina e 2,9-14,4% classificados como outros. (GUILHERME et al., 2015; PELLEGRINI et al. 2022). A estrutura da biomassa lignocelulósica de forma detalhada pode ser vista na Figura 1.

Dessa forma, a desestruturação dessa biomassa recalcitrante, com a liberação de seus constituintes, é passo primordial para a produção eficiente de E2G (KUHAD et al, 2011). Esse processo, chamado de pré-tratamento, é um dos obstáculos que ainda dificultam a produção eficiente de E2G a partir da biomassa lignocelulósica.

Além desse processo de desestruturação da biomassa, uma segunda etapa é necessária: a hidrólise dos polímeros que compõe a biomassa. Essa etapa tem como objetivo principal liberar os açúcares presentes na celulose e hemicelulose e pode ser realizada através de processos físico-químicos ou biológicos (MOSIER et al. 2005; KUMAR et al., 2015; VISSER et al, 2015).

Figura 1 - Estrutura simplificada da biomassa lignocelulósica. Da hidrólise da hemicelulose são obtidas as pentoses (xilose e arabinose) e as hexoses (galactose e manose). Da celulose é obtida a glicose e, da lignina, são liberados inúmeros compostos fenólicos



Fonte: adaptado de Hernández-Beltrán et al. (2019)

## 1.2 O PROCESSO DE PRÉ-TRATAMENTO E A FORMAÇÃO DO FURFURAL

O pré-tratamento tem como função principal desestruturar a biomassa lignocelulósica para posterior hidrólise. No entanto, o pré-tratamento gera subprodutos indesejáveis, os chamados inibidores (vide Figura 2), que dificultam a hidrólise enzimática e a fermentação por microrganismos (JÖNSSON e MARTÍN, 2016; TANG et al., 2021; MONTEIRO et al., 2021).

Atualmente o pré-tratamento é realizado de diversas maneiras: químico, físico e biológico. Os processos mais recentes envolvem uso de líquidos iônicos (ROY e CHUNDAWAT, 2022), CO<sub>2</sub> supercrítico (ZHAO et al., 2022) e utilização de plasma frio (PEREIRA et al., 2021). No entanto, as abordagens termoquímicas como ácido ou álcali diluídos e explosão à vapor ainda são as mais promissoras em escala industrial por serem rápidas, de fácil dimensionamento e eficientes na desconstrução da biomassa (TANG et al., 2021).

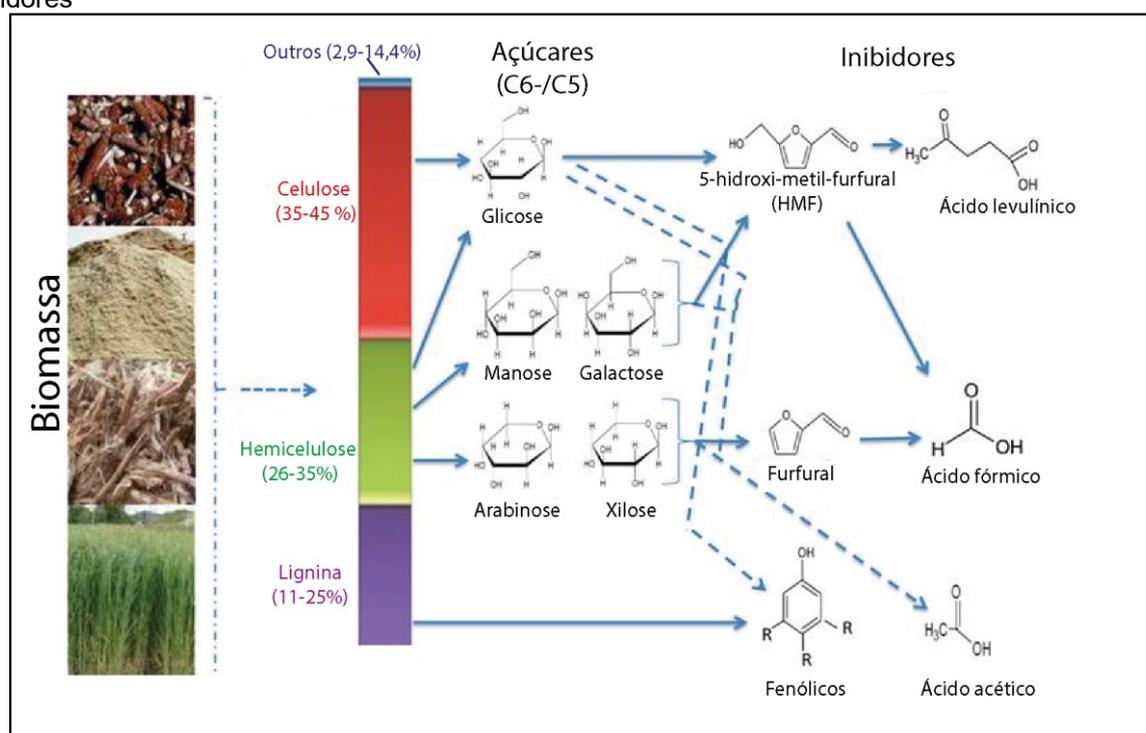
Conforme se observa na Figura 2, a partir da desidratação das hexoses, são gerados o 5-hidroxi-metil-furfural (HMF) e posteriormente os ácidos levulínico e fórmico. Já da desidratação das pentoses, o principal produto é o furfural, podendo originar também o ácido fórmico. O ácido acético, que pode ser oriundo da conversão das pentoses, também é originado da desacetilação da hemicelulose. Por fim, da lignina são gerados diversos subprodutos fenólicos, como a vanilina (PALMQVIST et al., 2000; TAHERZADEH et al. 2000; revisado por BHATIA et al., 2020). A concentração desses inibidores nos hidrolisados está intimamente ligadas à composição química da biomassa e ao processo de pré-tratamento utilizado (GUO et al., 2022). Nesse sentido, embora geralmente as concentrações de furfural sejam relativamente baixas (<0,5 g L<sup>-1</sup>) nos hidrolisados lignocelulósicos, já foram relatadas concentrações que alcançam 4 g L<sup>-1</sup> (TAHERZADEH e KARIMI, 2011; ZHANG et al., 2017; CANDIDO et al., 2020; LIN et al., 2020; LIMA et al., 2021), concentrações essas dependentes dos tipos de pré-tratamento utilizados.

O furfural é um dos aldeídos formados nos processos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é altamente tóxico para microrganismos. Embora o foco desde trabalho seja voltado à produção de etanol, não se despreza a importância (bio)tecnológica do furfural. Peleteiro et al., (2016) apontam que esse aldeído é produzido industrialmente desde 1922. Nesse sentido, furfural vem sendo utilizado na indústria farmacêutica (HOYDONCKX et al., 2007), agrícola (MASCAL e DUTTA, 2011), como

precursor do ácido furóico e álcool furfurílico na indústria alimentícia (DELATOUR et. al, 2020) e como plataforma para produção de inúmeros outros solventes (RACHAMONTREE et al., 2020; JASWAL, SINGH E MONDAL, 2022). Em um conceito de biorrefinaria, a produção de furfural também vem sendo avaliada (MESA et al., 2014; LIU et al, 2022).

Dessa forma, embora furfural seja altamente tóxico para microrganismos, industrialmente esse aldeído é de suma importância. Nessa esteira, a obtenção de microrganismos tolerantes ao furfural pode ser uma alternativa biotecnológica promissora para a produção de etanol 2G.

Figura 2 - Formação de inibidores a partir do pré-tratamento físico-químico da biomassa lignocelulósica. Este processo desestrutura a recalcitrância da biomassa liberando, principalmente, celulose, hemicelulose e lignina. No entanto, a quebra da lignina, e desidratação dos açúcares, leva a formação dos compostos inibidores



Fonte: adaptado de Ibraheem e Ndimba (2013)

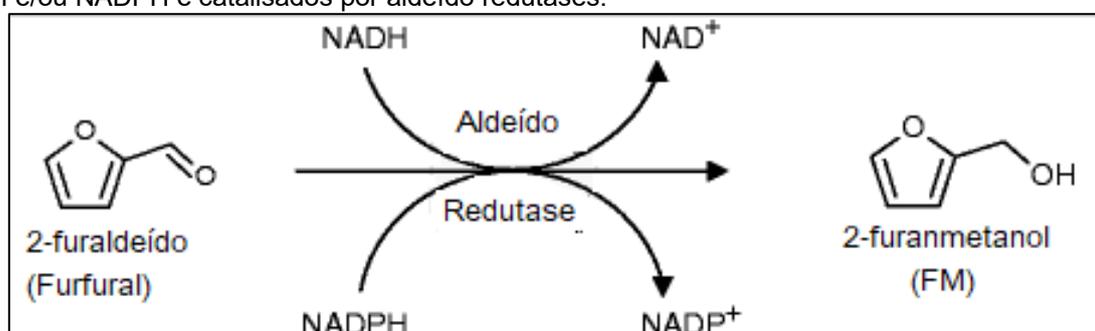
### 1.3 FURFURAL – TOXICIDADE E REMEDIAÇÃO

É de longa data que se tem relato que os aldeídos, em especial os furânicos, são tóxicos para as células (DENG et al., 1993; NAVARRO, 1994; WORNISCH et al., 1995). Portanto, atualmente, vários grupos de pesquisas medem esforços a fim de obter microrganismos tolerantes a esses compostos (LIU et al., 2020; ERKAN et al., 2020; LI et al. 2021; LI et al., 2022).

Furfural, um aldeído furânico, presente nos hidrolisados lignocelulósicos, reduz a proliferação celular e a produção de etanol e inibe a síntese de DNA, RNA, enzimas e proteínas (LIU, 2011; ASK et al., 2013). Allen et al. (2010) demonstraram que furfural causa, em *S. cerevisiae*, danos às mitocôndrias, vacúolo, cromatina nuclear e citoesqueleto provavelmente pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO). Corroborando esses resultados Kim e Hahn (2013) e López et al. (2021) demonstraram o acúmulo de ERO nessa levedura quando exposta a esse inibidor.

Como resposta, *S. cerevisiae* reduz o furfural a furan-metanol (álcool furfurílico) principalmente através de aldeído redutases (Figura 3). Por exemplo, os genes *YKL107W*, *YMR152W* e *ARI1*, que codificam algumas dessas redutases, já foram relatados com a capacidade de reduzir o furfural (WANG et al. (2019), OUYANG et al. (2021) e DIVATE et al. (2022). Porém, outras enzimas como álcool desidrogenases (codificadas pelos genes *ADH1*, *ADH6*, *ADH7*) já foram descritas como capazes de reduzir furfural (LIU et al., 2008; JAYAKODY et al., 2012). Outras redutases, codificadas por *GRE2* e *GRE3* (LIU et al., 2008; MOON e LIU, 2012) também apresentaram essa característica. Dessa forma, a detoxificação de furfural pode ser realizada por enzimas codificada por múltiplos genes, e não só por aqueles que codificam aldeído redutases (LIU, 2018). Nesse sentido, Mandalika et al. (2014) sugeriram que a tolerância de linhagens de *S. cerevisiae* não está diretamente ligada a atividade de redução do furfural a seu álcool, porque o maior crescimento das células não está relacionado, necessariamente, à maior redução desse aldeído e envolve outros mecanismos moleculares.

Figura 3 - Vias de redução do 2-furaldeído (furfural) em 2-furanmetanol (álcool furfurílico) acoplados com NADH e/ou NADPH e catalisados por aldeído redutases.



Fonte: Adaptado de Liu (2011)

Outro ponto relevante na tolerância a esse inibidor é a preferência dessas enzimas pelos cosubstratos NAD(P)H. *In vitro* nota-se que a redução desse aldeído acontece tanto por enzimas NADH ou NADPH-dependentes (MOON e LIU, 2015; WANG et al., 2019). Já *in vivo*, redutases NADPH-dependentes apresentaram-se como mais eficientes (LIU, MA e SONG, 2009; HEER, HEINE e SAUER, 2009). Dessa forma, a utilização exclusiva de NADPH para redução do furfural pode provocar um desbalanço de cosubstratos (LIU et al, 2018). De fato, Gorsich et al. (2006) quando demonstraram que células deletadas nos genes *ZWF1* e *GND1*, que codificam enzimas da fase oxidativa da via das pentoses fosfato e responsáveis por geração do NADPH, apresentaram maior sensibilidade ao furfural. Dessa forma, a engenharia de cosubstratos (cofatores) deve ser levada em consideração na obtenção de linhagens tolerantes a furfural.

A engenharia genômica, seja ela com alvo na modificação ou superexpressão de fatores de transcrição ou genes, é uma importante ferramenta na obtenção de linhagens aptas a tolerar ou remediar eficientemente os efeitos do furfural (CHEN et al., 2019; SUKWONG et al., 2020; MERTENS et al., 2021; DIVATE et al., 2022). Nesse sentido, a avaliação do transcriptoma de *S. cerevisiae* também foi relatada como contribuição para entender a toxicidade deste aldeído (Liu e Ma, 2020; GOUD, KIM e ULAGANATHAN, 2022). Os pesquisadores observaram um maior nível de transcritos, quando a levedura foi exposta a furfural, de genes que respondem ao estresse oxidativo, como *CTA1* (catalase A); *SRX1* (sulfiredoxina) e *GRX5* (glutarredoxina). Recentemente a engenharia evolutiva também tem se tornado importante aliada na obtenção de linhagens tolerantes (PANDEY et al, 2019; LIU e MA, 2020; WEI et al., 2020).

Portanto, o esforço da comunidade científica tem se baseado nas engenharias genômica e evolutiva para obtenção de linhagens de *S. cerevisiae* que sejam capazes de tolerar este inibidor.

#### 1.4 METABOLIZAÇÃO DE XILOSE POR *S. CEREVISIAE* RECOMBINANTE: ESTADO DA ARTE

A xilose, segundo açúcar mais abundante na biomassa lignocelulósica, não é fermentada naturalmente por *S. cerevisiae*. No entanto, bactérias e outras leveduras são capazes de metabolizar esse açúcar. Diversos gêneros de leveduras vêm sendo relatados com essa capacidade como: *Scheffersomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* e

*Spathaspora* (SÁNCHEZ et al., 2002; CADETE et al., 2009; STAMBUK et al., 2003; FERREIRA et al., 2011; CADETE et al., 2012; LOPES et al., 2018). Recentemente novos gêneros foram descobertos com a mesma capacidade: *Cyberlindnera* e *Blastobotrys* (BARRETO et al., 2018; BARROS et al., 2021). Nesse caminho, diversas pesquisas têm focado no uso de *Sp. passalidarum* e *Sp. arborariae* como alternativa à *S. cerevisiae* ou como fonte de genes que auxiliem na metabolização de xilose (CADETE et al., 2009; CUNHA-PEREIRA et al., 2011; LONG et al., 2012; MOURO et al., 2020; SILVEIRA et al., 2021; PEREIRA et al., 2021).

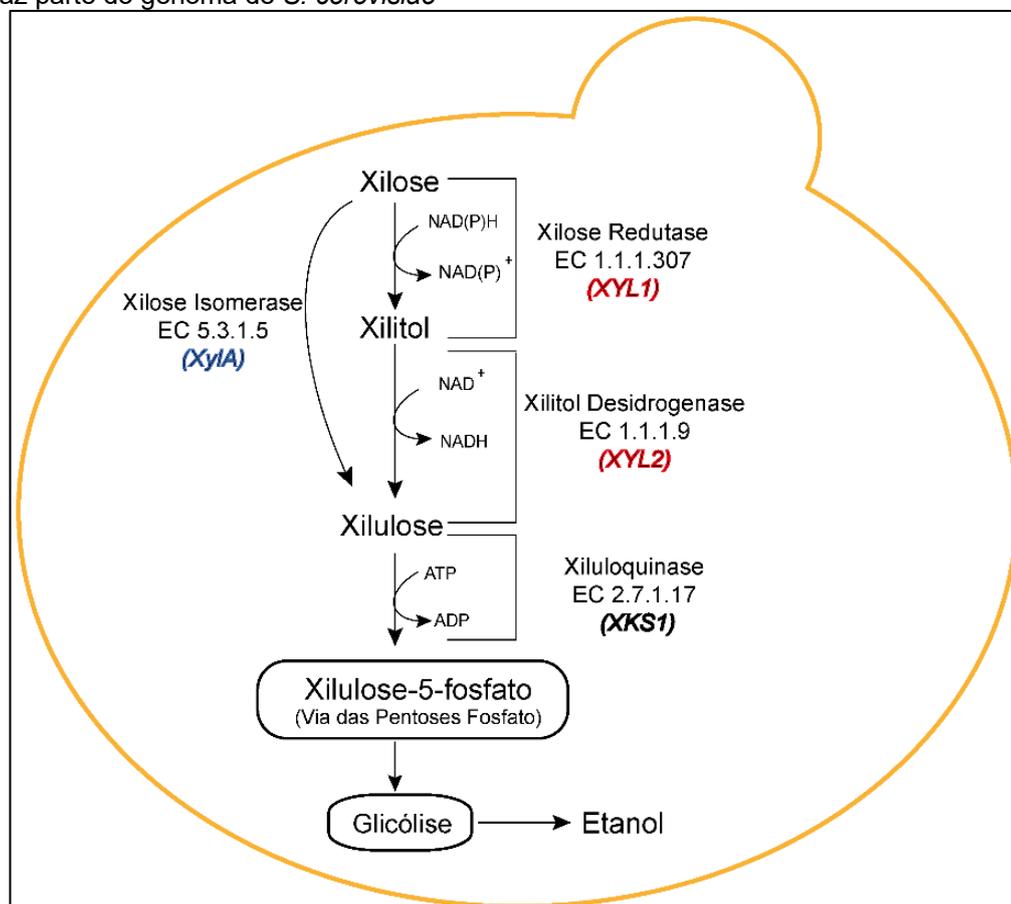
Embora tenham sido descritas novas espécies capazes de metabolizar e/ou fermentar xilose, geralmente essas linhagens não toleram, de forma combinada, a altas concentrações de etanol, alta pressão osmótica (causada pela concentração de açúcares), os baixos valores de pH do meio e inibidores formados no processo de pré-tratamento. Além disso, a grande maioria precisa de oxigênio para uma metabolização eficiente (LANDRY, et al., 2006; STAMBUK et al., 2019). Por outro lado, a bioprospecção de novas linhagens não deva ser descartada como alternativa para a metabolização eficiente de xilose. Em outro viés, a engenharia genômica de *S. cerevisiae* se mostra promissora para construção de linhagens que fermentem eficientemente a xilose (MATSUSHIKA e SAWAYAMA, 2008; KIM et al. 2013; COIMBRA et al. 2022).

A expressão heteróloga, em *S. cerevisiae*, de genes que codificam enzimas necessárias para a metabolização da xilose mostra-se uma alternativa promissora para a assimilação eficiente desse açúcar. Uma das vias de metabolização da xilose relatadas é a expressão heteróloga das enzimas xilose redutase (XR; EC 1.1.1.307) e xilitol desidrogenase (XDH; EC 1.1.1.9) aliada a superexpressão da enzima endógena de *S. cerevisiae*, xiluloquinase (XK; EC 2.7.1.17). Outra alternativa é a utilização da via que utiliza xilose isomerase (XI; EC 5.3.1.5) oriunda de bactérias ou certos fungos anaeróbios (MATSUSHIKA et al., 2008; MILESSI et al., 2018; CUNHA et al., 2019; NIU et al., 2019; MOURO et al., 2020; SILVA et al., 2021), conforme se pode observar na Figura 3.

A inserção da via de metabolização da xilose em *S. cerevisiae*, tornou-as capazes de fermentar essa pentose ainda que de forma mais lenta do que as hexoses. Nesse sentido, modificações adicionais no genoma dessas linhagens foram realizadas para melhorar essa eficiência, em especial na via das pentoses fosfato (PPP) (JEPPSSON, et al., 2002; RUNQUIST et al., 2009; ZHA et al., 2014; KPBAYASHI et al., 2018).

A PPP é uma importante via de metabolização de carboidratos e produz uma grande fração do NADPH necessário para as células. *ZWF1*, por exemplo, codifica a glicose-6-fosfato desidrogenase que regenera o cosubstrato NADPH, mostrando-se necessário para o metabolismo da xilose (JEPPSSON et al., 2002; GORSICH et al., 2006). Isso porque, na via XR-XDH, ocorre o desbalanço entre os cosubstratos NAD(P)H, enquanto as XRs preferem NADPH para reduzir xilose, as XDH utilizam  $\text{NAD}^+$  na oxidação do xilitol a D-xilulose (vide Figura 3). Nesse contexto, explica-se a necessidade de oxigênio para o consumo da xilose visto que esse pode reoxidar o NADH. Outra consequência é o acúmulo de xilitol nessa via, o que já foi relatado por diversos trabalhos (KARHUMAA et al., 2007; KIM et al., 2013; SANG et al., 2016; ZHU et al., 2021).

Figura 4 - Alternativas de vias heterólogas de metabolização de xilose em *S. cerevisiae*. Inicialmente a xilose é reduzida a xilitol pela xilose redutase (XR). Por sua vez o xilitol é oxidado a xilulose pela xilitol desidrogenase (XDH). Em seguida a xilulose é fosforilada pela xiluloquinase (XK) resultando em xilulo-5-fosfato que ingressa na via das pentoses fosfato, e posterior glicólise, chegando à produção de etanol. Alternativamente, a xilose é diretamente isomerizada a xilulose pela xilose isomerase (XI) e ingressa na via das pentoses fosfato e posterior glicólise chegando à produção de etanol. Em azul um gene que codifica a XI em bactérias. Em vermelho os genes que codificam XR, e XDH em leveduras que fermentam xilose. A XKS1 faz parte do genoma de *S. cerevisiae*



Fonte: Autoria própria

Outro problema envolvido na fermentação da xilose por *S. cerevisiae* é que essa pentose causa uma série de efeitos no metabolismo redox das células. Dzanaeva et al. (2020) demonstraram um aumento de radicais livres durante a fermentação de xilose, e o papel crucial dos peroxissomos na remediação desses radicais. O estresse oxidativo causado por esse carboidrato também já foi relatado por Cheng et al. (2018). Os autores mostram que a capacidade de detoxificação de espécies reativas de oxigênio está associada ao melhor consumo de xilose em um isolado de *S. cerevisiae*. Dessa forma, além de abrigar uma via de metabolização da xilose, essa deve ser capaz de remediar os efeitos oxidativos causados pela metabolização da xilose.

Portanto, a obtenção de linhagens capazes de fermentar eficientemente xilose é um dos grandes gargalos na produção do etanol 2G e está ligada a capacidade de remediação dos danos oxidativos causados por essa pentose.

### 1.5 O ESTRESSE OXIDATIVO E OS SISTEMAS DE DEFESAS ANTIOXIDANTES EM *S. CEREVISIAE*

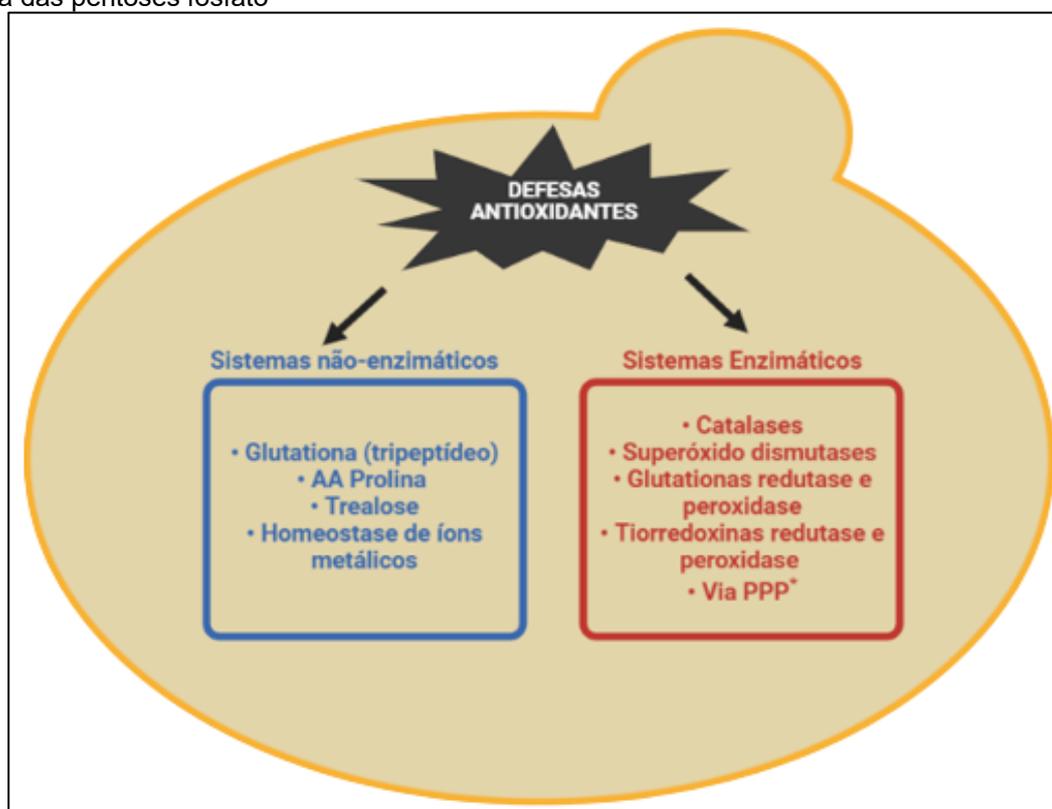
A geração de ERO possuem papel crucial no metabolismo celular. Dentre essas espécies estão os radicais livres moléculas ou átomos com elétrons livres na sua camada de valência como o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ), o radical peroxila ( $OH_2$ ) e o ânion superóxido ( $O_2^-$ ). Entre os não radicalares estão o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Essas espécies podem acumular-se nas células devido a fatores ambientais, mutações genéticas e pelo próprio envelhecimento celular (KWON, LEE e LEE, 2017; MENG et al., 2017).

Conforme visto nos itens anteriores, furfural causa uma gama de efeitos deletérios para *S. cerevisiae* – em especial distresse oxidativo. Uma das vertentes para contornar esse problema é a investigação da capacidade dos sistemas de defesas celulares remediar os efeitos desse aldeído. As células possuem sistemas de defesas (não)enzimáticas para proteção celular e manutenção do seu estado redox conforme pode ser observado da Figura 4.

Conforme se observa da Figura 5, em *S. cerevisiae* os sistemas de defesa antioxidantes não enzimáticos são: (a) o tripeptídeo glutathiona atua como antioxidante utilizando o grupo tiol da cisteína (EARDLEY e TIMSON, 2020); (b) o acúmulo do aminoácido prolina, atuando como sequestrador de radicais livres (TAKAGI, TAGUCHI e KAINO, 2016; MUKAI et al., 2019; TAKAGI 2021); (c) produção de trealose (MAHMUD,

HIRASAWA e SHIMIZU, 2010; ASADA et al., 2022) auxiliando no reparo de proteínas desnaturadas ou inibindo essa desnaturação; e (d) a homeostase de íons metálicos, incluindo as metalotioneínas<sup>1</sup> (LYU et al, 2022). Já os sistemas enzimáticos são: as catalases (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathionas redutase ou peroxidase (GPx), tioredoxinas (TSA) e enzimas da via das pentoses fosfato (PPP) (MENG et al., 2017; XU et al., 2018). Neste contexto, as localizações subcelulares das principais enzimas antioxidantes estão mostradas na Figura 5.

Figura 5 - Principais sistemas de defesas antioxidantes em *S. cerevisiae*. Na figura: AA: aminoácido e Via PPP: via das pentoses fosfato

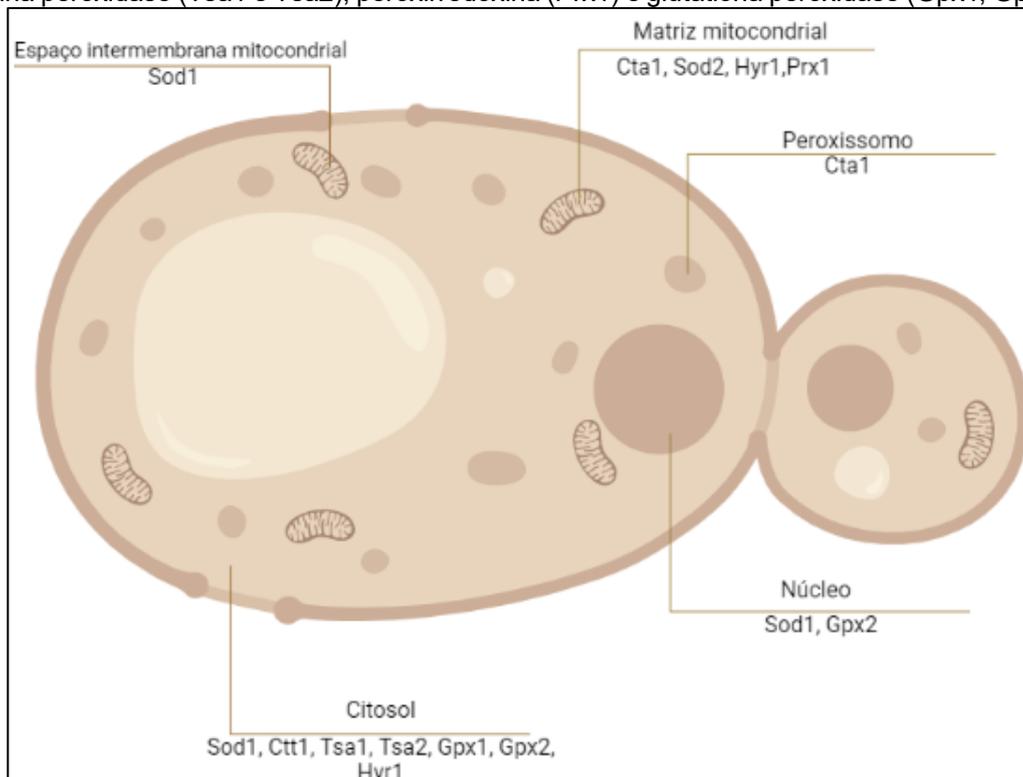


Nota: \* A via das pentoses-fosfato é considerada um sistema de defesa antioxidante pela regeneração do cosubstrato NADPH.

Fonte: Autoria própria (2022)

<sup>1</sup> Metalotioneínas são pequenas proteínas ricas em cisteínas com propriedades antioxidantes, e tem capacidade de se ligar a diversos íons metálicos.

Figura 6 - Localização celular das principais enzimas do sistema de defesa antioxidante em *S. cerevisiae*. Na Figura: superóxido dismutase (Sod1 e Sod2); catalases A e T (Cta1 e Ctt1, respectivamente); tiorredoxina peroxidase (Tsa1 e Tsa2); peroxirredoxina (Prx1) e glutaciona peroxidase (Gpx1, Gpx2 e Hyr1)



Nota: Criado com *BioRender.com*

Fonte: Autoria própria

Em *S. cerevisiae* as superóxido dismutases (EC: 1.15.1.1) são codificadas pelos genes *SOD1* e *SOD2*, e convertem o ânion superóxido em  $H_2O_2$  e oxigênio molecular que, posteriormente, pode ser convertido à água por catalases ou peroxidases. As glutaciona peroxidases (EC: 1.15.1.1), codificadas pelos genes *GPX1*, *GPX2* e *HYR1*, utilizam o  $H_2O_2$  como substrato para a oxidação da glutaciona reduzida (GSH) formando dissulfeto de glutaciona (GSSG). Por sua vez, as glutaciona redutases (EC: 1.8.1.7) catalisam a redução da glutaciona dissulfeto (GSSG) gerando a forma sulfidril (GSH). Ainda, as tiorredoxinas peroxidases (EC: 1.11.1.24), codificadas pelos genes *TSA1* e *TSA2*, e a peroxirredoxina (*PRX1*) – uma peroxirredoxina mitocondrial com atividade de tiorredoxina peroxidase.

Além disso, essa levedura possui ainda duas catalases (EC:1.11.1.6): A catalase A e a catalase T, codificadas pelos genes *CTA1* e *CTT1*, respectivamente. Enquanto a catalase A está localizada nos peroxissomos e nas mitocôndrias, a catalase T é citosólica, embora a função das duas seja a mesma: catalisar a conversão do  $H_2O_2$  a  $O_2$  e  $H_2O$ . A catalase A peroxissomal é responsável pela detoxificação de  $H_2O_2$  produzido

pela  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos (MATÉ et al., 1999), ao passo que a mitocondrial é responsável por detoxificar o  $H_2O_2$  produzido pelas enzimas SOD na defesa de ERO (STURTZ et al., 2001). Já a catalase citosólica parece estar envolvida na proteção contra o choque térmico e osmótico, restrição calórica e ao próprio  $H_2O_2$  (GODON et al., 1998) sugerindo que seu papel protetor é generalizado.

Conforme exposto no item anterior deste trabalho, o furfural é capaz de promover acúmulo de ERO. No entanto, a consequência desse acúmulo nas fermentações de hidrolisados lignocelulósicos, assim como o papel das catalases nesse processo, em especial na presença de xilose e furfural, não está totalmente elucidada. Assim, este trabalho buscou avaliar os efeitos da superexpressão e/ou deleção das catalases de *S. cerevisiae* frente à exposição das células de levedura ao furfural.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo, através da engenharia genômica (superexpressão ou deleção gênica) de *S. cerevisiae*, avaliar a contribuição das catalases codificadas pelos genes *CTA1* e *CTT1* na capacidade das leveduras de tolerar o inibidor furfural, presente em hidrolisados lignocelulósicos utilizados para a produção de etanol de segunda geração.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir um módulo de superexpressão utilizando o promotor do gene *TDH3* de *S. cerevisiae*.
- Desenvolver linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* que superexpressem os genes *CTA1* e/ou *CTT1*.
- Construir linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* onde os genes *CTA1* e/ou *CTT1* estejam deletados.
- Avaliar os níveis de atividade da catalase nas linhagens recombinantes construídas.
- Estimar os níveis de espécies reativas e de peróxido de hidrogênio nas linhagens recombinantes desenvolvidas.
- Analisar os perfis de crescimento e de cofermentação de glicose e xilose pelas linhagens recombinantes construídas, em meios sintéticos e hidrolisado hemicelulósico.

### 3 METODOLOGIA

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

As cepas de leveduras utilizadas e desenvolvidas no presente trabalho estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho

| Linhagens            | Genótipo relevante   | Fonte ou Referência   |
|----------------------|--|-----------------------|
| CENPK-X-RDK          | <i>MATa MAL2-8c ura3-52 his3Δ1 leu2-3/112 trp1-289</i> e <i>AUR1::pAUR-XKXDHXR*</i>  | LBMBL**               |
| EZY-01               | Isogênica MP-P5***, mas <i>loxP-KanMX-loxP-pADH1::YNL134C</i>  | Zanella (2018)        |
| ASY-3                | Isogênica à DLG-K1****, mas <i>pho13Δ::loxP-Bler-loxP</i>  | Dos Santos (2017)     |
| CENPK-X-RDK-Kan-TDH3 | Isogênica a CENPK-X-RDK, mas <i>loxP-KanMX-loxP-P<sub>TDH3</sub>::TDH3</i>   | Este trabalho         |
| CENPK-X-RDK-Ble-TDH3 | Isogênica a CENPK-X-RDK, mas <i>loxP-BleMX-loxP-P<sub>TDH3</sub>::TDH3</i>   | Este trabalho         |
| sCTA1                | Isogênica a CENPK-X-RDK, mas <i>loxP-KanMX-loxP-P<sub>TDH3</sub>::CTA1</i>   | Este trabalho         |
| sCTT1                | Isogênica a CENPK-X-RDK, mas <i>loxP-KanMX-loxP-P<sub>TDH3</sub>::CTT1</i>   | Este trabalho         |
| sCTA1-sCTT1          | Isogênica a CENPK-X-RDK, mas <i>loxP-KanMX-loxP-P<sub>TDH3</sub>::CTT1</i> e <i>loxP-BleMX-loxP-P<sub>TDH3</sub>::CTA1</i>                           | Este trabalho         |
| dCTA1                | Isogênica a CENPK-X-RDK, mas <i>cta1Δ::LoxP-Ble<sup>r</sup>-LoxP</i>   | Este trabalho         |
| dCTT1                | Isogênica a CENPK-X-RDK, mas <i>ctt1Δ::LoxP-Ble<sup>r</sup>-LoxP</i>   | Este trabalho         |
| dCTA1-dCTT1          | Isogênica a CENPK-X-RDK, mas <i>cta1Δ::LoxP-Ble<sup>r</sup>-LoxP</i> e <i>ctt1Δ::LoxP-Kan<sup>r</sup>-LoxP</i>                                       | Este trabalho         |
| dCTA1-sCTT1          | Isogênica a CENPK-X-RDK, mas <i>cta1Δ::LoxP-Ble<sup>r</sup>-LoxP</i> e <i>loxP-KanMX-loxP-P<sub>TDH3</sub>::CTT1</i>                                 | Este trabalho         |
| dCTT1-sCTA1          | Isogênica a CENPK-X-RDK, mas <i>ctt1Δ::LoxP-Ble<sup>r</sup>-LoxP</i> e <i>loxP-KanMX-loxP-P<sub>TDH3</sub>::CTA1</i>                                 | Este trabalho         |
| MPC5H1               | Isogênica à MP-C5, linhagem essa oriunda da cepa CAT-1 (isolada de dornas de fermentação de etanol 1G) mas <i>loxP-KanMX-loxP-PADH1::[4-59Δ]HXT1</i> | Pereira et al. (2021) |
| MPC5H1CA1            | Isogênica à MPC5H1, mas mas <i>loxP-BleMX-loxP-P<sub>TDH3</sub>::CTA1</i>  | Este trabalho         |

Notas: \* Essa cepa é originária da linhagem CEN.PK2-1C (ENTIAN E KOTTER, 1998). \*\* Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras – LBMBL (UFSC). \*\*\* A linhagem MP-P5 é uma linhagem diploide oriunda da linhagem PE-2 (BASSO et al. 2008), linhagem essa isolada das dornas de fermentação de etanol 1G). \*\*\*\* A linhagem DLG-K1 foi construída por Gonçalves (2014).

As linhagens 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 (20 g L<sup>-1</sup> de glicose e/ou xilose) e o pH ajustado para 5,0 com HCl (3M). Para os meios sólidos foi adicionado 20 g L<sup>-1</sup> de ágar. Quando necessário, aos meios foram adicionados 200 mg L<sup>-1</sup> de Geneticina (*G418-Sigma*) ou 500 mg L<sup>-1</sup> de Zeocina (*Invivogen*), em condições assépticas. Quando utilizada a Zeocina o pH dos meios de cultura foi ajustado para 8,0 com NaOH (5M). Todos os meios foram esterilizados por calor úmido (autoclave a 120 °C por 20 min).

### 3.2 ENGENHARIA GENÉTICA EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

As modificações genômicas realizadas nas linhagens da levedura *S. cerevisiae* basearam-se em reações de PCR - *Polymerase Chain Reaction* e recombinação homóloga conforme descrito por (PETRACEK e LONGTINE, 2002), e utilizando a enzima DNA polimerase de alta fidelidade *Phusion® High Fidelity DNA Polymerase Thermo Scientific™*, seguidas da transformação das linhagens através do método de acetato de lítio conforme descrito por Gietz e Woods (2006). Os produtos da PCR foram visualizados por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo 2,5 µg mL<sup>-1</sup> de brometo de etídio, em luz ultravioleta, no fotodocumentador *Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (BioRad)*. As reações de PCR foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2.

Inicialmente, para obtenção dos módulos de superexpressão utilizando o promotor forte e constitutivo do gene TDH3 ( $P_{TDH3}$ ), se fez necessário a inserção dos genes  $Kan^r$  e  $Ble^r$  a montante desse promotor nativo. O fragmento de amplificação considerado como  $P_{TDH3}$  foi definido utilizando como base a sequência do promotor GPD do plasmídeo p426-GPD (ATCC 87361)<sup>2</sup>. Para a amplificação dos genes marcadores foram realizadas extrações de DNA das linhagens das leveduras recombinantes EZY-01 (ZANELLA, 2018) e ASY-3 (DOS SANTOS, 2017) utilizando-se o Kit comercial *YeastStar Genomic DNA Kit™ (Zymo Research)*. Essas linhagens contêm em seus genomas os genes  $Kan^r$  e  $Ble^r$ , respectivamente.

---

<sup>2</sup> O promotor  $P_{TDH3}$  é amplamente conhecido na literatura como promotor GPD, dando origem aos plasmídeos da família p4XX (MUMBERG, MULLER e FUNK, 1995).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados neste trabalho

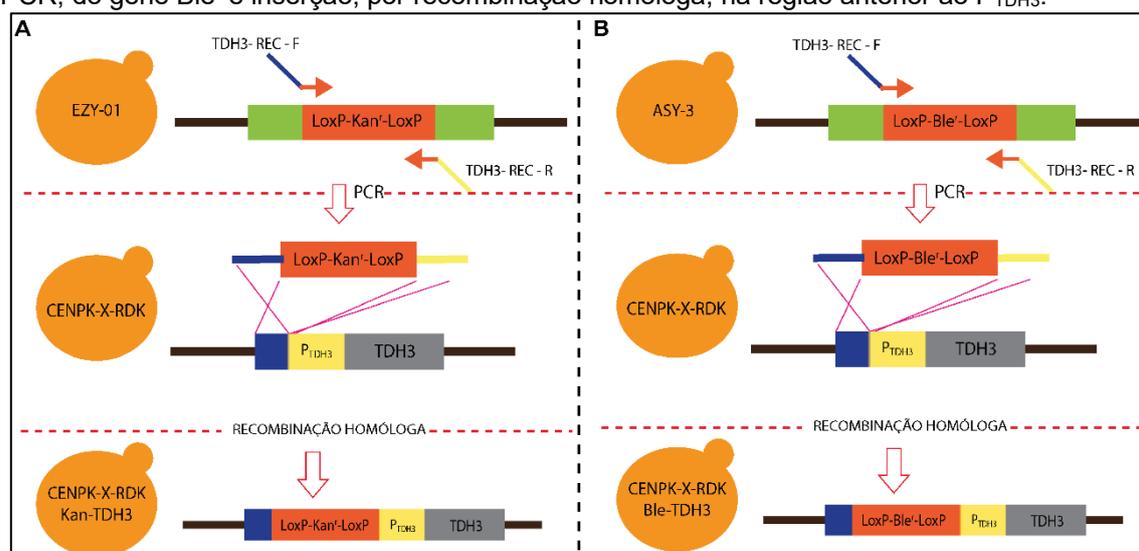
| Iniciador <sup>a</sup> | Sequência (5'→ 3') <sup>b</sup>   |
|------------------------|---|
| <b>Recombinação</b>    |   |
| TDH3-REC-F             | <b>GAAAAGAACTTACCTGAAAAAACGAATATATACTAGCGT</b> <u>CCAGCTGAAG</u><br><u>CTTCGTACGC</u>   |
| TDH3-REC-R             | <b>CGTATTCTTTGAAATGGCAGTATTGATAATGATAAACTCG</b> <u>GCCATAGGCCAC</u><br><u>TAGTGGATC</u> |
| CTA1-Super2-F-pGPD     | <b>AACAAATATAAACTCCGAAAATCCCCACAGTGACAGAATT</b> <u>CCAGCTGAAG</u><br><u>CTTCGTACGC</u>  |
| CTA1 – Super-R         | <b>AGTAATTTACTTCATTTTTTTCTTGTCCCAATTTGAC</b> <u>CATTTTTGTTTGTTTAT</u><br><u>GTGTG</u>   |
| CTA1-Del-F             | <b>TAGCCGCGCAAGTTGGTGGGGTCCCTTAATCCGAAAAGG</b> <u>CCAGCTGAA</u><br><u>GCTTCGTACGC</u>   |
| CTA1-Del-R             | <b>AGTAATTTACTTCATTTTTTTCTTGTCCCAATTTGAC</b> <u>GCCATAGGCCACTAGT</u><br><u>GGATC</u>    |
| CTT1- Super-F-pGPD     | <b>TAAGGATTCGACGTAGCCTGGACACATTGTGCATTTATCG</b> <u>CCAGCTGAAG</u><br><u>CTTCGTACGC</u>  |
| CTT1- Super-R-pGPD     | <b>CTTTTTCTTGCTTTTCTTCTTTTTACCGAACACGTT</b> <u>CATTTTTGTTTGTTTATG</u><br><u>TGTG</u>    |
| CTT1- Del-F            | <b>CTTCTTTGTCTCATGCCAATAAGATCAATCAGCTCAGC</b> <u>CCAGCTGAAGCT</u><br><u>TCGTACGC</u>    |
| CTT1- Del-R            | <b>GGCACTTGCAATGGACCAAGTCTTGGCATAACCTTCAAGG</b> <u>GCCATAGGCCA</u><br><u>CTAGTGGATC</u> |
| <b>Verificação</b>     |   |
| V-TDH3-F               | CGGTAGACTATTAAAGGGTG  |
| V-TDH3-R               | AACTTACCTTCAGCGGCAGC  |
| V-Kan-F                | CCGTTGCATTTCGATTCC  |
| V-Ble-F                | CCTTCTATGAAAGGTTGGGC  |
| V-CTA1-F               | TGTAGTGCCACATGGAAACG  |
| V-CTA1-R               | TTGGTAAGGAACCGTGGTAC  |
| CTA1-VeriFora-R        | GACATCGTTTCTTGGTTCCC  |
| V-CTT1-F               | GAAGCCAGAGATGATGAGGA  |
| V-CTT1-R               | GCTCCCAATCTATGACGTTG  |
| CTT1- VeriFora-R       | GTGCTTGTACATACGACCAAT   |

Notas: <sup>a</sup> As letras F e R são referentes aos iniciadores *forward* e *reverse*, respectivamente. <sup>b</sup> Nos iniciadores para recombinação, as sequências sublinhadas permitem a amplificação dos módulos de deleção ou superexpressão, enquanto as sequências em negrito são para a recombinação homóloga.

Para a construção do módulo de superexpressão, o gene *Kan<sup>r</sup>* foi amplificado utilizando o par de iniciadores TDH3-REC-F e TDH3-REC-R (vide Tabela 2) e o DNA genômico da levedura EZY-01 como molde. Esses iniciadores contêm nas suas extremidades, regiões de similaridade anteriores e no início do P<sub>TDH3</sub> (Figura 7-A). Dessa forma, por recombinação homóloga, o gene *Kan<sup>r</sup>* foi inserido na região imediatamente anterior ao P<sub>TDH3</sub>, construindo assim a linhagem CENPK-X-RDK-Kan-TDH3 (Figura 6-A). De igual forma, empregando os mesmos iniciadores (TDH3-REC-F e TDH3-REC-R), porém utilizando o DNA extraído da linhagem ASY-03, o fragmento amplificado foi aquele

contém o gene *Ble<sup>r</sup>* e, por recombinação homóloga e transformação da levedura, foi construída a linhagem CENPK-X-RDK-Ble-TDH3 (Figura 7-B). Ambas as linhagens recombinantes foram selecionadas em meio sólido (YPD) contendo o respectivo antibiótico (Geneticina para a cepa contendo o gene *Kan<sup>r</sup>* e Zeocina para àquela contendo o gene *Ble<sup>r</sup>*).

Figura 7 - Inserção dos genes *Kan<sup>r</sup>* e *Ble<sup>r</sup>* à montante do promotor P<sub>TDH3</sub>. Em A: amplificação, por PCR, do gene *Kan<sup>r</sup>* e inserção, por recombinação homóloga, na região anterior ao P<sub>TDH3</sub>. Em B: amplificação, por PCR, do gene *Ble<sup>r</sup>* e inserção, por recombinação homóloga, na região anterior ao P<sub>TDH3</sub>.

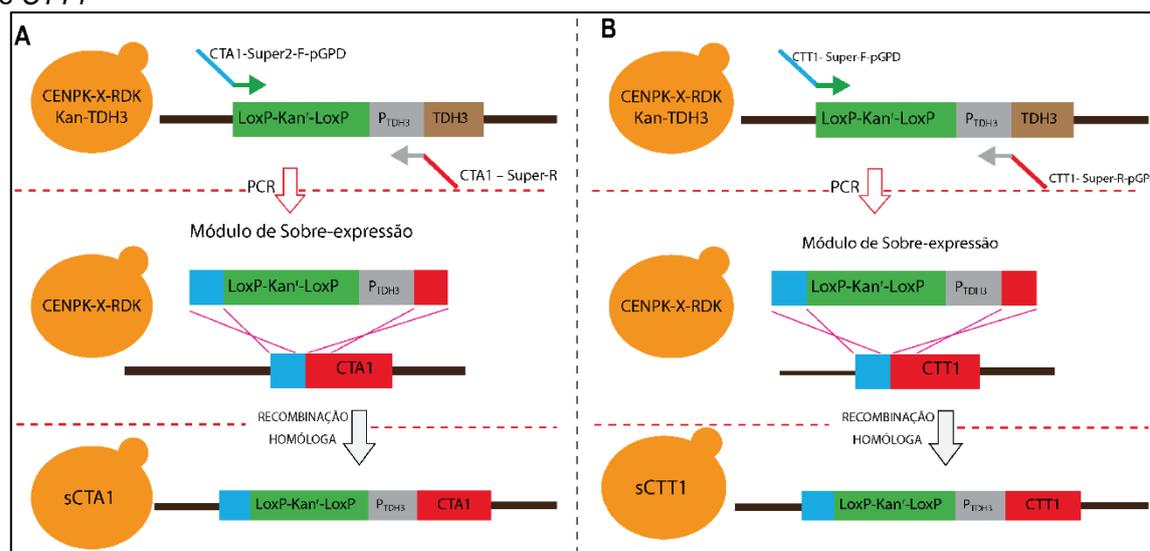


Posteriormente, para a construção da linhagem sCTA1 e sCTT1, linhagens que superexpressam os genes *CTA1* e *CTT1*, respectivamente, foi utilizado o módulo construído anteriormente contendo o gene *Kan<sup>r</sup>* e o P<sub>TDH3</sub>. Para isso, foi utilizado o DNA extraído da linhagem CENPK-X-RDK-Kan-TDH3 e o par de iniciadores CTA1-Super2-F-pGPD/CTA1-Super-R (ver Tabela 2). Esses iniciadores contém, nas suas extremidades, regiões de similaridade (~40 pb) anteriores e na região inicial ao gene alvo da superexpressão e, por transformação da levedura e recombinação homóloga, foi construída a linhagem sCTA1 (Figura 8A). Já para a construção da linhagem sCTT1 os iniciadores utilizados foram CTT1-Super-F-pGPD/CTT1-Super-R-pGPD para amplificar o módulo de superexpressão da linhagem CENPK-X-RDK-Kan-TDH3. Esses iniciadores também contém nas suas extremidades regiões de similaridade (~40 pb) anteriores e na região inicial ao gene alvo (ver Tabela 2). A representação esquemática dessa construção está mostrada na Figura 8B.

Já para a construção da linhagem industrial recombinante (MPC5H1CA1) foi utilizado o módulo de superexpressão contendo o gene marcador *Ble<sup>r</sup>*. Para isso, foi

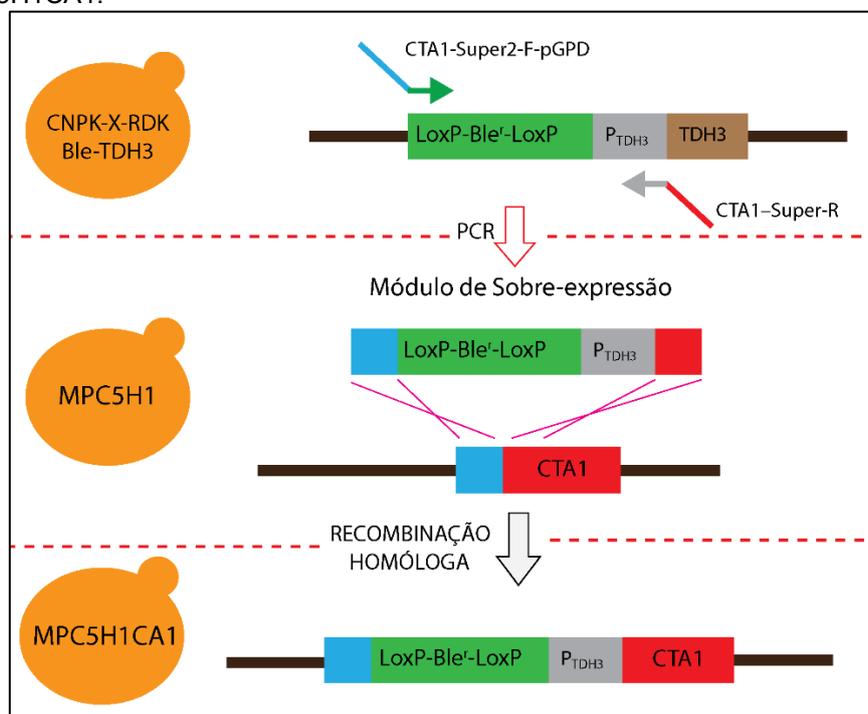
realizada a extração do DNA da linhagem CENPK-X-RDK-Ble-TDH3 e, por PCR, utilizando o par de iniciadores CTA1-Super2-F-pGPD/CTA1-Super-R, foi amplificado esse módulo e transformado na linhagem MPC5H1 dando origem a linhagem MPC5H1CA1 (Figura 9).

Figura 8 - Amplificação do módulo de superexpressão e transformação na levedura CENPK-X-RDK. Em A: Amplificação, por PCR, do módulo de superexpressão loxP-Kan<sup>r</sup>-loxP-P<sub>TDH3</sub> e inserção, por recombinação homóloga, na região promotora do gene *CTA1*. Em B: Amplificação, por PCR, do módulo de superexpressão loxP-Kan<sup>r</sup>-loxP-P<sub>TDH3</sub> e inserção, por recombinação homóloga, na região promotora do gene *CTT1*



Para a construção da linhagem dCTA1 (cepa com o gene *CTA1* deletado) foi utilizado o par de iniciadores CTA1-Del-F/CTA1-Del-R (ver Tabela 2) que contém, nas suas extremidades, regiões de similaridade (~40 pb) com a parte inicial e final do gene *CTA1*. O DNA molde para essa amplificação foi o extraído da linhagem CENPK-X-RDK-Ble-TDH3. Ao final, o produto da PCR foi transformado na levedura CENPK-X-RDK e, por recombinação homóloga, substituiu o gene *CTA1* pelo gene Ble<sup>r</sup>, dando origem a linhagem dCTA1 (Figura 10A). Para a deleção do gene *CTT1* a estratégia utilizada foi semelhante a anterior, no entanto, utilizando o par de iniciadores CTT1-Del-F/CTT1-Del-R que contém regiões de similaridade (~40 pb) com a parte inicial e final do gene *CTT1*. Dessa forma, por transformação da levedura e recombinação homóloga, o gene *CTT1* foi substituído pelo gene Ble<sup>r</sup> (Figura 10B).

Figura 9 - Amplificação do módulo de superexpressão e transformação na levedura MPC5H1. Foi realizada a amplificação, por PCR, do módulo de superexpressão loxP-Ble<sup>r</sup>-loxP-PTDH3 e inserção, por recombinação homóloga, na região promotora do gene *CTA1* da linhagem MPC5H1, originando a linhagem MPC5H1CA1.



Na construção da linhagem onde ambas as catalases estão deletadas (linhagem dCTA1-dCTT1) o DNA da linhagem CNPK-X-RDK-Kan-TDH3 foi extraído e utilizado como molde para as reações de PCR utilizando o par de iniciadores CTT1-Del-F/CTT1-Del-R (vide Tabela 2). O amplificado resultante dessa PCR foi utilizado para transformar a levedura dCTA1 e, por recombinação homóloga, o gene *CTT1* foi substituído pelo gene *Kan<sup>r</sup>*, dando origem a linhagem dCTA1-dCTT1 (Figura 11A). Para a construção da linhagem onde ambas catalases estão superexpressas (linhagem sCTA1-sCTT1) foi utilizado o módulo de superexpressão contendo o gene *Ble<sup>r</sup>*. Resumidamente, esse módulo foi amplificado, por reações de PCR, utilizando o par de iniciadores CTT1-Super-F-pGPD/CTT1-Super-R-pGPD que contém, nas suas extremidades, regiões de similaridade (~40 pb) com a parte inicial e final do gene *CTT1*. Esses amplificados foram utilizados para transformar a levedura sCTA1 e, por recombinação homóloga, foi construída a linhagem sCTA1-sCTT1 (Figura 11B).

Figura 10 - Amplificação do módulo de deleção e transformação na levedura CENPK-X-RDK. Em A: Amplificação, por PCR, do módulo de deleção  $LoxP-Ble^r-LoxP$  e, por recombinação homóloga, a substituição do gene *CTA1*. Em B: Amplificação, por PCR, do módulo de deleção  $LoxP-Ble^r-LoxP$  e, por recombinação homóloga, a substituição do gene *CTT1*

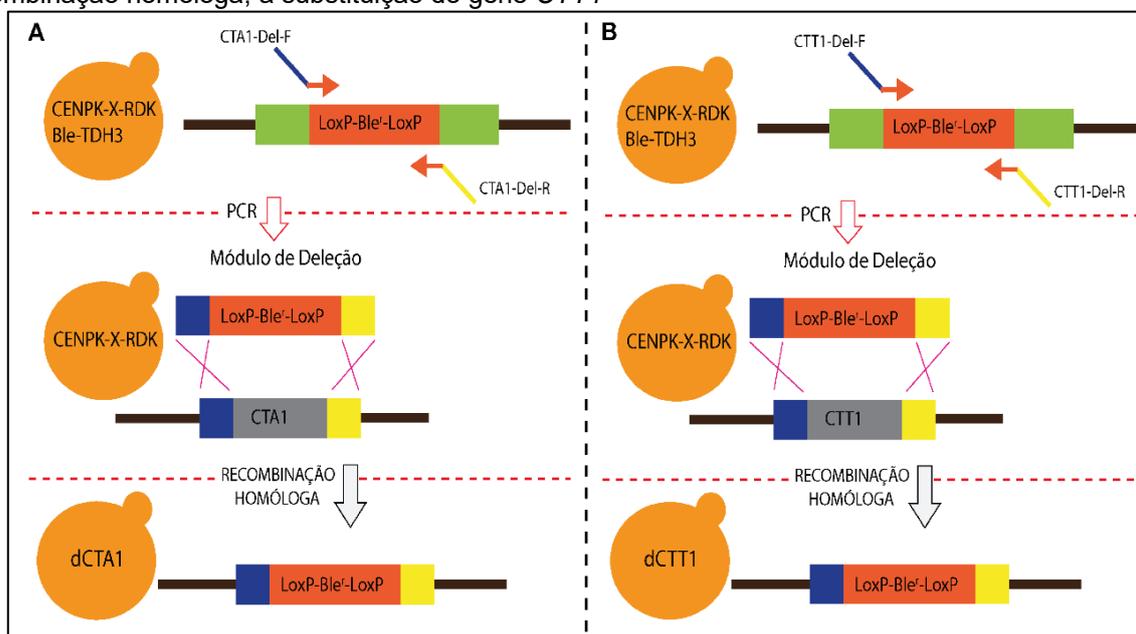
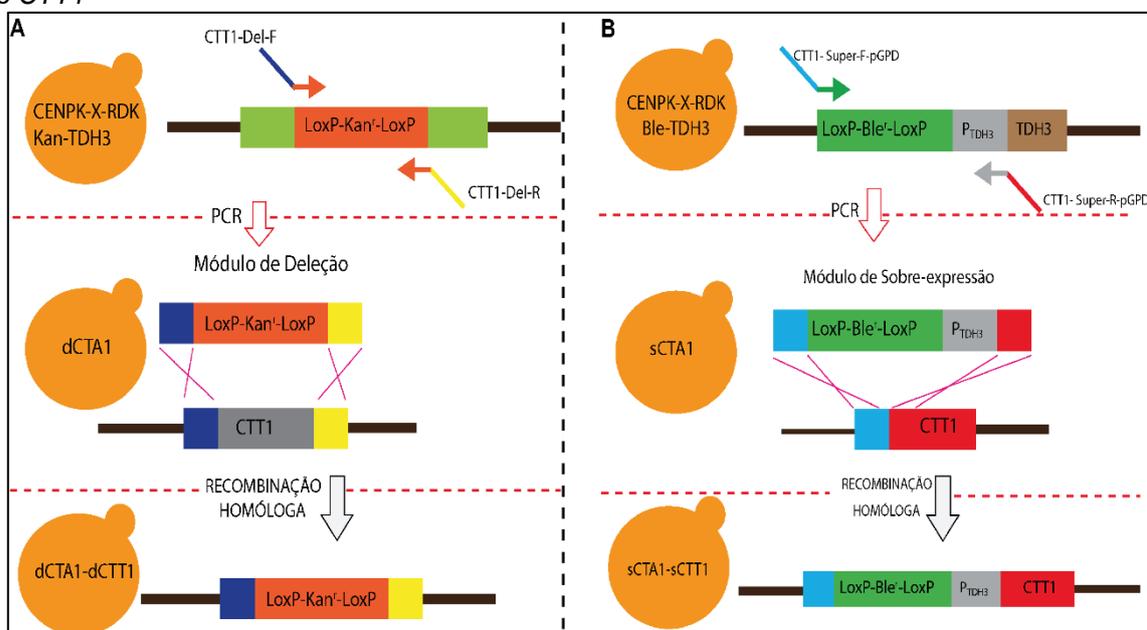


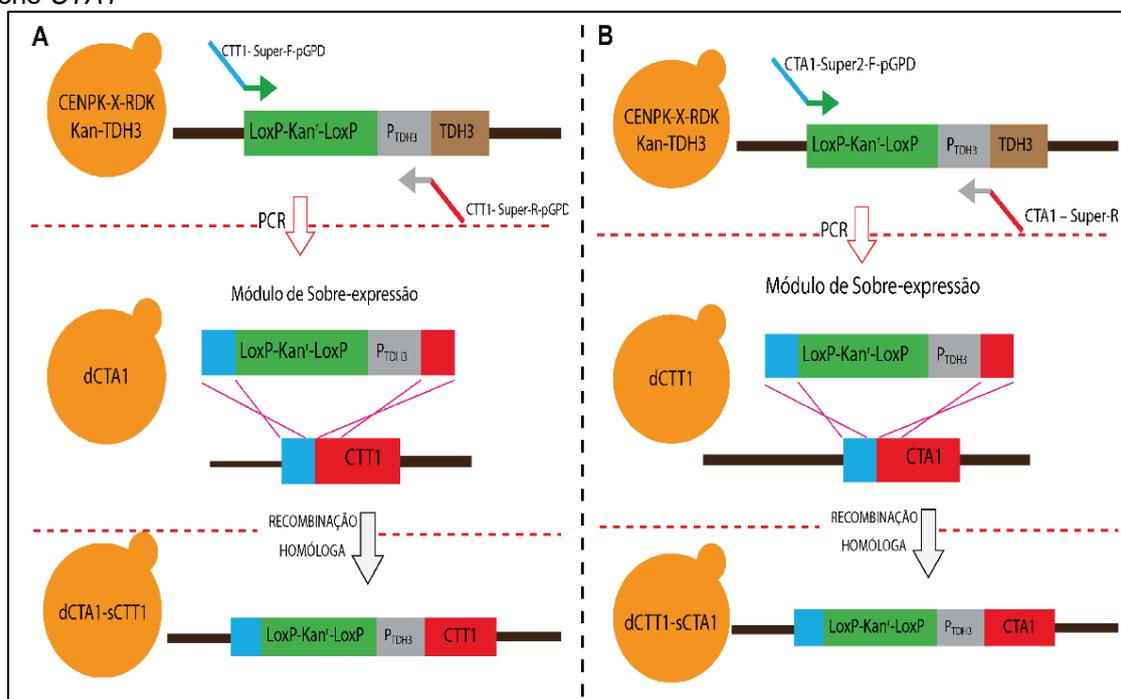
Figura 11 - Amplificação dos módulos de deleção e de superexpressão para transformação nas leveduras *dCTA1* e *sCTA1*. Em A: Amplificação, por PCR, do módulo de deleção  $LoxP-Kan^r-LoxP$  e por recombinação homóloga a substituição do gene *CTA1*. Em B: Amplificação, por PCR, do módulo de superexpressão  $LoxP-Ble^r-LoxP-P_{TDH3}$  e inserção, por recombinação homóloga, na região promotora do gene *CTT1*



Adiante, a estratégia utilizada para a construção das linhagens *dCTA1-sCTT1* e *dCTT1-sCTA1* foi semelhante a utilizada para superexpressar as catalases individualmente (ver acima). Para isso, o módulo de superexpressão, contendo o gene

Kan<sup>r</sup>, foi amplificado por PCR utilizando o par de iniciadores CTT1-Super-F-pGPD/CTT1-Super-R-pGPD e transformado na levedura dCTA1 originando a linhagem dCTA1-sCTT1 (Figura 12A). Por fim, para a construção da linhagem dCTT1-sCTA1 o módulo de superexpressão foi amplificado do DNA extraído da linhagem CENPK-X-RDK-Kan-TDH3 utilizando o par de iniciadores CTA1-Super2-F-pGPD/CTA1-Super-R. Esse módulo foi transformado na levedura dCTT1 e, por recombinação homóloga, integrado no genoma dessa linhagem, dando origem a linhagem dCTT1-sCTA1 (Figura 12B).

Figura 12 - Amplificação do módulo de superexpressão e transformação nas leveduras dCTA1 e dCTT1. Em A: Amplificação, por PCR, do módulo de superexpressão  $\text{LoxP-Kan}^r\text{-LoxP-P}_{\text{TDH3}}$  e inserção, por recombinação homóloga, na região promotora do gene *CTT1*. Em B: Amplificação, por PCR, do módulo de superexpressão  $\text{LoxP-Kan}^r\text{-LoxP-P}_{\text{TDH3}}$  e inserção, por recombinação homóloga, na região promotora do gene *CTA1*



### 3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA(S) CATALASE(S)

A atividade da enzima catalase foi determinada pela taxa de consumo do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nos extratos proteicos totais em espectrofotômetro a 240 nm conforme descrito por Aebi (1984) e revisado por Hadwan e Abed (2016).

Inicialmente, as cepas foram pré-crescidas em 5 mL de meio rico YPD a 30°C e 160 rpm, *overnight*. Posteriormente, as culturas foram lavadas e centrifugadas (3000 g por 5 min) duas vezes em tampão fosfato de potássio (KPi) 0,1M pH 7,0, descartando-se o sobrenadante após a segunda centrifugação. As células então foram ressuspensas

em 1 mL de KPi 0,1M pH 7,0 e transferidas para microtubos de volume 2 mL e adicionadas “bolinhas de vidro” (*glass beads – 425-600  $\mu$ m, lavadas em ácido - Sigma Aldrich*) na proporção 1:0,5 (volume de cultura:bolinhas de vidro). Em seguida, os microtubos foram agitados vigorosamente (*vortex*) alternando-se um minuto de agitação e um minuto em banho de gelo, por cinco repetições. Feito isso, as amostras foram centrifugadas (1000 g por 15 min) e o sobrenadante transferido para outro microtubo e novamente centrifugado (20000 g por 20 min). Por fim, o sobrenadante foi armazenado (-80 °C) e o *pellet* ressuspensado em KPi 0,1M pH 7,0 contendo 0,1% (v/v) de *Triton – X-100 Solution* (Sigma) e armazenado nas mesmas condições. Os sobrenadantes e os *pellets* foram utilizados para a determinação da atividade da(s) catalase(s). Da mesma maneira, outras culturas foram realizadas com as células ( $D.O_{600nm} = 1.0$ ) sendo incubadas, após crescimento em YPD *overnight*, em tampão KPi 0,1M pH 7,0 contendo 3,8 g L<sup>-1</sup> de furfural, a 30 °C e 160 rpm por duas horas. A extração das proteínas totais e armazenamento do sobrenadante foi idêntico ao exposto acima.

Os sobrenadantes, dos extratos proteicos das células não expostas ao furfural, foram também utilizados na realização dos ensaios de inibição da(s) catalase(s) *in vitro*. Para isso, o procedimento foi semelhante ao já descrito anteriormente. No entanto, ao meio reacional, foram adicionadas concentrações crescentes de furfural (10-1000  $\mu$ M). De posse destes resultados, a concentração de furfural capaz de inibir 50% da atividade da(s) catalase(s) –  $IC_{50}$ , *in vitro*, foi determinada ajustando-os em uma curva dose-resposta no *software Graphpad Prism*<sup>®</sup> conforme descrito por Hung et al. (2018). Em todos os ensaios, os valores de atividade das catalases foram normalizados de acordo com a concentração total de proteínas seguindo metodologia de Bradford (1976).

### 3.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS (ER)

Os níveis de ER foram determinados através do fluoróforo diacetato de 2,7-dicloro-fluoresceína (DCF-DA) conforme descrito por Madeo et al. (1999) e Allen et al. (2010). Para isso, as cepas foram pré-crescidas em meio rico YPD e a concentração celular ajustada para  $D.O_{600nm} = 1.0$ . O volume de 1 mL da cultura foi transferido para um microtubo, centrifugado (3000 g por 5 min) e lavado duas vezes com tampão PBS (Tampão fosfato-salino) 0,1M pH 7,0 e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas no mesmo tampão contendo 3,8 g L<sup>-1</sup> de furfural e incubadas a 30 °C por duas horas. Passados esses períodos, as culturas foram novamente lavadas duas vezes

e ressuspensas em solução de 10  $\mu\text{M}$  de DCF-DA em PBS pH 7,0 e incubadas no escuro por 1h. A seguir, as culturas foram centrifugadas (3000 g por 5 min) e ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de PBS pH 7,0 e transferidas para uma placa de 96 poços (*Cell Culture Microplate, 96 Well, Black*) e realizadas leituras de fluorescência em espectrofluorímetro (*Spectra MAX Gemini EM*) – Excitação em 488 nm e Emissão em 532 nm. Os valores de fluorescência relativa foram normalizados com o valor obtido das cepas parentais: CENPK-X-RDK para as linhagens laboratoriais e MPC5H1 para a linhagem industrial.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE $\text{H}_2\text{O}_2$ – MÉTODO AMPLEX® RED

Para a determinação dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi utilizado o Kit Amplex® Red Hydrogen Peroxide (*Molecular Probes® - Invitrogen*) seguindo o protocolo proposto pelo fabricante. Em suma, o reagente Amplex® Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) detecta  $\text{H}_2\text{O}_2$  através da reação com peroxidase de raiz-forte (HRP - *horseradish peroxidase*) na proporção estequiométrica 1:1, produzindo a resorufina – vermelho fluorescente (DEBSKI et al., 2016).

Para esses ensaios foram utilizados os extratos proteicos obtidos conforme descrito no item 3.3. Dessa forma, o extrato proteico foi incubado na presença de Amplex® Red contendo a peroxidase HRP por 40 min no escuro e realizada leitura de fluorescência em espectrofluorímetro (*Spectra MAX Gemini EM*) – excitação 540 nm e emissão 560 nm. Os níveis de peróxido de hidrogênio foram determinados a partir de uma curva padrão nas mesmas condições da amostra e normalizados em relação a cepa CENPK-X-RDK para as linhagens laboratoriais e MPC5H1 para a linhagem industrial.

### 3.6 CRESCIMENTO CELULAR EM MICROESCALA

A fim de verificar a cinética de crescimento celular foram realizados crescimentos em microescala em placas de 96 poços. Para isso, as linhagens foram pré-crescidas em meio rico líquido YPD e sob agitação (160 rpm) a 30 °C *overnight*. Posteriormente, a densidade ótica (DO) foi mensurada em espectrofotômetro e ajustada ( $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1,0$ ). Feito isso, as cepas foram inoculadas em placas de 96 poços (absorbância inicial 0,1 a 600 nm) em novos meios de cultura YP contendo 40 g  $\text{L}^{-1}$  de glicose ou 20 g  $\text{L}^{-1}$  de xilose ou ainda 40 g  $\text{L}^{-1}$  de glicose mais 20 g  $\text{L}^{-1}$  de xilose, todos contendo 3,8 g  $\text{L}^{-1}$  de furfural, e seladas (*AccuClear Sealing Film for qPCR*). Em seguida as placas foram incubadas

em leitora multifuncional (*Tecan Echisto Infinite m200 Pro*) a 30 °C sob agitação constante por até 160h e o crescimento celular mensurado pela densidade ótica ( $DO_{600nm}$ ). Ao final, as placas foram centrifugadas a 3500 g por 10 min e o sobrenadante congelado a -20 °C para posterior análise do etanol produzido.

### 3.7 COFERMENTAÇÃO EM BATELADA SIMPLES

Para os ensaios fermentativos em batelada simples as leveduras foram pré-crescidas em 50 mL de meio rico YPD, até sua fase exponencial (~12 h). As culturas foram centrifugadas a 4 °C e lavadas com água destilada estéril duas vezes e ressuspensas em água destilada estéril até atingirem uma concentração celular equivalente a  $DO_{600nm} = 40$ . Uma alíquota de 5 mL da suspensão celular (4x) foi misturada com 5 mL de meio rico YP (4x); 5 mL de glicose 40 g L<sup>-1</sup> (4x); 5 mL de xilose 20 g L<sup>-1</sup> (4x), em frascos de 25 mL com tampa fechada, de modo que a concentração celular resultou em uma  $DO_{600nm} = 10$  ( $\cong 2,7$  g L<sup>-1</sup>). Nesses meios foram adicionados furfural de modo que a concentração final deste aldeído foi de 3,8 g L<sup>-1</sup>. Da mesma maneira foram preparados outros frascos, porém sem a adição de furfural. Os frascos foram incubados sob agitação orbital (180 rpm) a 30 °C por até 48h.

De maneira semelhante foram realizadas fermentações em batelada simples utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar produzido por PEREIRA et al. (2022). Em suma, o bagaço de cana-de-açúcar foi cedido pela Usina Santa Maria, localizada em Manduri – São Paulo e passou por processo de pré-tratamento ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e alta temperatura (140 °C) em reator de liga de aço. Posteriormente, foi filtrado e concentrado em evaporador. Ao final, obteve-se o hidrolisado hemicelulósico que continha, aproximadamente: 160 g L<sup>-1</sup> de xilose, 25 g L<sup>-1</sup> de glicose, 0,55 g L<sup>-1</sup> de ácido acético, 0,08 g L<sup>-1</sup> de HMF e 0,8 g L<sup>-1</sup> de furfural. Para a cofermentação, utilizando esse hidrolisado, uma alíquota de 5 mL da suspensão celular (4x) foi misturada com 5 mL do hidrolisado; 4 mL de glicose 300 g L<sup>-1</sup>; 6 mL de água destilada estéril, em frascos de 25 mL com tampa fechada.

Para ambas as fermentações alíquotas foram retiradas, centrifugadas e o sobrenadante armazenado (-20 °C) para posterior determinação dos perfis de consumo de açúcares, produção de metabólitos e detoxificação do furfural via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE, conforme descrito abaixo.

### 3.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

O etanol produzido durante os crescimentos em microescala (item 3.6) foi quantificado enzimaticamente por reação da enzima álcool oxidase oriunda de *Pichia pastoris* (*Sigma*) e a peroxidase de raiz forte (*Toyobo do Brasil*), através de metodologia adaptada de Salgado et al. (2000). 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 uma hora e a absorbância foi medida a 505 nm. A concentração final de etanol foi calculada utilizando curva de calibração construída com solução padrão de etanol (0 – 10 g L<sup>-1</sup>).

As determinações do consumo dos substratos (glicose e xilose) e os metabólitos (glicerol, xilitol, ácido acético e etanol) produzidos nas cofermentações (item 4.7), bem como a detoxificação de furfural, foram realizadas utilizando CLAE nas seguintes condições: Cromatógrafo líquido (*Shimadzu Prominence LC-20A - Shimadzu*); 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: 65 °C; detector: índice de refração; volume de injeção: 10 µL. A concentração dos açúcares, metabólitos e do furfural foram determinadas utilizando curvas-padrão construídas nas mesmas condições das amostras.

### 3.9 CÁLCULO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

A velocidade de consumo de açúcar (*V*) foi calculada entre a razão do açúcar consumido e o tempo, de acordo com a Equação 1. A velocidade de consumo de açúcar é expressa em g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

$$V = \left( \frac{a\acute{c}u\acute{c}ar_0 - a\acute{c}u\acute{c}ar_f}{t} \right) \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

*açúcar*<sub>0</sub> = concentração inicial de açúcar expressa em g L<sup>-1</sup>

*açúcar*<sub>f</sub> = concentração final de açúcar, expressa em g L<sup>-1</sup>

*t* = tempo, expresso em horas.

A produtividade volumétrica de etanol (Q) foi calculada pela razão entre o etanol final menos o etanol no tempo zero e o tempo de fermentação, conforme a Equação 2. A produtividade volumétrica de etanol é expressa em g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

$$Q = \left( \frac{Et_f - E_0}{t} \right) \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

Et<sub>f</sub> = concentração final de etanol, expressa em g L<sup>-1</sup>;

Et<sub>0</sub> = concentração inicial de etanol, expressa em g L<sup>-1</sup>;

t = tempo, expresso em horas.

O fator de rendimento do processo fermentativo foi calculado pela razão entre o etanol final menos o etanol no tempo zero e a concentração de açúcar final menos a inicial conforme Equação 3.

$$Y_{E/S} = \left( \frac{Et_f - E_0}{açúcar_0 - açúcar_f} \right) \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

Et<sub>f</sub> = concentração final de etanol, expressa em g L<sup>-1</sup>;

Et<sub>0</sub> = concentração inicial de etanol, expressa em g L<sup>-1</sup>;

Açúcar<sub>0</sub> = concentração inicial de açúcar, expressa em g L<sup>-1</sup>;

Açúcar<sub>f</sub> = concentração final de açúcar, expressa em g L<sup>-1</sup>;

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CONSTRUÇÃO DOS MÓDULOS DE SUPEREXPRESSÃO UTILIZANDO OS GENES *Kan<sup>R</sup>*, *Ble<sup>R</sup>* E O PROMOTOR $P_{TDH3}$

A superexpressão das catalases, codificadas pelos genes *CTA1* e *CTT1* em *S. cerevisiae*, foi um dos objetivos deste trabalho. No entanto, embora em nosso grupo de pesquisa dispúnhamos de cepas com módulos de superexpressão construídos com o promotor do gene *ADH1* ( $P_{ADH1}$ ), esse promotor não era o mais indicado para este trabalho. Isso porque, a expressão gênica é altamente influenciada por condições ambientais, como compostos químicos (XIONG et al., 2018; MYBURGH, ROSE e VILJOEN-BLOOM, 2020; CAÑONERO et al. 2022; BIAN et al. 2022), o que em nosso trabalho envolvia o furfural, presente nos hidrolisados lignocelulósicos. De fato, Xiong et al. (2018) demonstraram que  $P_{ADH1}$ , geralmente relatado como um promotor forte e constitutivo, teve sua força significativamente variável na presença de ácido acético, furfural e xilose. Os mesmos autores mostram que o promotor do gene *TDH3*, que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), dentre oito promotores avaliados, teve maior expressão na presença de furfural ou xilose. Desse modo, levando em conta o relatado na literatura, optou-se em construir novos módulos de superexpressão utilizando o promotor  $P_{TDH3}$ .

Inicialmente, a construção dos módulos de superexpressão *loxP-KanMX-loxP-P<sub>TDH3</sub>* e *loxP-BleMX-loxP-P<sub>TDH3</sub>* se deu por reações de PCR, transformação das leveduras e recombinação homóloga conforme detalhado anteriormente (Item 4.2). Para isso, os genes *Kan<sup>r</sup>* ( $\cong$  1600 pb) e *Ble<sup>r</sup>* ( $\cong$  1200 pb) foram inseridos na região imediatamente anterior ao  $P_{TDH3}$  ( $\cong$  650 pb). Dessa forma, originou-se os módulos de superexpressão contendo, aproximadamente, 2250 pb para aquele utilizando o marcador *Kan<sup>r</sup>* e 1850 pb onde o gene marcador foi o *Ble<sup>r</sup>*. Como consequência, originou-se as linhagens CENPK-X-RDK-Kan-TDH3 e CENPK-X-RDK-Ble-TDH3, respectivamente. A verificação da correta inserção desses genes foi realizada por reações de PCR utilizando o DNA extraído tanto da linhagem parental como das recombinantes.

Analisando a Figura 13 nota-se que o par de iniciadores V-TDH3-F e V-TDH3-R, que anelam na região anterior e final do gene *TDH3* respectivamente, amplificou fragmentos de aproximadamente 3650 pb na linhagem recombinante CNPK-X-RDK-

Kan-TDH3 e 2141 pb na linhagem parental (Figura 13-B, raias 1R e 2P). Já quando utilizados o par de iniciadores V-Kan-F e V-TDH3-R, que anelam no interior do gene *Kan<sup>r</sup>* e no final do gene *TDH3*, respectivamente, é possível observar uma banda equivalente a aproximadamente 1432 pb na raia referente a linhagem recombinante (Figura 13-B, raia 3R). Por outro lado, utilizando o mesmo par de iniciadores, porém com o DNA da linhagem parental, não foi possível observar nenhum amplificado (Figura 13-B, raia 4P) visto que essa linhagem não possui em seu genoma o gene *Kan<sup>r</sup>*. Dessa forma, confirmou-se a correta inserção do gene *Kan<sup>r</sup>* a montante do  $P_{TDH3}$ . Nesta figura e nas próximas, “P” indica a linhagem parental e “R” indica a linhagem recombinante.

Para a construção do módulo de superexpressão, porém agora utilizando o gene marcador *Ble<sup>r</sup>*, a estratégia utilizada foi idêntica à anterior, conforme se visualiza na Figura 14, sendo que esta figura mostra também a confirmação da correta modificação do promotor  $P_{TDH3}$  usando PCR.

Figura 13 - Confirmação da inserção do gene *Kan<sup>r</sup>* a montante do  $P_{TDH3}$ . Em A: Representação esquemática do anelamento dos iniciadores utilizados bem como o comprimento dos amplificados. Em B: Eletroforese horizontal em gel de agarose: raia à esquerda (Ladder 1 Kb – Fermentans); raia 1R e 2P iniciadores V-TDH3-F e V-TDH3-R; raias 3R e 4P iniciadores V-Kan-F e V-TDH3-R

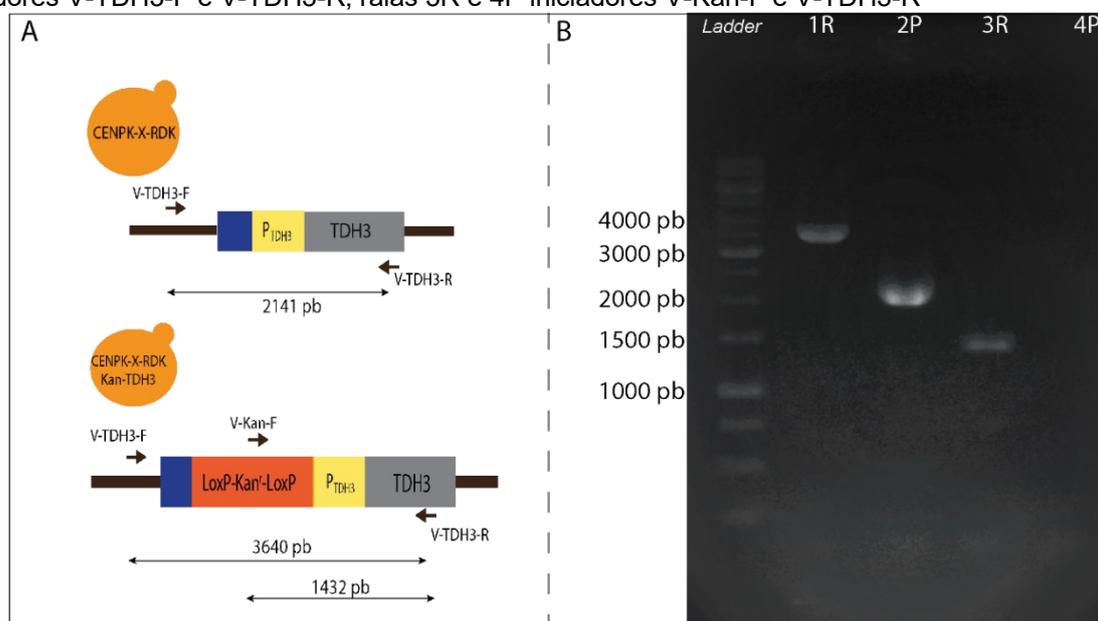
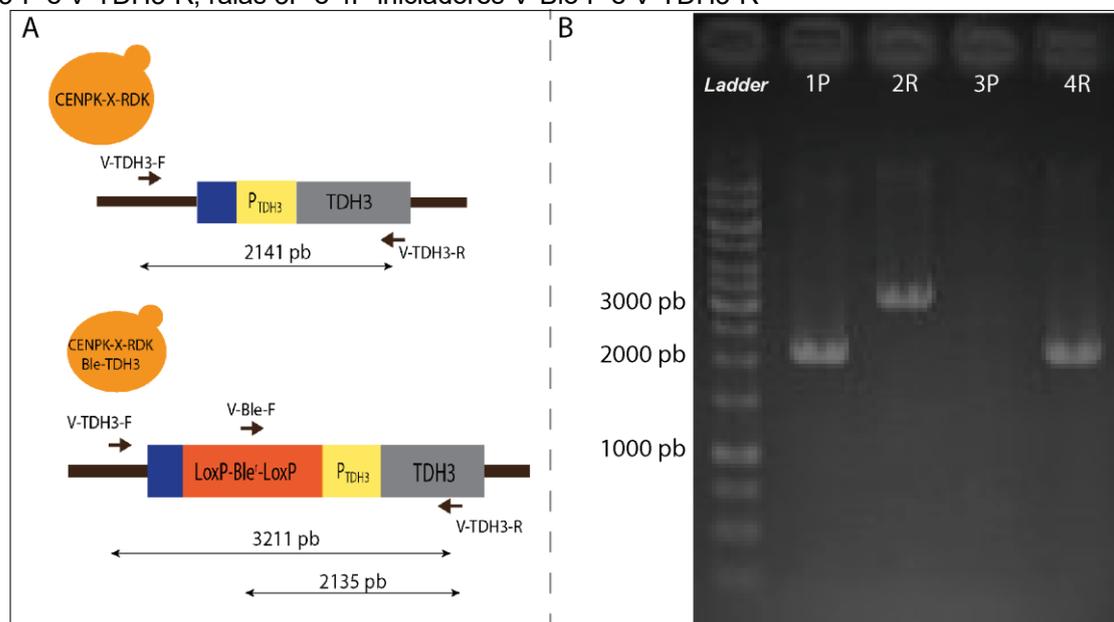


Figura 14 - Confirmação da inserção do gene *Ble<sup>r</sup>* a montante do  $P_{TDH3}$ . Em A: Representação esquemática do anelamento dos iniciadores utilizados bem como o comprimento dos amplificandos. Em B: Eletroforese horizontal em gel de agarose: raia à esquerda (*Ladder* 1 Kb – Fermentans); raia 1P e 2R iniciadores V-TDH3-F e V-TDH3-R; raias 3P e 4P iniciadores V-Ble-F e V-TDH3-R



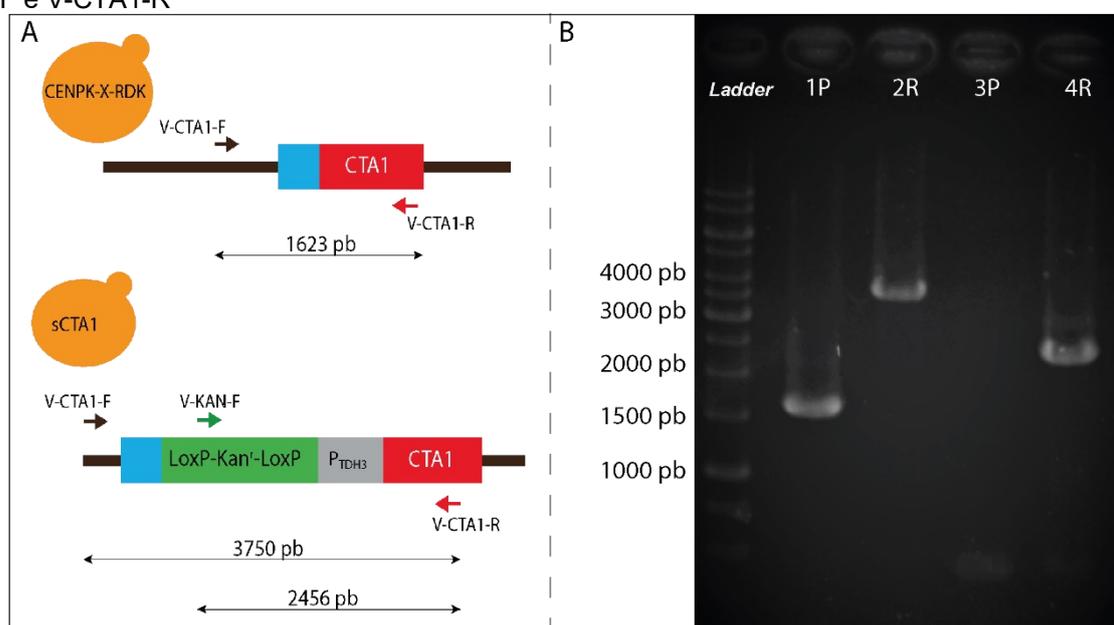
#### 4.2 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS ONDE OS GENES *CTA1* E/OU *CTT1* ESTEJAM SUPEREXPRESSOS

Após suas construções, os módulos de superexpressão foram inseridos nas células da levedura CENPK-X-RDK e, por recombinação homóloga, integrados ao genoma dessa linhagem a montante dos genes *CTA1* e *CTT1*. Originaram-se então as linhagens sCTA1, sCTT1 e sCTA1-sCTT1. Da mesma maneira, foi inserido o módulo de superexpressão, contendo o gene marcador *Ble<sup>r</sup>*, na linhagem industrial, MPC5H1, originando a linhagem MPC5H1CA1 (vide Tabela 1). A correta inserção desses módulos foi verificada por PCR, utilizando o DNA extraído tanto da linhagem parental como das recombinantes.

De acordo com a Figura 15, nota-se que utilizando o par de iniciadores V-CTA1-F e V-CTA1-R, que anelam na região anterior e final do gene *CTA1* respectivamente, amplificou-se fragmentos de aproximadamente 1623 pb na linhagem parental e de 3750 pb na linhagem recombinante sCTA1 (Figura 15-B, raias 1P e 2R). Já quando utilizado o par de iniciadores V-Kan-F e V-CTA1-R, que anelam no interior do gene *Kan<sup>r</sup>* e no final do gene *CTA1* respectivamente, foi possível observar uma banda equivalente a aproximadamente 2456 pb na raia referente à linhagem recombinante (Figura 15-B, raia

4R). Por outro lado, utilizando o mesmo par de iniciadores, porém com o DNA da linhagem parental, não foi possível observar nenhum amplificado (Figura 15-B, raia 3P) visto que essa linhagem não possui em seu genoma o gene *Kan<sup>r</sup>*. Dessa forma, confirmou-se a correta inserção do módulo de superexpressão no genoma dessa levedura, a montante do gene *CTA1*.

Figura 15 - Confirmação da inserção do módulo de superexpressão a montante do gene *CTA1*, originando a linhagem sCTA1. Em A: Representação esquemática do anelamento dos iniciadores utilizados bem como o comprimento dos amplificandos. Em B: Eletroforese horizontal em gel de agarose: raia à esquerda (*Ladder* 1 Kb – Fermentans); raia 1P e 2R iniciadores V-CTA1-F e V-CTA1-R; raias 3P e 4R iniciadores V-Kan-F e V-CTA1-R



Para a obtenção da linhagem sCTT1 a estratégia utilizada foi idêntica à anterior, conforme se observa na Figura 16. Já na construção da linhagem onde ambas as catalases estivessem superexpressas, utilizou-se o módulo de superexpressão contendo o gene marcador *Ble<sup>r</sup>* (vide item 4.1) para transformar a levedura sCTA1, originando assim a linhagem sCTA1-sCTT1 (Figura 17).

Por fim, a linhagem industrial recombinante MPC5H1 foi transformada com o módulo de superexpressão utilizando o gene *Ble<sup>r</sup>* a fim de aumentar a expressão do gene *CTA1*, obtendo-se a linhagem MPC5H1CA1 (Figura 18). Conforme se observa na figura, o módulo de superexpressão foi integralizado no genoma dessa linhagem de forma correta – a montante do gene *CTA1*. Importante notar que a cepa MPC5H1CA1 é uma linhagem diplóide (ver Tabela 1) e essa integralização se deu nas duas cópias do gene *CTA1*. Isso porque, na Figura 18-B raia 3R, se nota apenas uma banda ( $\cong$  5200 pb).

### 4.3 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS ONDE OS GENES *CTA1* E/OU *CTT1* ESTEJAM DELETADOS.

Para obtenção das linhagens onde a(s) catalase(s) estivessem deletadas a levedura CENPK-X-RDK foi transformada com os módulos de deleção *Ble<sup>r</sup>* que, por recombinação homóloga, substituíram os genes *CTA1* ou *CTT1*. A verificação da correta substituição desses genes foi realizada por PCR utilizando o DNA extraído tanto da linhagem parental como das recombinantes. Ao utilizar os iniciadores V-CTA1-F e CTA1-VeriFora-R, que hibridizam na região anterior e posterior ao gene *CTA1* respectivamente, amplificou-se fragmentos de aproximadamente 2059 pb na linhagem recombinante enquanto a amplificação foi de 2466 pb na linhagem parental (Figura 19-A, raias 1P e 2R). Já quando o par de iniciadores utilizados foram V-Ble-F e CTA1-VeriFora-R a amplificação, para a linhagem recombinante, foi de 954 pb. Em contrapartida, não houve amplificação para a linhagem parental, isso porque essa linhagem não possui o gene *Ble<sup>r</sup>* em seu genoma (Figura 19-B, raias 3P e 4R).

De maneira análoga, a deleção do gene *CTT1* na linhagem CENPK-X-RDK se deu pela substituição desse gene pelo módulo de deleção contendo o gene marcador *Ble<sup>r</sup>*. Verifica-se, por meio da Figura 20, que a utilização dos iniciadores V-CTT1-F e CTT1-VeriFora-R, que hibridizam na região anterior e posterior ao gene *CTT1* respectivamente, amplificaram fragmentos de aproximadamente 1812 pb na linhagem recombinante dCTT1 enquanto a amplificação foi de 2324 pb na linhagem parental (Figura 20-A, raias 1R e 2P). Já quando o par de iniciadores utilizados foi V-Ble-F e CTT1-VeriFora-R a amplificação, para a linhagem recombinante, foi de 817 pb. Em contrapartida, não houve amplificação na linhagem parental (Figura 20-B, raias 3P e 4R).

Por fim, para a obtenção da linhagem onde as duas catalases estivessem deletadas, inseriu-se o módulo de deleção contendo o gene marcador *Kan<sup>r</sup>* na linhagem dCTA1, e, por recombinação homóloga, o gene *CTT1* foi substituído nessa linhagem pelo gene *Kan<sup>r</sup>*, obtendo-se a linhagem dCTA1-dCTT1 (Figura 21).

Figura 16 - Confirmação da inserção do módulo de superexpressão a montante do gene *CTT1*, originando a linhagem sCTT1. Em A: Representação esquemática do anelamento dos iniciadores utilizados bem como o comprimento dos amplificadores. Em B: Eletroforese horizontal em gel de agarose: raia à esquerda (*Ladder* 1 Kb – Fermentans); raia 1P e 2R iniciadores V-CTT1-F e V-CTT1-R; raias 3P e 4R iniciadores V-Kan-F e V-CTT1-R

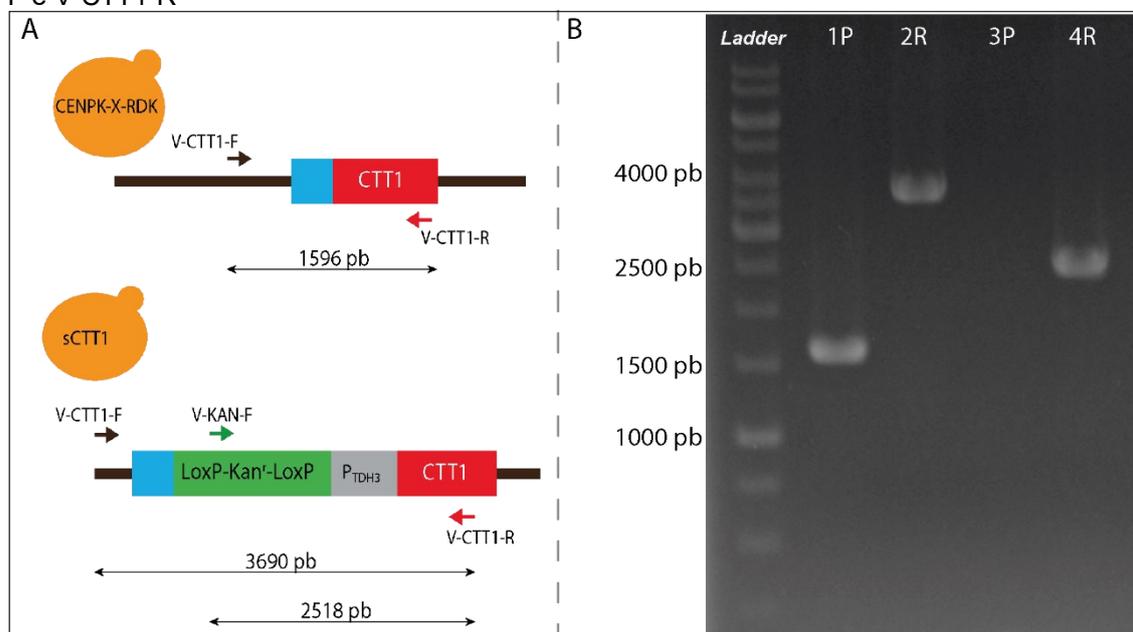


Figura 17 - Confirmação da inserção do módulo de superexpressão a montante do gene *CTT1*, originando a linhagem sCTA1-sCTT1. Em A: Representação esquemática do anelamento dos iniciadores utilizados bem como o comprimento dos amplificadores. Em B: Eletroforese horizontal em gel de agarose: raia à esquerda (*Ladder* 1 Kb – Fermentans); raia 1P e 2R iniciadores V-CTT1-F e V-CTT1-R; raias 3P e 4R iniciadores V-Ble-F e V-CTT1-R

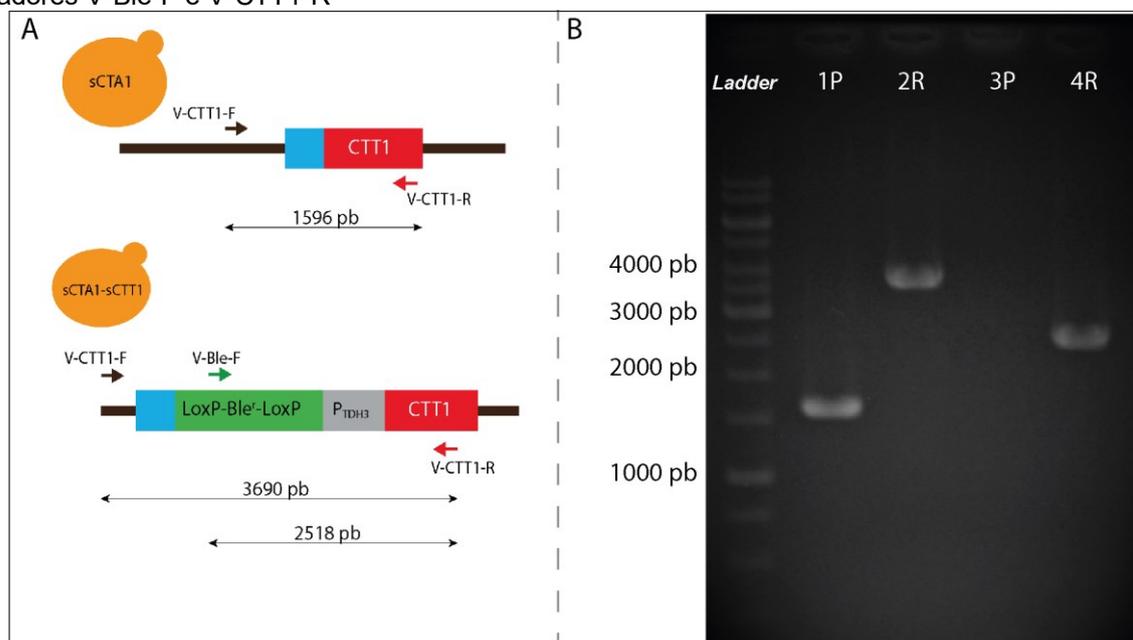


Figura 18 - Confirmação da inserção do módulo de superexpressão a montante do gene *CTA1*, originando a linhagem MPC5H1CA1. Em A: Representação esquemática do anelamento dos iniciadores utilizados bem como o comprimento dos amplificadores. Em B: Eletroforese horizontal em gel de agarose: raia à esquerda (*Ladder* 1 Kb – Fermentans); raia 1R e 2P iniciadores GPD-F e V-CTA1-Fora-R; raias 3R e 4P iniciadores V-CTA1-F e V-CTA1-Fora-R

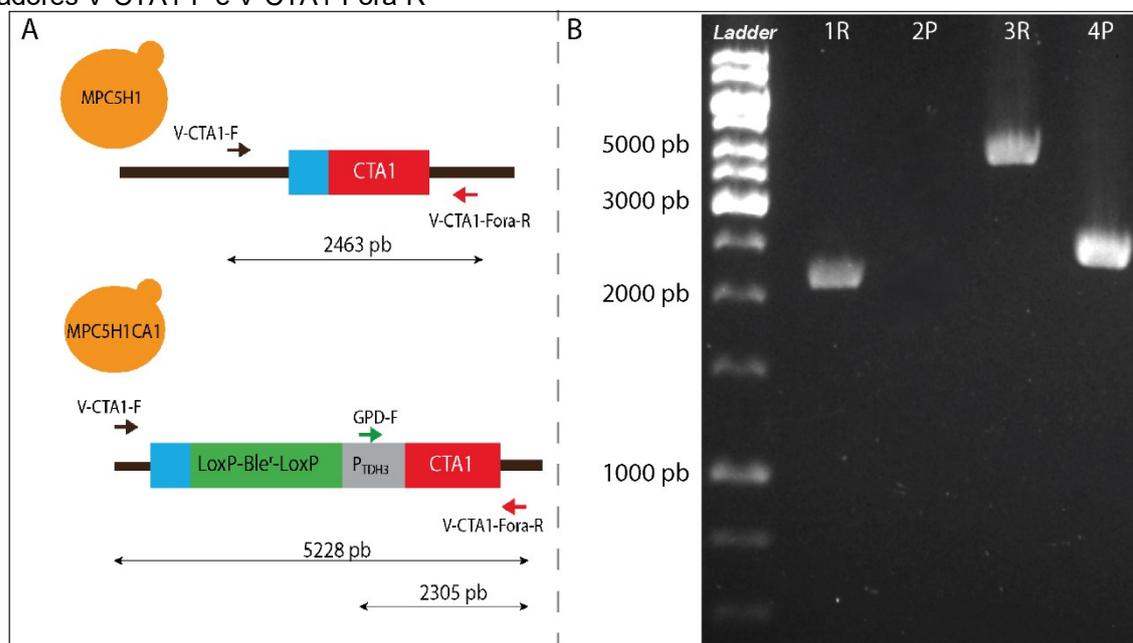


Figura 19 - Confirmação da deleção do gene *CTA1* originando a linhagem dCTA1. Em A: Representação esquemática do anelamento dos iniciadores utilizados bem como o comprimento dos amplificadores. Em B: Eletroforese horizontal em gel de agarose: raia à esquerda (*Ladder* 1 Kb – Fermentans); raia 1P e 2R iniciadores V-CTA1-F e CTA1-VeriFora-R; raias 3P e 4R iniciadores V-Ble-F e CTA1-VeriFora-R

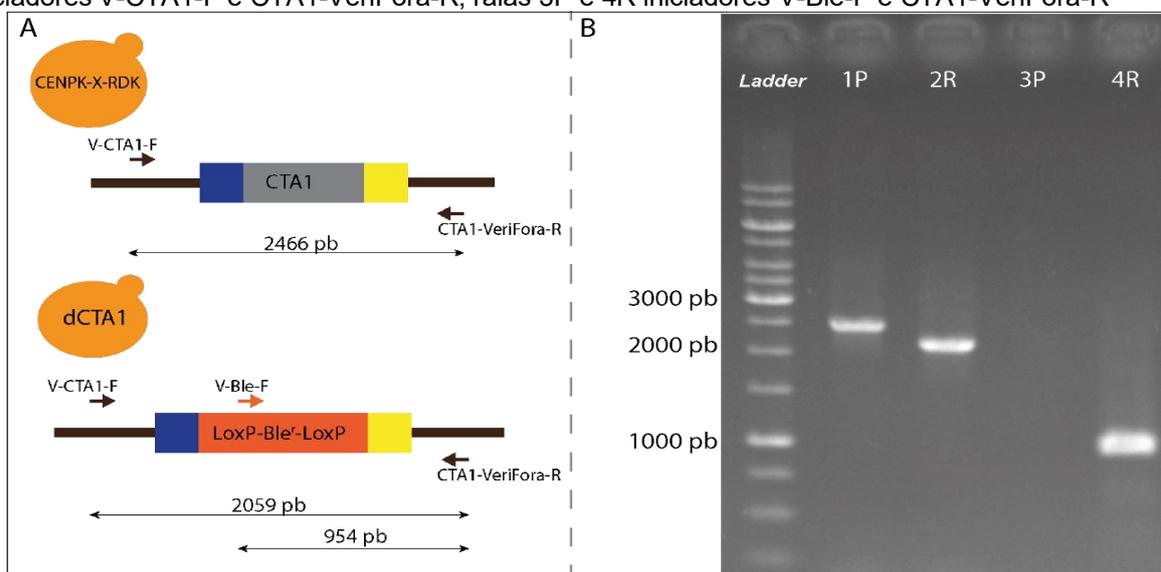
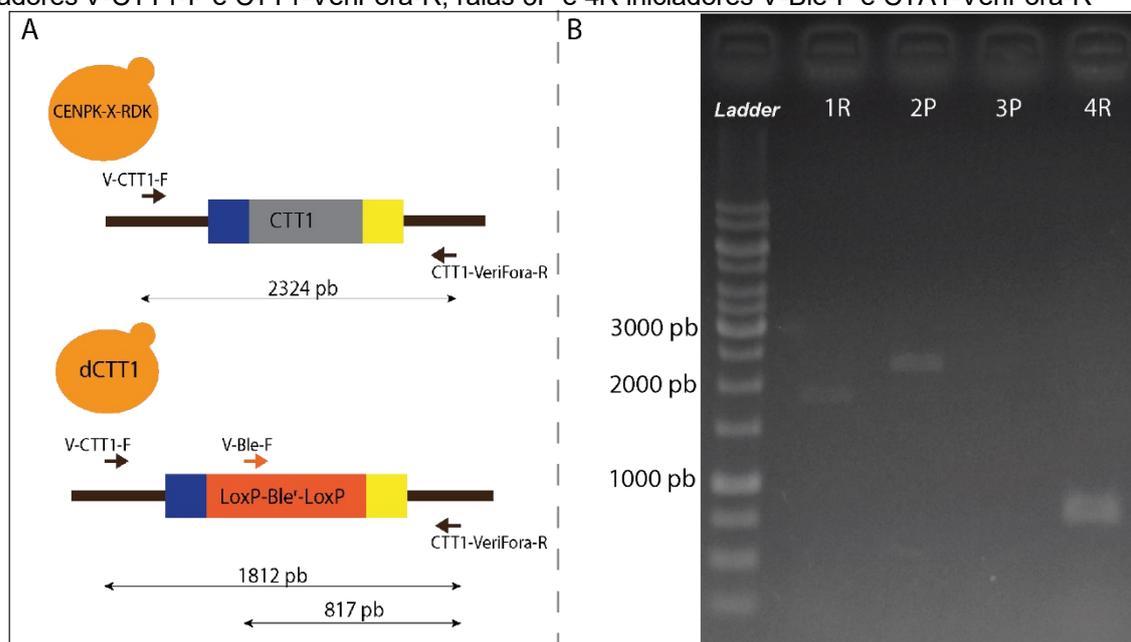


Figura 20 - Confirmação da deleção do gene *CTT1* originando a linhagem dCTT1. Em A: Representação esquemática do anelamento dos iniciadores utilizados bem como o comprimento dos amplificadas. Em B: Eletroforese horizontal em gel de agarose: raia à esquerda (*Ladder* 1 Kb – Fermentans); raia 1R e 2P iniciadores V-CTT1-F e CTT1-VeriFora-R; raias 3P e 4R iniciadores V-Ble-F e CTA1-VeriFora-R



#### 4.4 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS COMBINANDO DELEÇÃO COM SUPEREXPRESSION DAS CATALASES

Com o intuito de se obter linhagens onde uma das catalases estivesse deletada e a outra superexpressa, as leveduras dCTA1 e dCTT1 (cujas catalases foram deletadas com o marcador Ble<sup>r</sup>) foram transformadas com módulos de superexpressão, contendo o gene *Kan<sup>r</sup>*. Dessa forma, construiu-se duas novas linhagens: dCTA1-sCTT1 e dCTT1-sCTA1 (Figuras 21 e 22). A confirmação da correta inserção dos módulos se deu de forma análoga ao já detalhado nos itens anteriores.

Figura 21 - Confirmação da deleção do gene *CTT1* na linhagem dCTA1 originando a linhagem dCTA1-dCTT1. Em A: Representação esquemática do anelamento dos iniciadores utilizados bem como o comprimento dos amplificadores. Em B: Eletroforese horizontal em gel de agarose: raia à esquerda (*Ladder* 1 Kb – Fermentans); raia 1R e 2P iniciadores V-Kan-F e CTT1-VeriFora-R; raias 3R e 4P iniciadores V-CTT1-F e CTT1-VeriFora-R

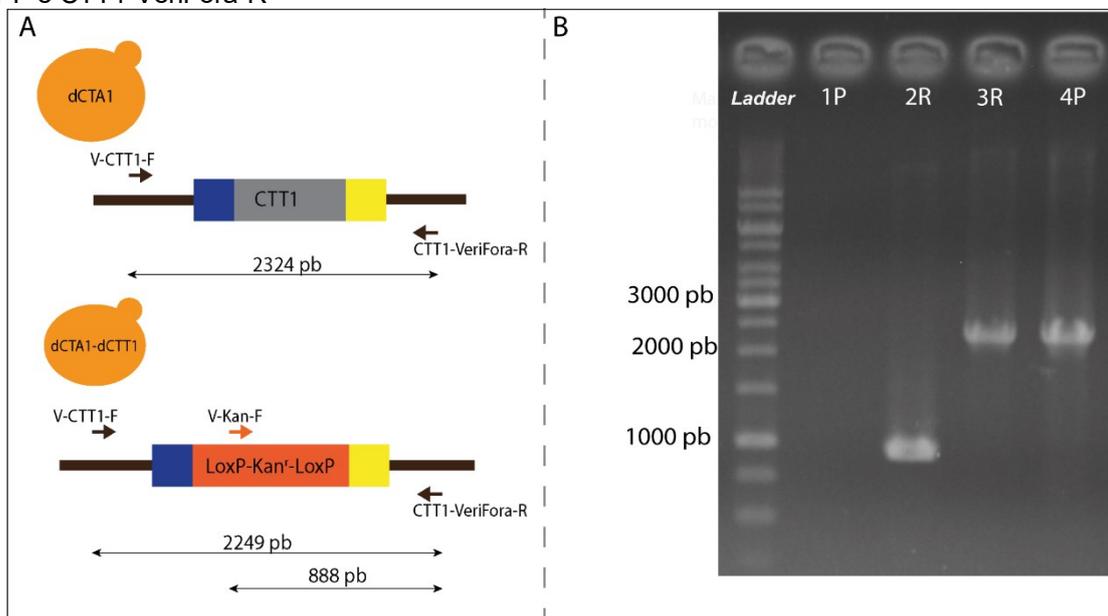


Figura 22 - Confirmação da inserção do módulo de superexpressão na linhagem dCTA1, originando a linhagem dCTA1-sCTT1. Em A: Representação esquemática do anelamento dos iniciadores utilizados bem como o comprimento dos amplificadores. Em B: Eletroforese horizontal em gel de agarose: raia à esquerda (*Ladder* 1 Kb – Fermentans); raia 1P e 2R iniciadores V-CTT1-F e V-CTT1-R; raias 3P e 4R iniciadores V-Kan-F e V-CTT1-R

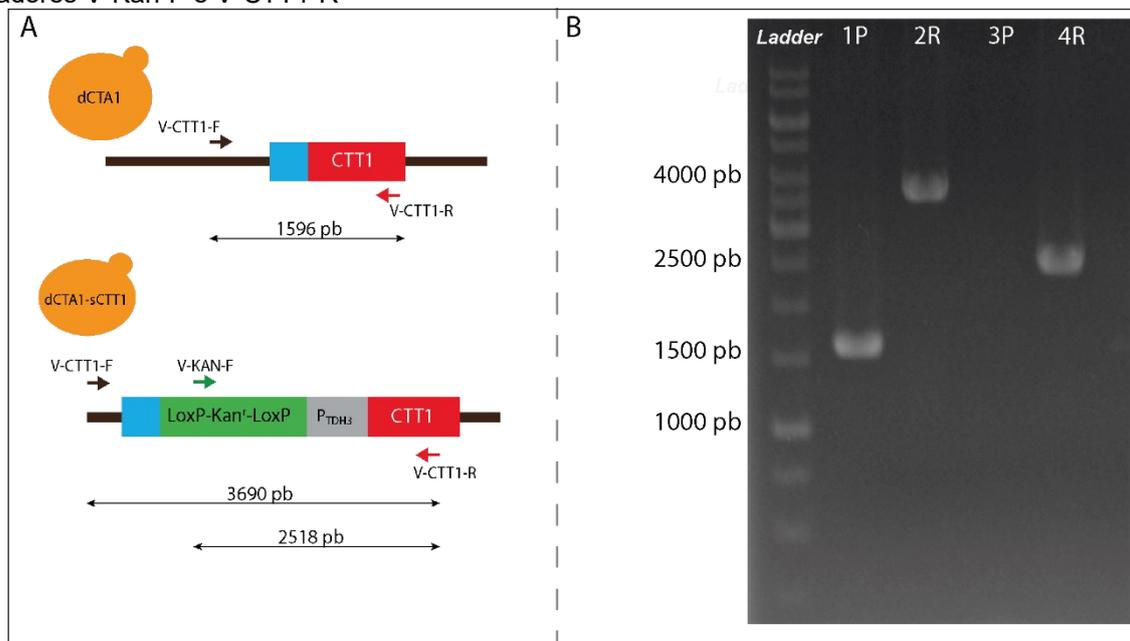
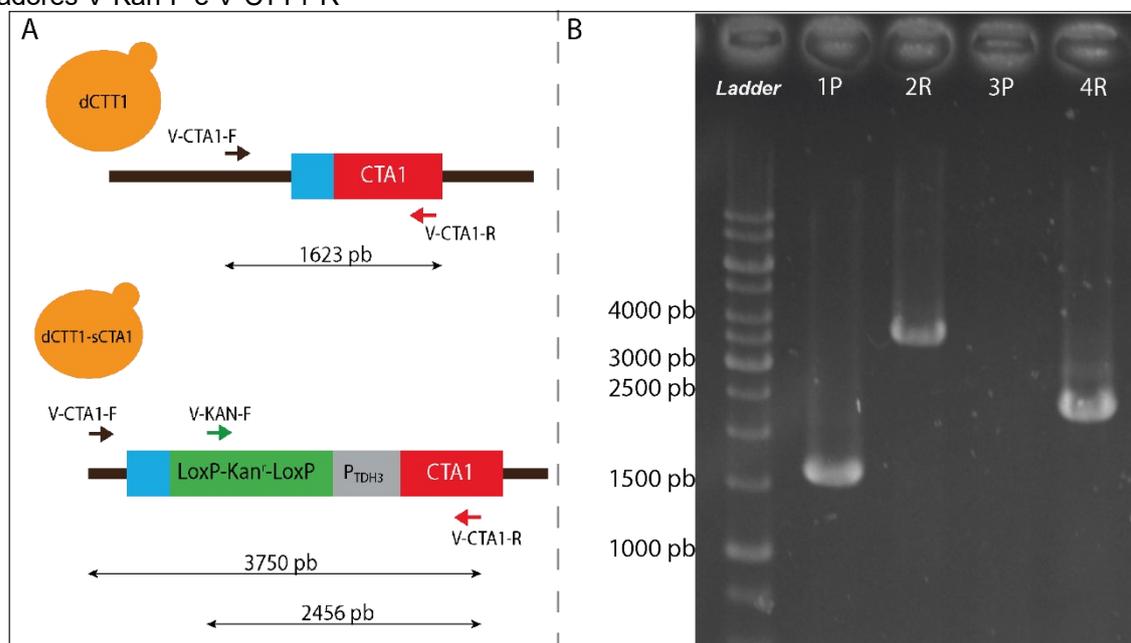


Figura 23 - Confirmação da inserção do módulo de superexpressão na linhagem dCTT1, originando a linhagem dCTT1-sCTA1. Em A: Representação esquemática do anelamento dos iniciadores utilizados bem como o comprimento dos amplificadores. Em B: Eletroforese horizontal em gel de agarose: raia à esquerda (*Ladder* 1 Kb – Fermentans); raia 1P e 2R iniciadores V-CTA1-F e V-CTA1-R; raias 3P e 4R iniciadores V-Kan-F e V-CTT1-R



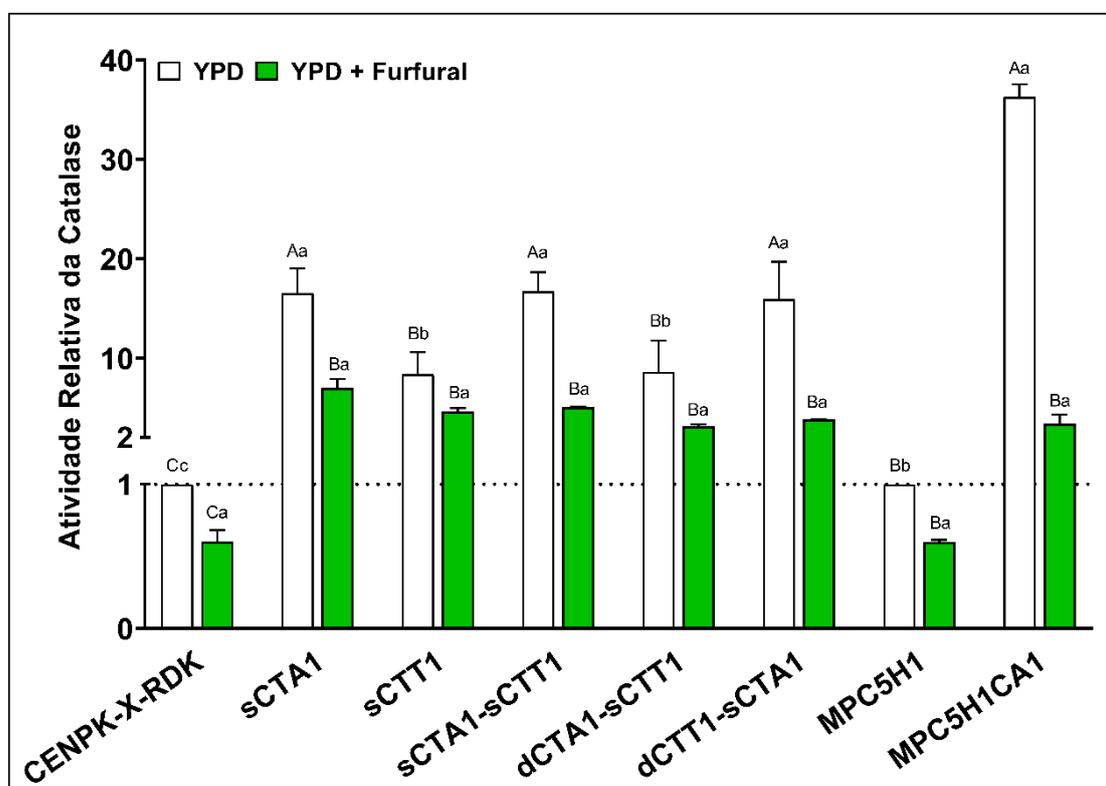
#### 4.5 ATIVIDADE DA(S) CATALASE(S) NAS LEVEDURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

Os níveis da atividade das catalases foram mensurados pela decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em espectrofotômetro utilizando extratos proteicos totais. Vale salientar que foram obtidas duas diferentes amostras para cada extrato celular (sobrenadante e *pellet* após centrifugação de 20000 g) (ver item 3.3). No entanto, a atividade enzimática mensurada, em todas as amostras utilizando os *pellets* foi indetectável (dados não mostrados), embora já se tenha reportado a presença dessa enzima nas mitocôndrias de *S. cerevisiae* em cultivo utilizando glicose (PETROVA et al., 2002) e glicerol (KOLEVA et al., 2014) como fonte de carbono.

Analisando a Figura 24, observa-se que, de fato, a integralização no genoma da levedura do módulo de superexpressão, seja para a catalase A e/ou T, surtiu efeito positivo nos níveis da atividade da catalase detectada nos extratos proteicos totais. Nota-se que, onde o(s) gene(s) *CTA1* e/ou *CTT1* foram superexpressos (linhagens sCTA1, sCTT1, sCTA1-sCTT1, dCTA1-sCTT1 e dCTT1-sCTA1 e MPC5H1CA1), houve aumento da atividade dessa enzima em relação a cepa parental, quando crescidas na presença de glicose. Merecem destaque o aumento de cerca de 15 vezes nas atividades da(s)

catalase(s) das cepas sCTA1, sCTA1-sCTT1 e dCTT1-sCTA1 (se comparadas à parental) e o aumento de aproximadamente 35 vezes na atividade catalase da linhagem MPC5H1CA1 em relação à sua parental (MPC5H1).

Figura 24 - Níveis de atividade relativa da catalase nos sobrenadante dos extratos proteicos totais obtidos das diferentes linhagens crescidas em YPD ou YPD contendo 3,8 g L<sup>-1</sup> de furfural. A diminuição da absorbância a 240 nm foi mensurada nos extratos proteicos totais contendo 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} [\text{mg proteína}]^{-1}$  e normalizados em relação a linhagem parental CENPK-X-RDK para as linhagens laboratoriais ou MPC5H1 para a linhagem industrial. Os ensaios foram realizados em duplicatas biológicas (n=2). As linhas acima de cada barra representam a média  $\pm$  desvio padrão. As letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre as linhagens. Já as letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre as diferentes condições (YPD ou YPD+Furfural). Todas as diferenças foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) considerando linhagens laboratoriais ou industriais separadamente.



Por outro lado, nas linhagens onde os genes *CTA1* e/ou *CTT1* foram deletados, a atividade da catalase foi indetectável (dados não mostrados). Isso aconteceu possivelmente pelo baixo nível de atividade das catalases já na linhagem parental – cepa CENPK-X-RDK ( $33,48 \pm 6,7 \mu\text{mol min}^{-1} [\text{mg proteína}]^{-1}$ ). Dessa forma, quando apenas um dos genes é deletado, resulta em um nível ainda menor da atividade da catalase, não sendo, portanto, detectada pelo método utilizado. Essa hipótese tem suporte no valor da variação da absorbância medida nos ensaios enzimáticos da cepa parental que se mostrou baixo ( $\text{Abs}_{240\text{nm}} = 0,0062$ ). De fato, Dzanaeva et al. (2020) mostraram uma diminuição de 3,6 vezes na atividade da catalase em células de *S. cerevisiae* deletadas

no gene *CTA1* (*cta1Δ*). Considerando essa razão, a variação da Abs<sub>240nm</sub>, para nossas células, sem a catalase codificada pelo gene *CTA1*, por exemplo, seria de aproximadamente 0,001, ou seja, muito próximo do limite de detecção do equipamento utilizado. Sendo assim, o aumento da concentração de proteínas totais, aumentando a concentração de catalase na amostra, poderia ser explorado a fim de melhor analisar essas hipóteses.

Foram determinadas ainda as atividades das catalases nas cepas modificadas geneticamente quando crescidas em meio rico YPD contendo 3,8 g L<sup>-1</sup> de furfural (Figura 23). Conforme se nota nesta figura, todas as linhagens sofreram diminuição da atividade da(s) catalase(s) quando expostas a 3,8 g L<sup>-1</sup> furfural por duas horas, se comparadas àquelas crescidas somente em meio rico YPD. Embora, estatisticamente, sejam diferentes somente as atividades relativas das catalases nas linhagens onde o gene *CTA1* estava superexpresso, como sCTA1, sCTA1-sCTT1 e dCTT1-sCTA1 e MPC5H1CA1. Da mesma figura, importante destacar que, embora a linhagem industrial MPC5H1CA1 apresentou diminuição de aproximadamente 90% na atividade da(s) catalase(s) quando exposta ao furfural, esses níveis ainda foram superiores aos da linhagem parental (MPC5H1).

A engenharia metabólica, genética e evolutiva tem sido utilizada na construção de cepas robustas que resistam, individualmente ou em conjunto, aos inibidores formados nos processos de pré-tratamento (BRANDT et al., 2022; HOPPERT; KÖLLING e EINFALT, 2022; STOVICEK et al. 2022). Nesse sentido, o aumento da expressão gênica é utilizado na construção de leveduras com as mais diversas finalidades. Destacam-se alguns trabalhos utilizando essa estratégia buscando capacitar ou melhorar o consumo de xilose por *S. cerevisiae* (ZHU et al., 2020; LI et al., 2022; COIMBRA et al., 2022) e aumentar a eficiência ou tolerância na produção de etanol (KONG et al., 2021; VARIZE et al., 2022). Nesse cenário, o aumento da expressão de genes ligados à tolerância ao estresse endógeno foi capaz de melhorar a tolerância de *S. cerevisiae* e aumentou a produção de etanol em meio contendo ácido acético, um dos inibidores produzidos dos hidrolisados lignocelulósicos (LAMOUR et al., 2019).

Em relação ao furfural, inibidor alvo deste trabalho, a utilização dessa estratégia foi empregada na construção de linhagens mais tolerantes a este inibidor ou o conjunto de inibidores formados nos processos de pré-tratamento. Por exemplo, Chen et al., 2019 ao superexpressar o gene *YCR102C*, uma quinona oxirredutase, aumentou a tolerância de *S. cerevisiae* e a produção de etanol quando essa levedura é exposta, em conjunto,

aos ácidos acético e fórmico, furfural e HMF. Nesse caminho, Divate et al. (2022) demonstram que a superexpressão de uma aldeído redutase, codificada pelo gene *AR11*, nessa mesma levedura, proporcionou um aumento na taxa de crescimento e na capacidade de produção de etanol quando o furfural estava presente nos meios de cultivo. No entanto, embora a superexpressão gênica tenha sido uma grande aliada, importantes ponderações devem ser feitas.

Conforme descrito anteriormente (ver item 3.2), a construção dos módulos de superexpressão utilizando o  $P_{TDH3}$  foi eleita por ser este um promotor forte e constitutivo, tendo sido utilizado com este propósito em inúmeros plasmídeos<sup>3</sup>. Ainda, conforme relatado acima (item 5.1), levou-se em conta dados publicados por Nambu-Nishida et al. (2018) e Xiong et al. (2018). Esses grupos de pesquisa demonstraram que a atividade de alguns promotores, amplamente utilizados na engenharia genética de leveduras, pode sofrer alterações de acordo com as condições de fermentação e estresse exógeno, como os inibidores. Dessa forma, como um dos objetivos deste trabalho foi a aplicação da(s) linhagem(ns) na produção de etanol 2G, a partir de hidrolisados lignocelulósicos que contém furfural, a escolha do  $P_{TDH3}$  foi realizada visando mitigar o efeito repressor dessas substâncias a outros promotores da levedura.

De fato, conforme se mostrou na Figura 24, a utilização dos módulos de superexpressão contendo o  $P_{TDH3}$  aumentou o nível da atividade da(s) catalase(s) quando essas foram crescidas em meio YPD ou YPD contendo furfural, corroborando com a correta integração desses módulos nos genomas dessas linhagens, permitindo uma maior atividade enzimática. Por outro lado, a redução dos níveis da atividade da(s) catalase(s), quando crescidas em meio YPD contendo furfural, se comparadas ao meio sem a presença desse inibidor, possivelmente foi reflexo da diminuição da força do promotor utilizado ( $P_{TDH3}$ ) ou a inibição da atividade dessa enzima pelo aldeído.

Nessa esteira, alguns pesquisadores já demonstraram a diminuição da força desse promotor quando as células de *S. cerevisiae* foram crescidas em sacarose ou galactose (PENG et al., 2015), embora na presença de glicose ou xilose a força se mantinha alta (NAMBU-NISHIDA et al., 2018). Ainda, Xiong et al. (2018) relataram a diminuição de, aproximadamente, 30% na força do  $P_{TDH3}$  em cultivos de *S. cerevisiae*, por 36 h, contendo 1,0 g L<sup>-1</sup> de furfural e glicose como fonte de carbono, se comparados

---

<sup>3</sup> Em pesquisa à base <https://www.addgene.org/> foram encontrados mais de 300 plasmídeos contendo este promotor.

aos cultivos sem esse inibidor. Os mesmos autores demonstraram uma variabilidade na intensidade dos promotores dos genes *PGK1*, *ADH1* e *TEF1* – considerados constitutivos, quando expostos a estresses dos inibidores ácido acético ou furfural ou quando a xilose está presente nos meios de cultivo. Dessa forma, o  $P_{TDH3}$  foi escolhido levando em consideração ser esse o promotor que teve menor variabilidade na presença de furfural ou quando xilose estava presente no meio de cultivo.

Nesse sentido, nossos resultados revelam uma diminuição da(s) atividade(s) catalase(s), que variam de 45 a 76% para as linhagens laboratoriais e de até 90% na linhagem industrial MPC5H1CA1 (Figura 24), quando as células foram expostas ao furfural. Importante notar que essa linhagem recebeu o módulo de superexpressão nas duas cópias do gene *CTA1* (vide Figura 18). Além disso, a discrepância entre os perfis de diminuição da atividade da catalase, nas linhagens laboratoriais e a industrial recombinante, pode ser explicada pelos diferentes genótipos entre elas. Isso porque, de um lado as linhagens laboratoriais são haploides e, de outro, a linhagem industrial é diploide (ver Tabela 1). Nesse caminho, vários grupos de pesquisa têm demonstrado diferenças no genoma, transcriptoma e proteoma de leveduras industriais e laboratoriais (STAMBUK et al. 2009; NIJKAMP et al., 2012; MATSUSHIKA, GOSHIMA e HOSHINO, 2014; CHATSURACHAI et al., 2020; RÁCZ et al. 2021; YATABE et al. 2022). Ainda, Sardi et al. (2016) relataram que a superexpressão de um gene resulta em fenótipos diferentes em linhagens de *S. cerevisiae*. Mais recente, Mertens et al. (2020) evidenciaram que a superexpressão de um fator de transcrição ligado ao estresse (Yap1), em alguns casos melhorou a tolerância ao furfural ou HMF, porém, em outras linhagens piorou a tolerância a esses inibidores.

Portanto, embora alguns pesquisadores tenham demonstrado aumento nos níveis de expressão de alguns genes ligados ao distresse oxidativo (revisado por MENEGON, GROSS e JACOBUS, 2022; LIU e ZHAO, 2022), incluindo os genes *CTT1* e *CTA1* (THOMPSON et al. 2016; LIU e MA, 2020), quando *S. cerevisiae* é exposta ao furfural, nenhum desses trabalhos demonstrou a atividade das catalases, ficando essas constatações limitadas aos níveis transcricionais. Ademais, Blevins et al. (2019) relataram que, com exceção de um pequeno grupo de genes envolvidos na manutenção do estado REDOX (não incluindo as catalases), quando *S. cerevisiae* está sob alto estresse oxidativo (1,5 mM de  $H_2O_2$ ), a modulação da síntese proteica é, em grande parte, alterada pela quantidade de ribossomos, e não pelo aumento da quantidade de mRNA.

Dessa forma, a confirmação da hipótese que houve a diminuição dos níveis transcricionais dos genes e consequente da força do promotor, ou a inibição da atividade da enzima, tanto nas linhagens laboratoriais como nas industriais, é passo primordial para, em conjunto com os resultados desse trabalho, se obter uma resposta concisa da influência do furfural nas catalases.

#### 4.6 O PAPEL INIBIDOR DO FURFURAL NA(S) ATIVIDADE(S) DA(S) CATALASE(S) *in vitro*

Conforme se mostrou na Figura 23 houve a diminuição na(s) atividade(s) da(s) catalase(s) nos extratos proteicos das linhagens crescidas na presença de furfural. A fim de investigar se há, de fato, uma inibição dessa(s) enzima(s), realizou-se ensaios contendo furfural nos meios reacionais (ver item 3.3) e os resultados estão mostrados na Figura 24.

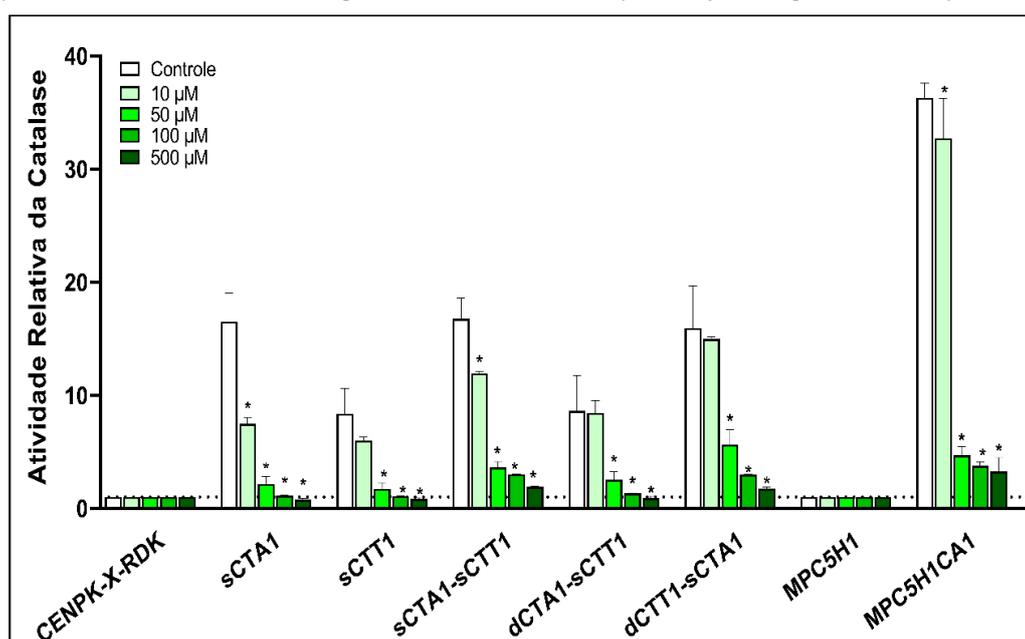
Analisando a figura, nota-se que, para todas as linhagens os níveis da(s) atividade(s) da(s) catalase(s) diminuíram com o aumento da concentração de furfural no meio reacional. Destacam-se as linhagens sCTT1, dCTA1-sCTT1 e dCTT1-sCTA1 que, somente após a adição de 50  $\mu$ M de furfural, apresentaram diferença significativa na atividade da catalase, em relação ao ensaio controle sem a presença desse inibidor. Esses resultados indicam dose-dependência entre a atividade da enzima e a concentração de furfural, *in vitro*.

Ainda, como forma de avaliar o efeito inibitório do furfural nesse ensaios *in vitro*, foi calculado o IC<sub>50</sub> para cada linhagem conforme descrito no item 3.3 e esses resultados estão mostrados na Figura 26.

Analisando a Figura 26 nota-se que os valores de IC<sub>50</sub> para todas as linhagens laboratoriais não variaram significativamente em relação à cepa parental, embora se observe uma tendência na diminuição desses valores para as linhagens sCTA1 e sCTA1-sCTT1. Por outro lado, nas linhagens industriais, foi possível observar diferença significativa, no IC<sub>50</sub>, entre a linhagem MPC5H1CA1 e a sua parental *wild-type*, a linhagem MPC5H1. Importante notar também que essas cepas apresentaram os maiores IC<sub>50</sub>, indicando que, *in vitro*, maiores concentrações de furfural são necessárias para inibir a(s) atividade(s) da(s) catalase(s) nessas linhagens. Em contraste, os dados já apresentados na Figura 24, *in vivo*, mostram que essa foi a cepa que apresentou maior

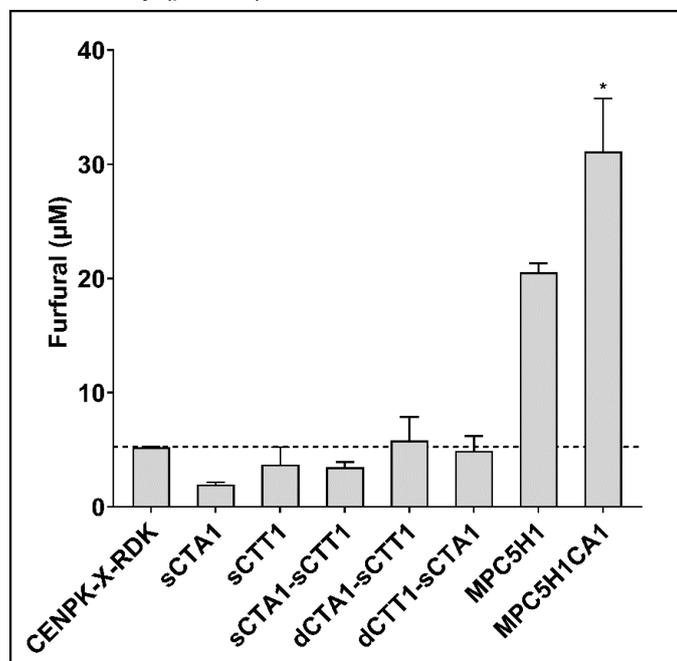
redução da atividade da catalase quando exposta a 3,8 g L<sup>-1</sup> de furfural se comparada aos ensaios sem esse inibidor.

Figura 25 - Níveis de atividade relativa da catalase utilizando sobrenadante de extratos proteicos totais obtidos das diferentes linhagens crescidas em YPD. A diminuição da absorbância a 240 nm foi mensurada nos extratos proteicos totais contendo 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e diferentes concentrações de furfural. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} [\text{mg proteína}]^{-1}$  e normalizados em relação a linhagem parental CENPK-X-RDK, para as linhagens laboratoriais, ou MPC5H1 para a linhagem industrial. Os ensaios foram realizados em duplicatas biológicas (n=2). As linhas acima de cada barra representam a média  $\pm$  desvio padrão. O asterisco representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ), realizada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnett, em relação ao ensaio controle (sem a presença de furfural)



No entanto, atividades de algumas enzimas podem variar *in vitro* e *in vivo* em *S. cerevisiae* (RAJKUMARI et al. 2018; NICKENS, SAUSEN e BOCHMAN, 2019), advindo da própria divergência entre o ambiente reacional ideal (*in vitro*), e a maquinaria celular. Além disso, a concentração do furfural presente nos compartimentos celulares ainda é desconhecida, o que poderia explicar essa divergência. Entretanto, furfural causa instabilidade genômica em células de *S. cerevisiae*, acarretando quebras da dupla-fita de DNA *in vivo*, o que não ocorre *in vitro* (QI et al., 2019). Os mesmos autores atribuem esse fato ao aumento dos níveis de ERO causados pela exposição ao furfural e, como consequência, afirmam que essas quebras são dependentes do metabolismo celular, ao contrário da interação direta do furfural com o DNA. Portanto, esse fenômeno pode dar suporte as divergências dos resultados apresentados *in vivo* e *in vitro*.

Figura 26 - Concentração média inibitória de 50% da atividade da(s) catalase(s) ( $IC_{50}$ ), *in vitro*. Os valores de  $IC_{50}$  foram calculados de acordo com equações de regressão não linear tipo dose-resposta. A linha horizontal no gráfico indica o valor inibitório para a linhagem CENPK-X-RDK. Os ensaios foram realizados em duplicatas biológicas (n=2) e as linhas acima de cada barra representam a média  $\pm$  desvio padrão. O asterisco indica a diferença significativa em relação à cepa parental MPC5H1, realizada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ )



Nesse sentido, recentemente, Veerabhadrapa et al. (2021) demonstram que células de *S. cerevisiae* na ausência de algumas proteínas e um fator de transcrição, envolvidos nos processos de reparo ao DNA (células *mre11Δ*, *sgs1Δ* e *sub1Δ*), foram mais sensíveis ao estresse oxidativo e tiveram aumento nos níveis de espécies reativas, corroborando os dados de Qi et al. (2019) expostos acima.

Dessa maneira, apesar da aparente diferença entre os resultados *in vitro* e *in vivo* nos níveis das catalases das nossas linhagens, a mensuração desses níveis é fundamental para, em conjunto com os dados já apresentados, se obter uma resposta mais robusta da tolerância do furfural pelas linhagens de *S. cerevisiae*.

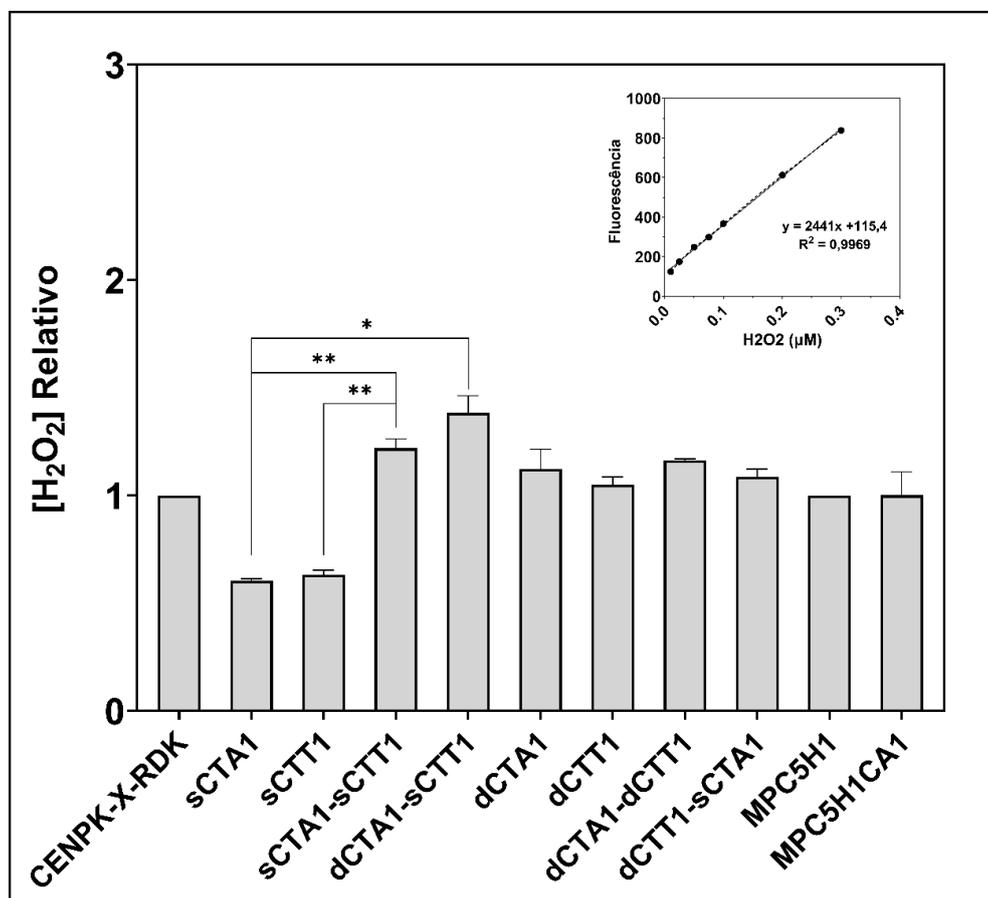
#### 4.7 NÍVEIS INTRACELULARES DE $H_2O_2$ E DE ESPÉCIES REATIVAS (ER)

Conforme relatado por Allen et al. (2010), Ask et al. (2013) e López et al. (2021), a exposição de *S. cerevisiae* ao furfural induz o acúmulo de espécies reativas nessas células. Dessa forma, como este trabalho utilizou estratégias de superexpressão e/ou deleção das catalases, foi necessário realizar a mensuração dos níveis intracelulares desses radicais livres e de  $H_2O_2$  quando presente esse aldeído no meio de cultivo. Essas

mensurações foram realizadas utilizando a sonda fluorescente DCF-DA e o Kit Amplex Red® (ver itens 3.5 e 3.6, respectivamente) e os resultados desses ensaios estão dispostos na Figura 26.

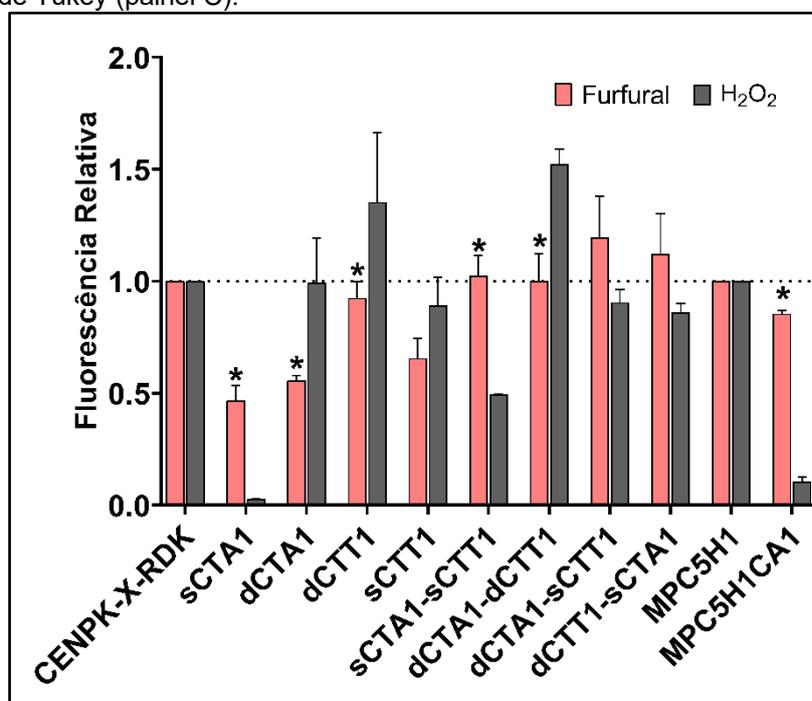
Da análise da Figura 27 é possível observar que onde as catalases foram superexpressas isoladamente, cepas sCTA1 e sCTT1, houve a diminuição das concentrações de peróxido de hidrogênio nos sobrenadantes dos extratos celulares. Inesperadamente, na linhagem onde ambas catalases estão superexpressas, cepa sCTA1-sCTT1, houve um ligeiro aumento do nível de  $H_2O_2$ . O mesmo ocorreu nas linhagens onde houve a simples ou dupla deleção, cepas dCTA1, dCTT1, dCTA1-dCTT1, dCTA1-sCTT1, sCTT1-dCTA1. Contudo, na linhagem industrial onde a catalase A foi superexpressa, cepa MPC5H1CA1, não foi possível observar diferença significativa em relação à linhagem parental (cepa MPC5H1).

Figura 27 - Níveis intracelulares de  $H_2O_2$  mensurados através do Kit Amplex Red®. As células foram expostas a furfural ( $3,8 \text{ g L}^{-1}$ ) por duas horas e o sobrenadante dos extratos proteicos utilizados para essa mensuração. Os ensaios foram realizados em duplicatas biológicas ( $n=2$ ). As linhas acima de cada barra representam a média  $\pm$  desvio padrão. As concentrações de  $H_2O_2$  foram determinadas utilizando-se uma curva padrão e normalizadas em relação a linhagem parental CENPK-X-RDK, para as linhagens laboratoriais, ou MPC5H1 para a linhagem industrial. Os asteriscos representam a diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ) realizadas pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey



Por outro lado, como mostrado na Figura 28, observa-se que, quando as células foram expostas ao furfural, os níveis de distresse estavam menores na maioria das linhagens, se comparadas à linhagem controle (CENPK-X-RDK), apesar de que a significância estatística só foi observada na linhagem sCTA1 que mostrou diminuição desses níveis. No entanto, se nota que nas linhagens dCTA1 e sCTT1, houve nítida diminuição nesses níveis, embora não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Nesse caminho, a linhagem recombinante MPC5H1CA1 também não apresentou diferença significativa dos níveis de ER em relação a parental (cepa MPC5H1). Por outro lado, à exceção da linhagem dCTA1, houve aumento dos níveis de ER nas leveduras recombinantes sem a presença de pelo menos uma das catalases (cepas dCTT1, dCTA1-dCTT1, dCTA1-sCTT1, e dCTT1-sCTA1).

Figura 28 - Níveis intracelulares de espécies reativas medidos através da sonda DCF-DA. As células foram expostas a furfural ( $3,8 \text{ g L}^{-1}$ ) ou a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) por duas horas. DCF-DA após penetrar nas células é hidrolisado por esterases que, em contato com espécies reativas, forma DCF – um composto fluorescente. Os ensaios foram realizados em duplicatas biológicas ( $n=2$ ). As linhas acima de cada barra representam a média  $\pm$  desvio padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa ( $p<0,05$ ) para a mesma linhagem, em relação aos dois tratamentos. Essas diferenças foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (painel C).



Ainda avaliando a Figura 28, onde as células foram expostas ao peróxido de hidrogênio, os níveis de ER foram menores, significativamente, nas linhagens sCTA1, sCTA1-sCTT1 e MPC5H1CA1. Destacam-se as linhagens onde a superexpressão da

catalase *CTA1* aconteceu de forma isolada, tanto na cepa laboratorial, quanto na industrial, onde os níveis de ER diminuíram 98 e 90%, respectivamente. Noutra norte, na linhagem onde ambas as catalases estavam ausentes, cepa dCTA1-dCTT1, houve aumento significativo dos níveis de ER, embora, nota-se que onde apenas a catalase CTT1 foi deletada, houve também um aumento desses níveis.

Analisando os dados em conjunto é possível constatar que, a superexpressão isolada da catalase *CTA1*, embora tenha diminuído os níveis de ER drasticamente, quando as células são expostas ao peróxido de hidrogênio, isso não ocorreu com a exposição ao furfural, ainda que esses níveis tenham sido menores em relação a linhagem parental. Dessa maneira, também, foi o que ocorreu na cepa onde ambas as catalases foram superexpressas (sCTA1-sCTT1). Contudo, nas linhagens dCTA1, dCTT1 e dCTA1-dCTT1, os níveis de ER diminuíram quando as células são submetidas ao furfural se comparadas ao peróxido de hidrogênio. Interessantemente, ao superexpressar as duas catalases os níveis de ER com furfural são superiores se comparados àqueles em peróxido (cepa sCTA1-sCTT1).

Em relação a exposição ao furfural, esses resultados, aparentemente, não mostram um padrão de comportamento dos níveis de ER, diferente do que ocorre com a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Portanto, os resultados nas células com distresse causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicam que o aumento da atividade dessas enzimas possibilitou a detoxificação desse peróxido de forma mais rápida, enquanto a ausência delas, retardou a remediação desse distresse, corroborando dados neste trabalho (Figura 24) e de outros grupos de pesquisa (OKADA, OGAWA e SHIMA, 2014; RIVEIRO et al., 2015; DZANAEVA et al., 2020).

As células, como parte do seu metabolismo aeróbio, geram naturalmente espécies reativas, em especial de oxigênio (ERO). Essas ERO podem danificar macromoléculas como proteínas, lipídeos e até o DNA (AYER et al. 2013). No entanto, as células possuem sistemas de defesas antioxidantes para combatê-los. Um desses sistemas é através de enzimas antioxidantes, dentre elas a catalase (vide item 1.5). Além disso, o aumento da transcrição dos genes que codificam enzimas antioxidantes parece necessário para a tolerância de *S. cerevisiae* em condições de estresse (SARDI et al., 2013; THOMAS et al., 2022). Dessa forma, a expressão forte e constitutiva das catalases poderia contribuir para diminuir os efeitos deletérios das ER, como as causadas pelo furfural. Nesse sentido, embora os níveis de ER foram menores nas cepas onde a(s)

catalase(s) estava(m) superexpressa(s), isso não ocorreu com todas as linhagens na presença de furfural (Figura 28).

Em consonância, Fernandes et al. (2007) demonstraram que células deletadas na catalase *CTT1* (células *ctt1Δ*) tiveram ligeira diminuição dos níveis de oxidação intracelular embora não se tornaram mais tolerantes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainda, Nishimoto et al. (2016) sugeriram que, após deleção da catalase *CTA1* (células *cta1Δ*), ocorre maior tolerância ao estresse, causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que há indução na produção da catalase T (codificada pelo gene *CTT1*).

No entanto, conforme relatado anteriormente, não foi possível detectar atividade das catalases em células *cta1Δ*, embora analisando as Figuras 27-B e 27-C, esses dados nos mostram uma diminuição dos níveis de ER quando as células são expostas ao furfural. Nesse caminho, a deleção da catalase *CTA1* ou *CTT1* aumenta o tempo de vida de *S. cerevisiae* em exposição ao estresse causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Isso ocorre devido a um mecanismo compensatório, da falta dessa peroxidase, com o aumento da produção da superóxido dismutase (MESQUITA et al., 2010; SJ et al., 2019). Corroborando, Petrova e Kujumdzieva (2014) indicam que células *cta1Δ* ou *ctt1Δ* possuem mecanismos compensatórios nos sistemas de defesas antioxidantes. Recentemente Canedo-Santos et al. (2022) demonstraram a diminuição intracelular dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mesmo em células *ctt1Δ*. A propósito, Okada e Shima (2014) identificaram 331 genes envolvidos na hipersensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicando que os mecanismos antioxidantes das células são complexos.

Dessa forma, a diminuição dos níveis intracelulares de ER da linhagem dCTA1 possivelmente ocorreu devido a ativação de outros mecanismos de defesas antioxidantes, que não a catalase peroxissomal. Essas implicações poderiam, por exemplo, ser confirmadas avaliando os outros sistemas de defesas antioxidantes.

Noutro norte, a utilização de DCF-DA para mensurar espécies reativas de oxigênio vem sendo criticada tendo em vista que essa sonda não deve ser utilizada exclusivamente como um indicador de estresse oxidativo, em especial como um indicador direto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KALYANARAMAN et al., 2012; GARDINER et al., 2020; MURPHY et al., 2022). As reações redox que ocorrem com DCF-DA são complexas e algumas limitações devem ser observadas. O Citocromo c, proteína heme que é liberada no citosol durante a apoptose, é capaz de oxidar DCF-DA (BURKITT e WARDMAN, 2001). Os radicais intermediários dessa sonda podem reagir rapidamente com O<sub>2</sub>

formando  $O_2^-$  (radical superóxido) que por sua vez, por reação de dismutação, gera  $H_2O_2$  adicional (FOLKES et al., 2009). Além disso, os níveis de fluorescência, medidos utilizando DCF-DA podem não ser lineares com o aumento de  $H_2O_2$  (KALYANARAMAN et al., 2012; BRANDES, REZENDE e SCHRÖDER, 2018; KOWALTOWSKI, 2019). Portanto, embora acessível, essa sonda deve ser utilizada com cautela para realizar afirmações do estado redox das células.

À vista disso, nossos resultados indicam que, nas linhagens laboratoriais construídas, embora a superexpressão isolada de uma das catalases diminui os níveis de  $H_2O_2$  (Figura 27) e ER (Figura 28) a superexpressão de ambas numa mesma linhagem não auxilia na redução desses níveis. Por outro lado, os níveis de ER não apresentaram diferenças nas linhagens industriais utilizadas, indicando que esses resultados são dependentes da estirpe. Dessa forma, os mecanismos específicos que induzem o acúmulo de ER, por furfural, em *S. cerevisiae*, permanecem incertos e precisam ser melhor investigados (ALLEN et al., 2010; ASK et al., 2013; LÓPEZ et al., 2021). De igual forma, os fenótipos apresentados por essas linhagens na presença ou ausência do furfural também devem ser alvos de investigação.

#### 4.8 CRESCIMENTO CELULAR EM MICROESCALA E COFERMENTAÇÃO EM BATELADA SIMPLES

Conforme visto nos itens anteriores deste trabalho, nas cepas sCTA1 e sCTT1, onde a(s) catalase(s) foram superexpressas isoladamente, ocorreu o aumento do nível da atividade dessa enzima (Figura 24) e diminuição dos níveis de  $H_2O_2$  (Figura 27) e de ER (Figura 28), quando expostas ao furfural. Nesse sentido, avaliar o perfil de crescimento celular e cofermentação dessas células é de suma importância para estimar os impactos dessas modificações genéticas no fenótipo dessas linhagens.

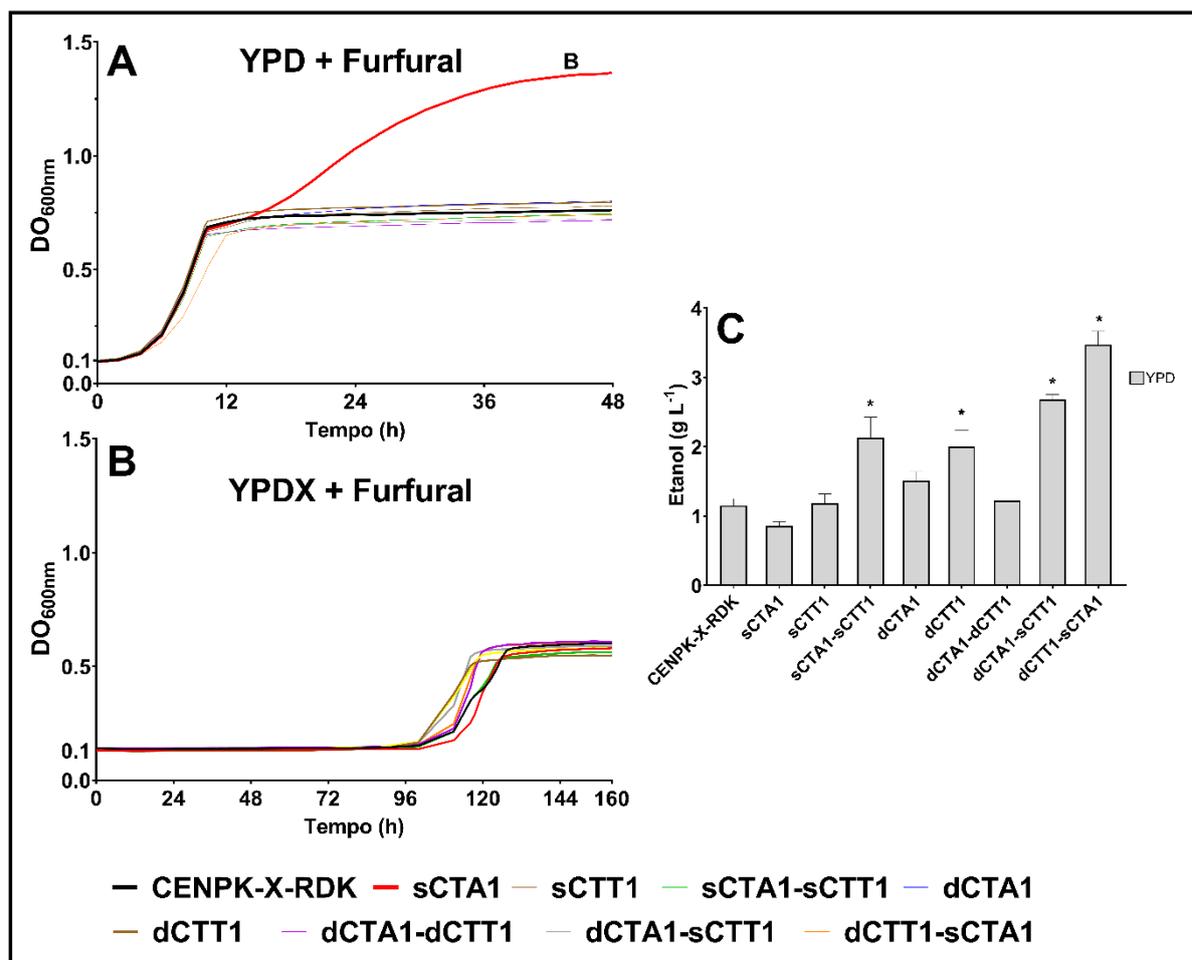
Inicialmente, a fim de realizar um possível *screening*, as nove linhagens construídas foram submetidas a crescimento celular em microescala (item 3.6) e posterior quantificação do etanol produzido. Na Figura 29 observa-se que todas as linhagens apresentaram um perfil de crescimento celular e fase adaptativa (fase *lag*), muito semelhante em relação a linhagem parental (CENPK-X-RDK), à exceção da linhagem onde o gene *CTA1* foi superexpresso isoladamente (cepa sCTA1). Embora essa linhagem tenha apresentado um perfil cinético semelhante às demais nas primeiras 12 h de crescimento, ao final, a sua concentração celular foi cerca de duas vezes maior

que as demais linhagens (Figura 29-A). Por outro lado, na quantificação do etanol produzido, após 48 h de ensaio, observou-se que o perfil da produção deste metabólito foi diversificado nas diferentes linhagens (Figura 28-C) embora, como dito anteriormente, o crescimento celular delas tenha sido semelhante. Nesse sentido, observa-se na mesma figura, que a linhagem onde ambas catalases foram superexpressas (cepa sCTA1-sCTT1) os níveis de etanol foram significativamente superior (cerca de duas vezes) quando crescidas em meio rico YPD e furfural. Esse aumento na produção de etanol também pode ser observado nas linhagens dCTT1, dCTA1-sCTT1 e dCTT1-sCTA1. Portanto, embora não se vejam claras diferenças nos crescimentos celulares entre essas linhagens, à exceção da cepa sCTA1, é possível notar a influência da(s) catalase(s), em *S. cerevisiae*, quando presente o inibidor furfural.

Destaca-se a cepa onde houve superexpressão no gene *CTA1*. Por um lado, a linhagem sCTA1 apresentou um maior crescimento celular (Figura 29-A), por outro, teve a menor produção de etanol (Figura 29-B). Essa constatação pode ser explicada pela capacidade de remediação dos danos causados pelo furfural nessa linhagem. Isso porque, conforme exposto anteriormente, essa foi a estirpe que teve os menores níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ER (Figura 27). Nesse sentido, ao realizar engenharia evolutiva de *S. cerevisiae*, JUNG et al. (2017) constataram que linhagens evoluídas, sob cultivo em furfural, apresentaram níveis elevados de metabólitos relacionados à geração de energia, regeneração de cofatores e recuperação de danos celulares, esse último já relatado por ALLEN et al. (2020) e LÓPEZ et al. (2021) como resultado do aumento de ER intracelular.

Em outra perspectiva, ao analisar os perfis cinéticos das linhagens testadas, quando o meio de cultivo era composto, além de glicose, por xilose e furfural (Figura 29-B), nota-se que a fase *lag* de todas as estirpes foram maiores em relação aos crescimentos onde a glicose era a única fonte de carbono. Dessa maneira, enquanto nos meios contendo apenas glicose e furfural essa adaptação ocorreu em, aproximadamente 6 h (Figura 29-A), quando a xilose também estava presente passou a ser em torno de 96 h (Figura 29-B).

Figura 29 - Cinética de crescimento celular em microescala e produção final de etanol. Os ensaios de crescimento celular foram realizados em meios ricos YP contendo 40 g L<sup>-1</sup> de glicose (painel A), ou 40 g L<sup>-1</sup> de glicose mais 20 g L<sup>-1</sup> de xilose (painel B). Em ambos os ensaios foram adicionados 3,8 g L<sup>-1</sup> de furfural. A produção final de etanol em meio rico YPD está expressa no painel C e a produção de etanol em meio rico YPDX foi nula para todas as linhagens (dados não mostrados). Os ensaios foram realizados em duplicatas biológicas (n=2) e apresentadas as médias (painéis A e B). As linhas acima de cada barra representam a média ± desvio padrão e os asteriscos representam diferença significativa, em relação a cepa controle (CENPK-X-RDK) realizadas pela análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnett (painel C)



Nesse caminho, diversos trabalhos já têm relatado o aumento da fase adaptativa da levedura *S. cerevisiae*, na presença de furfural em meios sintéticos contendo glicose ou xilose como fonte de carbono (LI et al., 2019; DIVATE et al., 2022) ou em hidrolisados lignocelulósicos (COLA et al., 2020; WANG et al., 2022). Isso ocorre até que as concentrações desse inibidor diminuam a ponto de permitir a volta do crescimento celular e/ou a fermentação (DIVATE et al., 2022; WANG et al., 2022). Ainda, na presença de xilose e furfural *S. cerevisiae* tem menores rendimentos de etanol (JIN et al., 2013; HASUNUMA et al., 2014; UNREAN et al., 2018; revisado por GUO et al., 2022). Essa constatação também já foi relatada em outras leveduras, como *Spathaspora arborariae*

(CAMPOS et al., 2022) e *Spathaspora passalidarum* (SOARES et al., 2020). Igualmente, nosso grupo de pesquisa já reportou o aumento da fase *lag* e a diminuição da produção de etanol em diversas linhagens do gênero *Spathaspora*, *Candida* e uma linhagem de *Kluyveromyces marxianus* quando a fonte de carbono era glicose ou xilose, ambas na presença de furfural (ZANELLA, 2018). Nesse caminho, o mesmo trabalho, demonstrou que a fase *lag* dessas leveduras foram, em geral, mais afetadas quando os meios de cultivos continham furfural e a xilose era a única fonte de carbono.

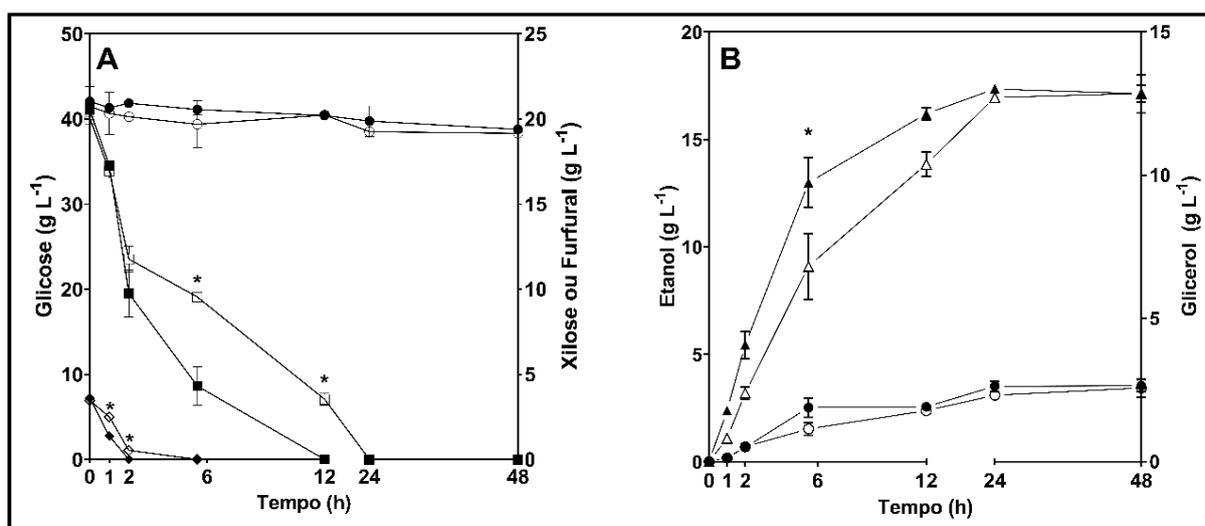
Essas constatações já foram citadas como efeito inibitório do furfural, conforme discutido anteriormente e, também, porque xilose é reconhecida por *S. cerevisiae* como fonte de carbono não fermentável (OSIRO et al, 2018; DOBRESCU et al., 2021). Isso ocasionaria maior produção de glicerol pela regulação de genes envolvidos no ciclo do ácido tricarbóxico (ALFF-TUOMALA, et al, 2016; DOBRESCU et al, 2021). Portanto, propõe-se, que a capacidade reduzida das nossas linhagens em crescer nos meios contendo glicose, xilose e furfural (Figura 28-A e 28B) aliada a aparente incapacidade de produção de etanol nessa condição, se deu pela produção de glicerol ao contrário de etanol, embora não tenhamos mensurado esses níveis de glicerol ao final do crescimento.

Vale salientar, também, que foram realizados crescimentos em microescala com as mesmas linhagens utilizando meios YP contendo apenas 20 g L<sup>-1</sup> xilose como fonte de carbono e adicionados de furfural, conforme descrito anteriormente (item 3.6). No entanto, em nenhum dos ensaios foi possível observar crescimento celular mesmo após 160 h de cultivo (dados não mostrados). Da mesma forma, não houve produção de etanol nessas condições (dados não mostrados).

Posteriormente, foram realizados ensaios de cofermentação em batelada simples, em meios ricos YP, conforme detalhado anteriormente no item 3.7. Resumidamente, as cofermentações foram realizadas em meios YP contendo 40 g L<sup>-1</sup> de glicose e 20 g L<sup>-1</sup> de xilose adicionados de 3,8 g L<sup>-1</sup> de furfural, com concentração celular inicial de aproximadamente 2,7 g L<sup>-1</sup>. Como é possível observar na Figura 30-A a linhagem sCTA1 consumiu glicose mais rapidamente do que a linhagem parental, esgotando essa fonte de carbono com 12 h de ensaio. De fato, a velocidade de consumo desse açúcar em 12 h de ensaio, para a linhagem recombinante, foi de 3,42 ± 0,10 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> enquanto para a linhagem parental foi de 2,75 ± 0,12 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, ou seja, aproximadamente 25% maior (Tabela 3). Por outro lado, ao final do ensaio fermentativo, não houve diferença na produtividade volumétrica de etanol. Verifica-se, ainda na

mesma figura, que o furfural foi detoxificado pela linhagem recombinante com maior rapidez do que a cepa parental. Isso se refletiu em uma maior produção de etanol por essa linhagem, entre duas e 12h, em comparação com a linhagem parental.

Figura 30 - Cofermentação em batelada simples das linhagens CENPK-X-RDK (símbolos abertos) e sCTA1 (símbolos fechados) em meios ricos YP contendo  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glicose e  $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilose acrescidos de  $3,8 \text{ g L}^{-1}$  de furfural. Em A: perfil de consumo de glicose (quadrados) e xilose (círculos) bem como desaparecimento do furfural (losangos). Em B: produção de etanol (triângulos) e glicerol (círculos). Os dados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes e os asteriscos indicam a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) realizada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey



É importante ressaltar que as cofermentações foram realizadas para todas as linhagens construídas, não observando diferenças significativas na velocidade do consumo de glicose (Figura 31-A) ou xilose (dados não mostrados) e na produção de etanol a partir de glicose (Figura 31-B), à exceção da recombinante sCTA1 conforme relatado acima. A partir dessas constatações, optou-se em prosseguir o trabalho utilizando somente a linhagem onde o gene *CTA1* foi superexpresso (cepa sCTA1). Da mesma maneira, a modificação genética realizada na linhagem industrial foi apenas a superexpressão do gene *CTA1* (cepa MPC5H1CA1).

Embora a diferença no consumo de glicose, pela cepa sCTA1, se deu em meio de cultivo contendo furfural, analisou-se a fermentação desse carboidrato sem a presença do inibidor e, de fato, a modificação genética não afetou o consumo de glicose nessa condição (Apêndice A). Por outro lado, a produção de etanol durante a cofermentação na presença de furfural pela linhagem dCTA1 foi menor do que nas outras linhagens (Figura 31-B). Esses resultados, reforçam nossa hipótese que a estirpe sCTA1 somente teve um melhor desempenho quando na presença de furfural e, provavelmente,

pela sua melhor capacidade de remediar os efeitos do furfural e das ER geradas, corroborando com dados já apresentados neste trabalho (Figuras 26 e 27).

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos das cofermentações em meios rico (MR) ou hidrolisado hemicelulósico (HH), pelas cepas CENPK-X-RDK, sCTA1, MPC5H1 e MPC5H1CA1. Na tabela: \* calculado até 12 horas; \*\* calculado até duas horas; \*\*\* calculado até seis horas; † calculado até 5,5h e †† calculado até seis horas. MS: meio sintético; HH: hidrolisado hemicelulósico. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey

| <b>Linhagem</b>    | <b>Condição</b> | <b>Vi</b>                   | <b>Q</b><br><b>(g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b> | <b>Y</b><br><b>(g g<sup>-1</sup>)</b> |
|--------------------|-----------------|-----------------------------|--|---------------------------------------|
| <b>CENPK-X-RDK</b> | MR              | 2,75 ± 0,12 <sup>a*</sup>   | 1,653 ± 0,28 <sup>a†</sup>                           | 0,41 ± 0,00 <sup>a</sup>              |
| <b>sCTA1</b>       | MR              | 3,42 ± 0,10 <sup>a*</sup>   | 2,361 ± 0,21 <sup>a†</sup>                           | 0,40 ± 0,01 <sup>a</sup>              |
| <b>MPC5H1</b>      | MR              | 3,38 ± 1,26 <sup>a**</sup>  | 2,42 ± 0,30 <sup>a††</sup>                           | 0,40 ± 0,01 <sup>a</sup>              |
|                    | HH              | 5,91 ± 1,30 <sup>a**</sup>  | 2,53 ± 0,34 <sup>a††</sup>                           | 0,44 ± 0,01 <sup>a</sup>              |
| <b>MPC5H1CA1</b>   | MR              | 4,85 ± 0,63 <sup>a***</sup> | 2,64 ± 0,00 <sup>a††</sup>                           | 0,40 ± 0,01 <sup>a</sup>              |
|                    | HH              | 5,33 ± 0,99 <sup>a***</sup> | 2,48 ± 0,39 <sup>a††</sup>                           | 0,47 ± 0,03 <sup>b</sup>              |

Nota: Vi: Velocidade inicial de consumo dos açúcares; Q: Produtividade volumétrica de etanol; Y: Fator de rendimento do processo fermentativo.

Foram realizadas também fermentações com as linhagens industriais (cepas MPC5H1 e MPC5H1CA1), em meios de cultivo sintéticos contendo glicose, xilose e furfural (Figura 32) e em hidrolisado hemicelulósico (Figura 33). Conforme se observa da Figura 31-A a linhagem MPC5H1CA1 apresentou diferença significativa, no consumo de glicose, apenas na primeira hora de fermentação, embora se note um maior consumo desse carboidrato até duas horas, se comparado à cepa parental. De fato, ao analisar a velocidade de consumo de glicose essa linhagem apresentou discreto aumento (Tabela 3). Cabe salientar que diferentemente das linhagens laboratoriais (Figuras 30 e 31), as linhagens industriais recombinantes foram capazes de consumir parte da xilose, produzindo mais etanol. Por outro lado, não foi possível observar clara diferença na detoxificação do furfural entre as linhagens industriais. Esse maior consumo de glicose se refletiu em maior produção de etanol na primeira hora (Figura 31-B), embora, ao final, ambas as linhagens apresentaram o mesmo perfil de consumo de glicose e xilose e produção de etanol e glicerol. O metabólito xilitol também não apresentou diferença entre as linhagens (dados não mostrados).

Figura 31 - Velocidade de consumo de glicose (A) e produção de etanol (B) durante a cofermentação em meios ricos YP contendo 40 g L<sup>-1</sup> de glicose e 20 g L<sup>-1</sup> de xilose acrescidos de 3,8 g L<sup>-1</sup> de furfural. Os dados expressam a média ± desvio padrão (painel A) e a média (painel B) de dois experimentos independentes (n=2). O asterisco indica a diferença significativa (p<0,05) realizada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey

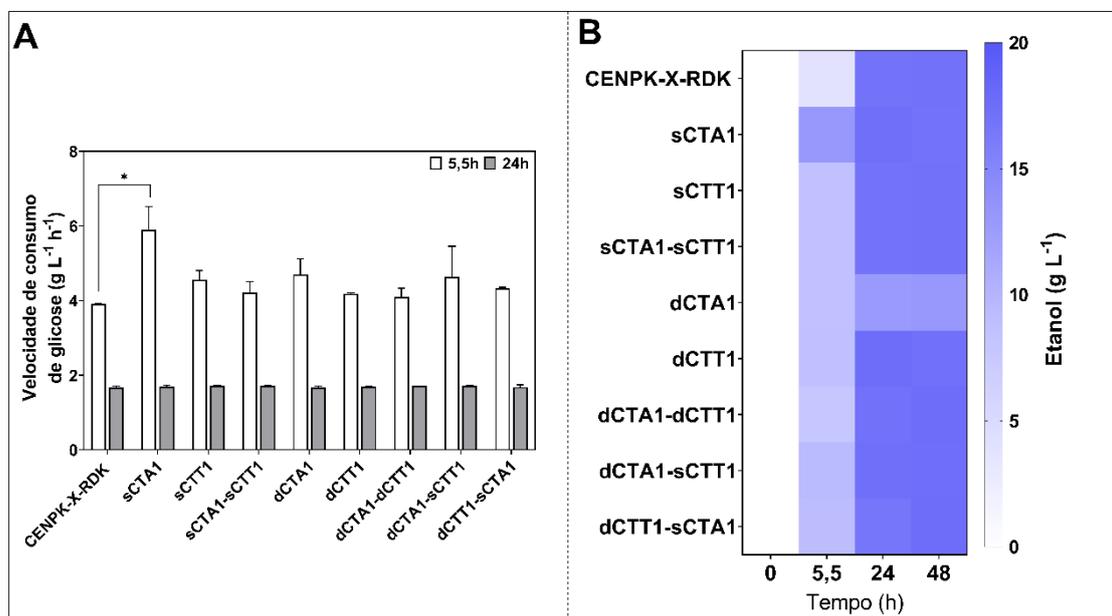
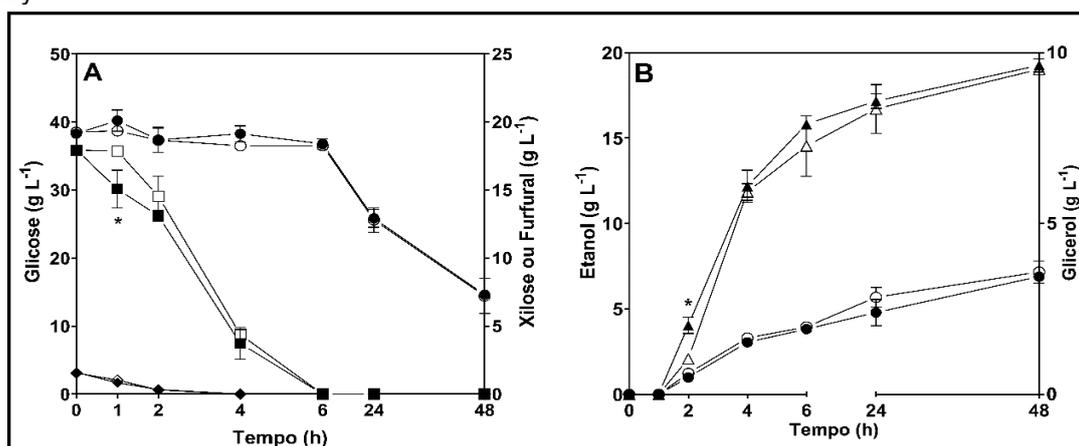


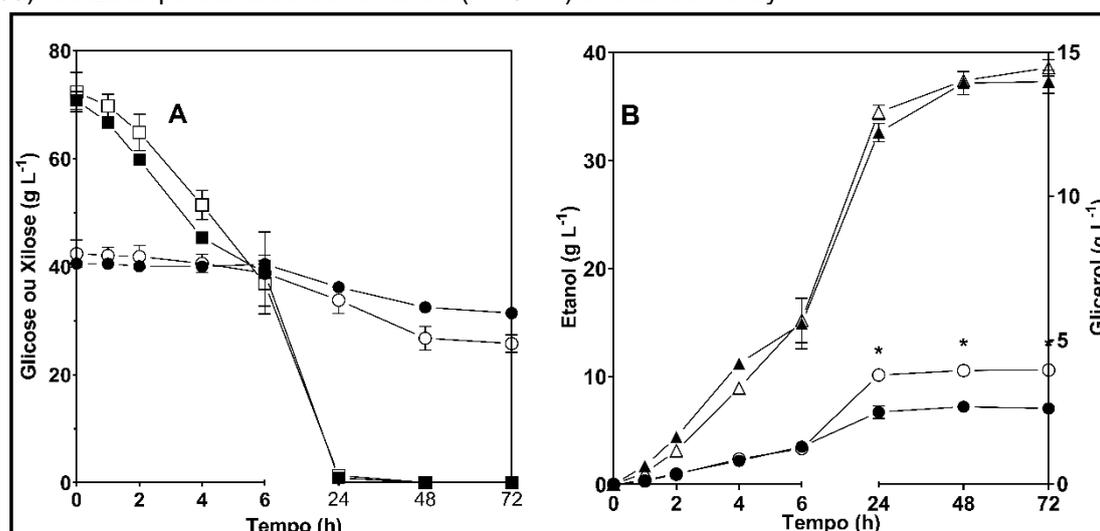
Figura 32 - Cofermentação em batelada simples das linhagens MPC5H1 e MPC5H1CA1 em meios ricos YP contendo 40 g L<sup>-1</sup> de glicose e 20 g L<sup>-1</sup> de xilose acrescidos de 3,8 g L<sup>-1</sup> de furfural. Em A: perfil de consumo de glicose (quadrados) e xilose (círculos) bem como desaparecimento do furfural (losangos). Em B: produção de etanol (triângulos) e glicerol (círculos). MPC5H1: símbolos abertos; MPC5H1CA1: símbolos fechados. Os dados expressam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes e os asteriscos indicam a diferença significativa (p<0,05) realizada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.



Já analisando a Figura 33-A é possível notar que a diferença no consumo da glicose, entre a linhagem MPC5H1 e MPC5H1CA1, se deu nas primeiras seis horas de fermentação, embora, estatisticamente, não sejam diferentes. Como consequência, nesse mesmo tempo, houve ligeiro aumento na produção de etanol (Figura 33-B). Nesse

sentido, analisando a produtividade volumétrica de etanol, também não é possível notar diferença significativa entre as linhagens (Tabela 3). Por outro lado, ainda na mesma tabela, nota-se que o fator de rendimento do processo fermentativo, para a linhagem recombinante MPC5H1CA1, nos ensaios com o hidrolisado hemicelulósico, foi superior em relação as demais linhagens e condições. Importante notar também que, por um lado, nos meios sintéticos a concentração de furfural era maior e, por outro, o hidrolisado continha outros inibidores como os ácidos acético e fórmico, furfural e HMF (vide item 3.7) sugerindo que a linhagem recombinante MPC5H1CA1 foi capaz de remediar os efeitos desses inibidores de forma mais satisfatória.

Figura 33 - Cofermentação em batelada simples das linhagens MPC5H1 e MPC5H1CA1 em hidrolisado hemicelulósico produzido por PEREIRA et al. (2022) e ajustado para 75 g L<sup>-1</sup> de glicose. Em A: perfil de consumo de glicose (quadrados) e xilose (círculos). Em B: produção de etanol (triângulos) e glicerol (círculos). MPC5H1: símbolos abertos; MPC5H1CA1: símbolos fechados. Os dados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes e os asteriscos indicam a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) realizada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.



É possível também observar que a linhagem industrial recombinante MPC5H1CA1 produziu, significativamente, menores teores de glicerol em relação à parental (Figura 33-B). Essa diferença pode ser sugerida como um indicador de menor estresse (BASSO et al., 2008; LÓPEZ et al., 2022). Nesse sentido, LI et al. (2022), demonstraram que o controle do potencial redox extracelular, aumenta a tolerância de *S. cerevisiae* ao furfural e essa levedura produz menores teores de glicerol devido ao direcionamento do fluxo metabólico para a produção de etanol. Os autores atribuem esses fatos a correlação dos potenciais redox intracelulares, medidos pela relação

NADH/NADPH e GSH/GSSG<sup>4</sup>, e o extracelular. Nesse sentido, também, o controle redox diminui os níveis de ERO, causadas pelo estresse do furfural, conferindo maior tolerâncias das células a esse inibidor (LI et al., 2022). De fato, essas constatações vão ao encontro da diminuição dos níveis de ER na cepa MPC5H1CA1 se comparadas a sua parental (Figura 28).

Outro ponto notável é a diferença no consumo de xilose por essas linhagens nos meios sintéticos e no hidrolisado hemicelulósico (Figuras 32 e 33). Enquanto nos meios sintéticos ambas as leveduras consumiram, em média, 62% da xilose presente, no hidrolisado esse consumo diminuiu para 28%. Importante salientar que, no meio sintético, apenas o inibidor furfural estava presente e em concentração elevada se comparada à encontrada no hidrolisado (3,8 g L<sup>-1</sup> e 0,2 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). Ainda, o hidrolisado continha diferentes inibidores oriundos do processo de pré-tratamento (ver item 3.7). Essas constatações têm apoio na literatura uma vez que a levedura, geralmente, tolera melhor o estresse individual, diferente do estresse global, quando presente vários inibidores, por exemplo (BRANDT et al. 2022).

Além disso, Moreno et al. (2019) relataram que sólidos insolúveis (SI), presentes nos hidrolisados lignocelulósicos, acarretam a piora do rendimento fermentativo e aumento dos níveis de ER. Os mesmos autores indicam que, na presença de SI concomitantemente com os inibidores, o aumento de ER pode chegar a 70%, o que poderia explicar a diferença encontrada neste trabalho entre os meios sintéticos e o hidrolisado. Nessa perspectiva, Qin et al. (2020) já evidenciaram que além da produção de etanol ser claramente impedida pelo estresse, a robustez da levedura *S. cerevisiae* em fermentar xilose é primordial. Os mesmos autores demonstram que linhagens onde a via da biossíntese de glutathiona e a via de degradação de ácido acético foi superexpressa, a utilização de xilose foi melhorada pela diminuição do acúmulo de ER. Também, Dzanaeva et al. (2020) demonstraram o papel crucial dos peroxissomos na detoxificação de ERO geradas pela fermentação de xilose. Os pesquisadores indicam que a deficiência peroxissomal (incluindo a deficiência na catalase *CTA1*), levou a uma produção 1,5 vez menor de etanol a partir de xilose, sugerindo que isso ocorre devido a capacidade reduzida de detoxificação de radicais livres pela levedura *S. cerevisiae*. Essas constatações vão ao encontro dos resultados obtidos neste trabalho com a catalase peroxissomal, codificada por *CTA1*.

---

<sup>4</sup> GSH e GSSG são abreviações para glutathiona reduzida e dissulfeto de glutathiona, respectivamente.

Nossos resultados demonstram uma capacidade maior de crescimento celular (Figura 29) e consumo de glicose (Figura 30), da linhagem recombinante laboratorial que superexpressa o gene *CTA1* embora, na cepa industrial, com a mesma modificação, essa diferença não foi tão notável (Figura 31). Sugere-se que as melhores performances dessas linhagens se deu pela maior rapidez em remediar os efeitos do furfural, já que nossos dados demonstram que essas cepas tiveram um menor acúmulo ER, quando exposta ao furfural, em relação a sua parental (Figura 28). Dessa forma, visando a produção de etanol 2G, além de ser capaz de remediar os efeitos do furfural, *S. cerevisiae* deve ser capaz de detoxificar ER geradas pelo metabolismo de xilose.

Portanto, em conjunto, nossos resultados evidenciam que a superexpressão da catalase peroxissomal codificada por *CTA1* aparentou ter papel crucial na tolerância ao distresse causado pelo furfural, sugerindo que, além de conferir tolerância a xilose conforme relatado em trabalhos anteriores, esse gene desempenha papel fundamental na tolerância de *S. cerevisiae* a inibidores presentes nos hidrolisados lignocelulósicos.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

No início deste trabalho foram criados módulos de superexpressão utilizando o promotor forte e constitutivo do gene *TDH3* ( $P_{TDH3}$ ). Posteriormente, esses módulos foram utilizados para transformar linhagens laboratoriais e industriais de *S. cerevisiae* visando a superexpressão da(s) catalase(s) A e T, codificadas pelos genes *CTA1* e *CTT1*, respectivamente. De forma semelhante, a(s) catalase(s) foram deletadas do genoma dessas leveduras. Por fim, foram avaliados os níveis da atividade enzimática da(s) catalases, do peróxido de hidrogênio, das espécies reativas, e as capacidades de crescimento e fermentação em meios sintéticos e em hidrolisado hemicelulósico pelas linhagens geneticamente modificadas.

Portanto, em conjunto, nossos resultados nos permitem constatar que:

1. As modificações genéticas realizadas, sejam elas as superexpressões e/ou deleções, foram realizadas de forma funcional no genoma das linhagens. Isso é observado pelo aumento ou diminuição da atividade da catalase nas cepas obtidas.
2. Todas as linhagens testadas tiveram os níveis de atividade da(s) catalase(s) diminuídos quando foram crescidas na presença de 3,8 g L<sup>-1</sup> de furfural por duas horas.
3. Nos ensaios, *in vitro*, da atividade da(s) catalase(s) todas as cepas testadas tiveram perfil de inibição dose-dependente de furfural, embora, estatisticamente os valores de IC<sub>50</sub> não foram diferentes para as linhagens laboratoriais. Por outro lado, a cepa MPC5H1CA1 teve o valor de IC<sub>50</sub> aumentado em relação à linhagem parental (MPC5H1).
4. Nos crescimentos celulares em microescala, a linhagem sCTA1 teve melhor crescimento celular na presença de furfural, quando a fonte de carbono foi glicose. Por outro lado, não foi possível observar diferença entre as cepas laboratoriais quando as fontes de carbono foram glicose e xilose com furfural.
5. A linhagem sCTA1 apresentou menores níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ER quando exposta ao furfural e, como consequência, a velocidade de consumo de glicose, nas primeiras 12 h, foi maior. Isso também possibilitou maior produção de etanol neste mesmo tempo.
6. O consumo de glicose foi mais rápido, até duas horas de cofermentação, pela linhagem MPC5H1CA1, em meios sintéticos, se comparadas a sua parental.

Ainda, a linhagem MPC5H1CA1 apresentou maior fator de rendimento do processo fermentativo se comparadas à linhagem parental. Por fim, a produção de glicerol foi significativamente menor indicando um menor estresse nessa cepa.

7. Nos ensaios com o hidrolisado lignocelulósico, a linhagem recombinante MPC5H1CA1 apresentou discreto aumento na velocidade de consumo da glicose nas primeiras horas de fermentação ( $\cong$  6h), refletindo em um aumento na produção de etanol nesse mesmo tempo, se comparada à cepa parental (MPC5H1). Nesses ensaios a produção de glicerol pela linhagem recombinante (MPC5H1CA1) foi significativamente menor se analisadas em relação à linhagem parental, indicando um menor estresse nessa linhagem.

Dessa forma, à luz dos resultados obtidos nesse trabalho, sugere-se como perspectivas futuras:

1. Avaliar o nível de transcritos dos genes *CTA1* e *CTT1* nas linhagens construídas através de RT-qPCR. Importante destacar que essa avaliação deve ser feita em diferentes concentrações de furfural e/ou quando a xilose é a única fonte de carbono.
2. Analisar a atividade enzimática das catalases nas linhagens construídas quando crescidas em outras fontes de carbono xilose, glicose/xilose, por exemplo.
3. Investigar os níveis de ER e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes tempos de fermentação e diferentes fontes de carbono.
4. Avaliar o perfil fermentativo da linhagem MPC5H1CA1 em meios sintéticos contendo sacarose/xilose e em meio de cultivo contendo hidrolisado hemicelulósico e melaço de cana-de-açúcar contendo maiores concentrações de furfural.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D.A.; SUIR, E.; DUONG, G.H.; HULSTER, E. de; PRONK, J.T.; VAN MARIS, A.J. A. Catalase overexpression reduces lactic acid-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, [S.L.], v. 75, n. 8, p. 2320-2325, 15 abr. 2009.
- AEBI, H. [13] Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, [S.L.], p.121-126, 1984.
- AGRAWAL, R.; VERMA, A.; SINGHANIA, R.R.; VARJANI, S.; DONG, C.; PATEL, A.K. Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 332, p. 125042, jul. 2021.
- ALFF-TUOMALA, S.; SALUSJÄRVI, L.; BARTH, D.; OJA, M.; PENTTILÄ, M.; PITKÄNEN, J.; RUOHONEN, L.; JOUHTEN, P. Xylose-induced dynamic effects on metabolism and gene expression in engineered *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-xylose cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 100, n. 2, p. 969-985, 10 out. 2015
- ALLEN, S.; CLARK, W.; MCCAFFERY, J.M.; CAI, Z.; LANCTOT, A.; SLININGER, P.J.; LIU, Z.L.; GORSICH, S.W. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-10, 15 jan. 2010.
- ALVES JUNIOR, S.L.; SCAPINI, T.; WARKEN, A.; KLANOVICZ, N.; PROCÓPIO, D.P.; TADIOTO, V.; STAMBUK, B.U.; BASSO, T.O.; TREICHEL, H. Engineered *Saccharomyces* or prospected *non-saccharomyces*: Is there only one good choice for biorefineries? *In*: ALVES JUNIOR, S.L.; TREICHEL, H.; BASSO, T.O.; STAMBUK, B.U. **Yeast: from nature to bioprocess**. Florianópolis: Bentham Science, 2022. 494p.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V. de C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 7 jul. 2011.
- ARORA, N.K.; MISHRA, I. COP26: more challenges than achievements. **Environmental Sustainability**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 585-588, dez. 2021.
- ASADA, R.; WATANABE, T.; TANAKA, Y.; KISHIDA, M.; FURUTA, M. Trehalose accumulation and radiation resistance due to prior heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, [S.L.], v. 204, n. 5, p. 1-8, 22 abr. 2022.
- ASK, M.; BETTIGA, M.; DURAISWAMY, V.R.; OLSSON, L. Pulsed addition of HMF and furfural to batch-grown xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* results in different physiological responses in glucose and xylose consumption phase. **Biotechnology for Biofuels**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-15, dez. 2013.

- AYER, A.; GOURLAY, C.W.; DAWES, I.W. Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 60-72, 8 nov. 2013.
- BABRZADEH, F.; JALILI, R.; WANG, C.; SHOKRALLA, S.; PIERCE, S.; MOSHER-ROBINSON, A.; NYREN, PAL.; SHAFER, R.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J de.; DAVIS, R.W.; RONAGHI, M.; GHARIZADEH, B.; STAMBUK, B.U. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain *CAT-1*. **Molecular Genetics And Genomics**, v. 287, n. 6, p. 485-494, 2012.
- BARRETTO, D.A.; AVCHAR, R.; CARVALHO, C.; SAMPAIO, J.P.; VOOTLA, S.K.; BAGHELA, A. *Blastobotrys bombycis* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast isolated from the gut of the silkworm larva *Bombyx mori*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 2638-2643, 27 jun. 2018.
- BARROS, K.O.; SOUZA, R.M; PALLADINO, F.; CADETE, R.M.; SANTOS, A.R.O; GOES-NETO, A.; BERKOV, A.; JERRI, E.Z.; VITAL, M.J.S.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. *Cyberlindnera dasilvae* sp. nov., a xylitol-producing yeast species isolated from rotting wood and frass of cerambycid larva. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 9, p.004986, set. 2021.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. de; OLIVEIRA, A.J. de; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 1155-1163, nov. 2008
- BEZERRA, T.L.; RAGAUSKAS, A.J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 5, p. 634-647, 20 jul. 2016.
- BHATIA, S.K.; JAGTAP, S.S.; BEDEKAR, A.A.; BHATIA, R.K.; PATEL, A.K.; PANT, D.; BANU, J.R.; RAO, C.V.; KIM, Y.G.; YANG, Y.H. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 300, p. 122724, mar. 2020
- BIAN, X.; JIANG, H.; MENG, Y.; LI, Y.P.; FANG, J.; LU, Z. Regulation of gene expression by glycolytic and gluconeogenic enzymes. **Trends in Cell Biology**, [S.L.], v. 32, n. 9, p. 786-799, set. 2022.
- BITTER, G.A.; EGAN, K.M. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. **Gene**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 263-274, dez. 1984.
- BOSSLE R. **CNPE confirma redução de meta do RenovaBio em 2020 para 14,53 milhões de CBios.** 2020. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/meio-ambiente/cnpe-confirma-reducao-meta-renovabio-2020-14-53-milhoes-cbios-100920>>. Acesso 02 set 2022.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRANDES, R.P.; REZENDE, F.; SCHRÖDER, K. Redox regulation beyond ROS. **Circulation Research**, [S.L.], v. 123, n. 3, p. 326-328, 2018.
- BRANDT, A.; GRASVIK, J.; HALLETT, J.P.; WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v.15, n. 3, p. 550-583, dez. 2012.
- BRANDT, B.A.; GARCÍA-APARICIO, M.P.; GÖRGENS, J.F.; VAN ZYL, W.H. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* in a concentrated spent sulphite liquor waste stream for increased inhibitor resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 106, n. 1, p. 455-468, 2022.
- BRASIL, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **RenovaBio**. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/renovabio>>. Acesso 01 set 2021a.
- BRASIL, Empresa de Pesquisa Energética – EPE. **Matriz energética e Elétrica**. 2021. Disponível em: <<https://www.epe.gov.br/pt/abcdenergia/matriz-energetica-e-eletrica>>. Acesso 06 set 2021b.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Contribuição Nacionalmente Determinada**. 2016. Disponível em:<<https://www.mma.gov.br/images/arquivo/80108/BRASIL%20iNDC%20portugues%20FINAL.pdf>> Acesso 15 out 2022.
- BÜCKER, A. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a tolerância ao etanol**. 2014. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2014.
- BURKITT, M.J.; WARDMAN, P. Cytochrome c is a potent catalyst of dichlorofluorescein oxidation: implications for the role of reactive oxygen species in apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 282, n. 1, p. 329-333, mar. 2001.
- CADETE, R.M.; MELO, M.A.M.; DUSSÁN, K.J.; RODRIGUES, R.C.L.B.; SILVA, S.S.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **Plos One**. v.7. p. 43135-11, 13 ago. 2012.
- CADETE, R.M.; SANTOS, R.O.; MELO, M.A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D.L.; STAMBUK, B.U.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. *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, 7 set. 2009.

- CAMPOS, V.J.; RIBEIRO, L.E.; ALBUINI, F.M.; CASTRO, A.G. de; FONTES, P.P.; SILVEIRA, W.B. da; ROSA, C.A.; FIETTO, L.G. Physiological comparisons among *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae*, and *Scheffersomyces stipitis* reveal the bottlenecks for their use in the production of second-generation ethanol. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 53, n. 2, p. 977-990, 16 fev. 2022
- CANDIDO, J.P.; CLARO, E.M.T.; PAULA, C.B.C. de; SHIMIZU, F.L.; LEITE, D.A.N. de O.; BRIENZO, M.; ANGELIS, D. de F. de. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate with different adsorbents to improve the fermentative process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 1-12, mar. 2020.
- CANEDO-SANTOS, J.C.; CARRILLO-GARMENDIA, A.; MORA-MARTINEZ, I.; GUTIERREZ-GARCIA, I.K.; RAMIREZ-ROMERO, M.G.; REGALADO-GONZALEZ, C.; NAVA, G.M.; MADRIGAL-PEREZ, L.A. Resveratrol shortens the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* by a pro-oxidant mechanism. **Yeast**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 193-207, 4 nov. 2021.
- CAÑONERO, L.; PAUTASSO, C.; GALELLO, F.; SIGAUT, L.; PIETRASANTA, L.; ARROYO, J.; BERMUDEZ-MORETTI, M.; PORTELA, P.; ROSSI, S. Heat stress regulates the expression of *TPK1* gene at transcriptional and post-transcriptional levels in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research**, [S.L.], v. 1869, n. 4, p. 119209, abr. 2022.
- CECCATO-ANTONINI, S.R.; COVRE, E.A. From baker's yeast to genetically modified budding yeasts: the scientific evolution of bioethanol industry from sugarcane. **FEMS Yeast Research**, [S.L.], v. 20, n. 8, p. 1-10, 2020.
- CHATSURACHAI, S.; WATANAROJANAPORN, N.; SAKULSOMBAT, M.; SRIROTH, K. Genetic variation in genes involved in ethanol production among *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Sugar Tech**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 250-258, 27 set. 2019.
- CHEN, H.Q.; ZHANG, M.M.; XING, Q.; YE, P.L.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; ZHAO, X.Q. Improved ethanol fermentation by promoter replacement of zinc responsive genes *IPL1*, *PRP6* and *RTC1* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 178, p. 108274, jan. 2022.
- CHEN, H.; LI, J.; WAN, C.; FANG, Q.; BAI, F.; ZHAO, X. Improvement of inhibitor tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the quinone oxidoreductase family gene *YCR102C*. **FEMS yeast research**, v.19, n. 6, p. 1-9, 1 set. 2019.
- CHENG, C.; TANG, R.Q.; XIONG, L.; HECTOR, R.E.; BAI, F.W.; ZHAO, X.Q. Association of improved oxidative stress tolerance and alleviation of glucose repression with superior xylose-utilization capability by a natural isolate of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n.1, p.1-19, 5 fev. 2018.
- COIMBRA, L.; MALAN, K.; FAGÚNDEZ, A.; GUIGOU, M.; LAREO, C.; FERNÁNDEZ, B.; PRATTO, M.; BATISTA, S. Fermentation of d-xylose to ethanol by *Saccharomyces*

- cerevisiae* CAT-1 recombinant strains. **Bioenergy Research**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-12, 6 out. 2022.
- COLA, P.; PROCÓPIO, D.P.; ALVES, A.T.C.; CARNEVALLI, L.R.; SAMPAIO, I.V.S.; COSTA, B.L.V.; BASSO, T.O. Differential effects of major inhibitory compounds from sugarcane-based lignocellulosic hydrolysates on the physiology of yeast strains and lactic acid bacteria. **Biotechnology Letters**, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 571-582, abr. 2020.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Nova Estimativa de cana-de-açúcar traz produção de 572,9 milhões de toneladas**. 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4725-nova-estimativa-de-cana-de-acucar-traz-producao-de-572-9-milhoes-toneladas>>. Acesso: 01 set 2022.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Tabela De Dados - Produção E Análise De Mercado De Cana-De-Açúcar**. 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>. Acesso: 06 set 2021.
- CUNHA, J.T.; SOARES, P.O; ROMANÍ, A.; THEVELEIN, J.M.; DOMINGUES, L. Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. **Biotechnology for biofuels**, v.12, n. 1, p.1-14, 28 jan. 2019.
- CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L.R.; SEHNEM, N.T.; SOUZA-CRUZ, P.B. de; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. 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, mar. 2011.
- DEBSKI, D.; SMULIK, R.; ZIELONKA, J.; MICHALOWSKI, B.; JAKUBOWSKA, M.; DEBOWSKA, K.; ADAMUS, J.; MARCINEK, A.; KALVANARAMAN, B.; SIKORA, A. Mechanism of oxidative conversion of Amplex® Red to resorufin: pulse radiolysis and enzymatic studies. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 95, p. 323-332, mar. 2016.
- DELATOUR, T.; HUERTAS-PÉREZ, J.F.; DUBOIS, M.; THEURILLAT, X.; DESMARCHELIER, A.; ERNEST, M.; STADLER, R.H. Thermal degradation of 2-furoic acid and furfuryl alcohol as pathways in the formation of furan and 2-methylfuran in food. **Food Chemistry**, v.303, p.125406, jan. 2020.
- DIVATE, N.R.; HUANG, P.J.; CHEN, G.H.; CHUNG, Y.C. Construction of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with ethanol and aldehydes tolerance via overexpression of aldehyde reductase. **Microorganisms**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 850, 20 abri. 2022.
- DIVATE, N.R.; CHEN, G.H.; DIVATE, R.D; OU, B.R.; CHUNG, Y.C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improvement in stresses tolerance. **Bioengineered**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 524-535, 12 dez. 2017.
- DOBRESCU, A.C.; VERAS, H.C.T.; VARRONE, C.; KNUDSEN, J.D. Novel propagation strategy of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism during

- fermentation on softwood hydrolysate. **Fermentation**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 288, 29 nov. 2021
- DOS SANTOS, Angela. **Desenvolvimento de linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* como plataformas de análise de enzimas e transportadores envolvidos na metabolização de xilose**. 2017. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2017.
- DOS SANTOS, L.V.; GRASSI, M.C.B.; GALLARDO, J.C.M.; PIROLLA, R.A.S.; CALDERÓN, L.L.; CARVALHO-NETTO, O.V.; PARREIRAS, L.S.; CAMARGO, E.L.O.; DREZZA, A.L.; MISSAWA, S.K.; TEIXEIRA, G.S.; LUNARDI, I.; BRESSIANI, J.; PEREIRA, G.A.G. Second-generation ethanol: the need is becoming a reality. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p.40-57, 16 fev. 2016.
- DZANAEVA, L.; KRUK, B.; RUCHALA, J.; NIELSEN, J.; SIBIRNY, A.; DMYTRUK, K. The role of peroxisomes in xylose alcoholic fermentation in the engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Biology International**, [S.L.], v. 44, n. 8, p. 1606-1615, 13 abr. 2020.
- EARDLEY, J.; TIMSON, D.J. Yeast cellular stress: impacts on bioethanol production. **Fermentation**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 109, 10 nov. 2020.
- ENTIAN, K.D.; KOTTER, P. Yeast mutant and plasmid collections. **Methods in Microbiology**, v. 26, p. 431–449, 1998.
- ERKAN, S.B.; YATMAZ, E.; GERMEC, M.; TURHAN, I. Effect of furfural concentration on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* in an immobilized cells stirred-tank bioreactor with glucose-based medium and mathematical modeling. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 8, 19 jun. 2020.
- EUR-LEX. **Directive (EU) 2018/2001 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on the promotion of the use of energy from renewable sources**. 2018. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32018L2001>>. Acesso 01 set 2021.
- FERNANDES, P.N.; MANNARINO, S.C.; SILVA, C.G.; PEREIRA, M.D.; PANEK, A.D.; ELEUTHERIO, E.C.A. Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. **Redox Report**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 236-244, out. 2007.
- FERREIRA, A.D.; MUSSATTO, S.I.; CADETE, R.M.; ROSA, C.A.; SILVA, S.S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, [S.L.], v. 28, n. 7, p. 547-554, jul. 2011.
- FOLKES, L.K.; PATEL, K.B.; WARDMAN, P.; WRONA, M. Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydrorhodamine and the reaction of the dihydrorhodamine radical with

- oxygen: implications for quantifying peroxyxynitrite formation in cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.L.], v. 484, n. 2, p. 122-126, abr. 2009.
- FULTON, L.M.; LYND, L.R.; KÖRNER, A.; GREENE, N.; TONACHEL, L.R. The need for biofuels as part of a low carbon energy future. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 476-483, 22 jun. 2015.
- GARDINER, B.; DOUGHERTY, J.A.; PONNALAGU, D.; SINGH, H.; ANGELOS, M.; CHEN, C.A.; KHAN, M. Measurement of oxidative Stress markers *in vitro* using commercially available kits. *In*: BERLINER, L.J.; PARANANDI, N.L. **Measuring oxidants and oxidative stress in biological systems**, Denver: Springer, 2020.
- GIETZ, R.D.; WOODS, R.A. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. **Yeast Protocols**, [S.L.], p. 107-120, 2006.
- GOLDEMBERG, J. The ethanol program in Brazil. **Environmental Research Letters**, v. 1, n. 1, out. 2006.
- GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology For Biofuels**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 6, 1 maio 2008.
- GONÇALVES, D.L. **Influência dos transportadores de açúcares na fermentação de xilose por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae***. 2014. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2014.
- GORSICH, S.W.; DIEN, B.S.; NICHOLS, N.N.; SLININGER, P.J.; LIU, Z.L.; SKORY, C.D. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 71, n. 3, p. 339-349, jul. 2006.
- GOUD, B.S.; KIM, J.H.; ULAGANATHAN, K. Identification of genes associated with stress tolerance of high ethanol-producing *Saccharomyces cerevisiae* strain, NCIM3186, by differential gene expression analysis. **Bioenergy Research**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 1459-1471, 13 jan. 2022.
- GUILHERME, A.A.; DANTAS, P.V.F.; SANTOS, E.S.; FERNANDES, F.A.N.; MACEDO, G.R. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 23-33, mar. 2015
- GUO, H.; ZHAO, Y.; CHANG, J.S.; LEE, D.J. Inhibitor formation and detoxification during lignocellulose biorefinery: a review. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 361, p. 127666, out. 2022.
- HADWAN, M.H.; ABED, H.N. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. **Data In Brief**, [S.L.], v. 6, p. 194-199, mar. 2016.
- HASUNUMA, T.; ISMAIL, K.S.K.; NAMBU, Y.; KONDO, A. Co-expression of TAL1 and ADH1 in recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves

- ethanol production from lignocellulosic hydrolysates in the presence of furfural. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S.L.], v. 117, n. 2, p. 165-169, fev. 2014.
- HEER, D.; HEINE, D.; SAUER, U. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH- dependent reduction by at least two oxireductases. **Applied and environmental microbiology**, v.75, n.24, p.7631-7638, 23 out. 2009.
- HERNÁNDEZ-BELTRÁN, J.U.; LIRA, I.O.H. de; CRUZ-SANTOS, M.M.; SAUCEDO-LUEVANOS, A.; HERNÁNDEZ-TERÁN, F.; BALAGURUSAMY, N. Insight into pretreatment methods of lignocellulosic biomass to increase biogas yield: current state, challenges, and opportunities. **Applied Sciences**, [S.L.], v. 9, n. 18, p. 3721, 6 set. 2019.
- HOPPERT, L.; KÖLLING, R.; EINFALT, D. Synergistic effects of inhibitors and osmotic stress during high gravity bioethanol production from steam-exploded lignocellulosic feedstocks. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 43, p. 102414, ago. 2022.
- HOYDONCKX, H.E.; VAN RHIJN, W.M.; VAN RHIJN, W.; VOS, D.E. de; JACOBS, P.A. Furfural and derivatives. **Ullmann'S Encyclopedia Of Industrial Chemistry**, [S.L.], p. 1-10, 15 abr. 2007.
- HUNG, C.W.; MARTÍNEZ-MÁRQUEZ, J.Y.; JAVED, F.T.; DUNCAN, M.C. A simple and inexpensive quantitative technique for determining chemical sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-1, 9 ago. 2018.
- IBRAHEEM, O.; NDIMBA, B.K. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocellulose-derived inhibitory compounds. **International Journal of Biological Sciences**, v.9, n.6, p.598, 28 jun. 2013.
- JACOBUS, A.P.; GROSS, J.; EVANS, J.H.; CECCATO-ANTONINI, S.R.; GOMBERT, A.K. *Saccharomyces cerevisiae* strains used industrially for bioethanol production. **Essays in Biochemistry**, [S.L.], v. 65, n. 2, p. 147-161, jul. 2021.
- JAMIESON, D.J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.14, n.16, p.1511-1527, dez.1998.
- JASWAL, A.; SINGH, P.P.; MONDAL, T. Furfural – a versatile, biomass-derived platform chemical for the production of renewable chemicals. **Green Chemistry**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 510-551, 2022.
- JEPPESSON, M.; JOHANSSON, B.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 68, n. 4, p. 1604-1609, abr. 2002.

- JÖNSSON, L.J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 199, p. 103-112, jan. 2016.
- JUNG, Y.H.; KIM, S.; YANG, J.; SEO, J.H.; KIM, K.H. Intracellular metabolite profiling of *Saccharomyces cerevisiae* evolved under furfural. **Microbial Biotechnology**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 395-404, mar. 2017.
- KALYANARAMAN, B.; DARLEY-USMAR, V.; DAVIES, K.J.A.; DENNERY, P.A.; FORMAN, H.J.; GRISHAM, M.B.; MANN, G.E.; MOORE, K.; ROBERTS, L. J.; ISCHIROPOULOS, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 1-6, jan. 2012.
- KARHUMAA, K.; SANCHEZ, R.G.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Comparison of the xylose reductase-xylytol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-10, 5 fev. 2007.
- KARP, S.G; MEDINA, J.D.C; LETTI, L.A.J; WOICIECHOWSKI, A.L.; CARVALHO, J.C.; SCHMITT, C.C.; PENHA, R.O.; KUMLEHN, G.; SOCCOL, C.R. Bioeconomy and biofuels: the case of sugarcane ethanol in Brazil. **Biofuels, Bioproducts And Biorefining**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 899-912, 19 fev. 2021.
- KIM, D.; HAHN, J.S. Roles of the Yap1 transcription factor and antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*'s tolerance to furfural and 5-hydroxymethylfurfural, which function as thiol-reactive electrophiles generating oxidative stress. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 16, p. 5069-5077, ago. 2013.
- KIM, S.R.; SKERKER, J.M.; KANG, W.; LESMANA, A.; WEI, N.; ARKIN, A.P.; JIN, Y.S. Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 57048-57050, 26 fev. 2013.
- KO, J.K.; ENKH-AMGALAN, T.; GONG, G.; UM, Y.; LEE, S.M. Improved bioconversion of lignocellulosic biomass by *Saccharomyces cerevisiae* engineered for tolerance to acetic acid. **Gcb Bioenergy**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 90-100, 6 nov. 2019.
- KOBAYASHI, Y.; SAHARA, T.; OHGIYA, S.; KAMAGATA, Y.; FUJIMORI, K.E. Systematic optimization of gene expression of pentose phosphate pathway enhances ethanol production from a glucose/xylose mixed medium in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Amb Express**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.
- KOLEVA, D.; PETROVA, V.; HRISTOZOVA, T.; KUJUMDZIEVA, A. Study of catalase enzyme in methylotrophic yeasts. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 762-768, jan. 2008.
- KONG, M.; LI, X.; LI, T.; ZHAO, X.; JIN, M.; ZHOU, X.; GU, H.; MRŁA, V.; XIAO, W.; CAO, L. Overexpressing CCW12 in *Saccharomyces cerevisiae* enables highly

- efficient ethanol production from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 337, p. 125487, out. 2021.
- KOWALTOWSKI, A.J. Strategies to detect mitochondrial oxidants. **Redox Biology**, [S.L.], v. 21, p. 101065, fev. 2019.
- KUHAD, R.C.; GUPTA, R.; KHASA, Y.P.; SINGH, A.; ZHANG, Y.H. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p.4950-4962, dez. 2011.
- KUMAR, S.; DHEERAN, P.; SINGH, S.P.; MISHRA, I.M.; ADHIKARI, D.K. Kinetic studies of two-stage sulphuric acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, [S.L.], v. 83, p. 850-858, nov. 2015.
- LAMOUR, J.; WAN, C.; ZHANG, M.; ZHAO, X.; DEN HAAN, R. Overexpression of endogenous stress-tolerance related genes in *Saccharomyces cerevisiae* improved strain robustness and production of heterologous cellobiohydrolase. **FEMS Yeast Research**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 1-10, 25 abr. 2019.
- LI, B.Z.; YUAN, Y.J. Transcriptome shifts in response to furfural and acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 6, p.1915-1924, 23 mar. 2010.
- LI, B.; WANG, L.; WU, Y.J.; XIA, Z.Y.; YANG, B.X.; TANG, Y.Q. Improving acetic acid and furfural resistance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains by regulating novel transcription factors revealed via comparative transcriptomic analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 87, n. 10, p. 1-10, 27 abr. 2021.
- LI, B.; WANG, L.; XIE, J.Y.; XIA, Z.Y.; XIE, C.Y.; TANG, Y.Q. Regulatory mechanism of Haa1p and Tye7p in *Saccharomyces cerevisiae* when fermenting mixed glucose and xylose with or without inhibitors. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-15, 28 maio 2022.
- LI, B.; LIU, N.; ZHAO, X. Response mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* to the stress factors present in lignocellulose hydrolysate and strategies for constructing robust strains. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-1, 15 mar. 2022.
- LI, K.; XIA, J.; MEHMOOD, M.A.; ZHAO, X.Q.; LIU, C.G.; BAI, F.W. Extracellular redox potential regulation improves yeast tolerance to furfural. **Chemical Engineering Science**, [S.L.], v. 196, p. 54-63, mar. 2019.
- LI, W.C.; ZHU, J.Q.; ZHAO, X.; QIN, L.; XU, T.; ZHOU, X.; LI, X.; LI, B.Z.; YUAN, Y.J. Improving co-fermentation of glucose and xylose by adaptive evolution of engineering xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* and different fermentation strategies. **Renewable Energy**, [S.L.], v. 139, p. 1176-1183, ago. 2019.

- LI, X.; ZHAO, R.; LI, S.; WANG, Y.; WANG, X.; YANG, W.; YANG, M.; XIAO, W.; YANG, S.; LIN, X. Global reprogramming of xylose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* efficiently produces ethanol from lignocellulose hydrolysates. **Industrial Crops and Products**, v. 179, p. 114666, maio 2022.
- LIN, S.P.; KUO, T.C.; WANG, H.T.; TING, Y.; HSIEH, C.W.; CHEN, Y.K.; HSU, H.Y.; CHENG, K.C. Enhanced bioethanol production using atmospheric cold plasma-assisted detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 313, p. 123704, out. 2020.
- LIU, C.; CAI, T.; YIN, X.; LIANG, J.; JIA, S.; ZHANG, X.; XU, J.; HU, J.; JIANG, J.; WANG, K. A sustainable and profitable biorefinery strategy for efficiently converting lignocellulose to furfural, glucose and phenolic compounds. **Green Chemistry**, [S.L.], v. 24, n. 21, p. 8494-8502, 2022.
- LIU, Y.; YANG, F.; LI, S.; DAI, J.; DENG, H. Glutaredoxin deletion shortens chronological life span in *Saccharomyces cerevisiae* via ROS-Mediated Ras/PKA activation. **Journal of Proteome Research**, [S.L.], v. 17, n. 7, p. 2318-2327, 23 maio 2018.
- LIU, Z.L. Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.73, n. 1, p. 27-36, 2006.
- LIU, Z. L. Understanding the tolerance of the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* against a major class of toxic aldehyde compounds. **Applied microbiology and biotechnology**, v.102, n.13, p. 5369-5390, 3 maio 2018.
- LIU, Z.L.; SLININGER, P.J.; GORSICH, S.W. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121, n.1, p. 451-460, 2005.
- LIU, Z.L.; MA, M. Pathway-based signature transcriptional profiles as tolerance phenotypes for the adapted industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* resistant to furfural and HMF. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 104, n. 8, p. 3473-3492, 26 fev. 2020.
- LIU, Z.L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Applied microbiology and biotechnology**, [S.L.], v.90, n.3, p.809-825, 5 mar. 2011.
- 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*. **Applied and environmental microbiology**, v.78, n.16, p. 5492-5500, 15 ago. 2012.
- LOPES, M.R.; BATISTA, T.M.; FRANCO, G.R.; RIBEIRO, L.R.; SANTOS, A.R.O.; FURTADO, C.; MOREIRA, R.G.; GOES-NETO, A.; VITAL, M.J.S.; ROSA, L.H. *Scheffersomyces stambukii* f.a., sp. nov., a d-xylose-fermenting species isolated from rotting wood. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 68, n. 7, p. 2306-2312, 1 jul. 2018.

- LOPES, M.L.; PAULILLO, S.C. de L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R.A.; LORENZI, M.S.; GIOMETTI, F.H.C.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM NETO, H.B. de; AMORIM, H. V. de. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 47, p. 64-76, dez. 2016.
- LÓPEZ, P.C.; PENG, C.; ARNEBORG, N.; JUNICKE, H.; GERNAEY, K.V. Analysis of the response of the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae* during the detoxification of common lignocellulosic inhibitors. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-15, 25 mar. 2021.
- LYU, K.; SHI, K.; LIU, C.; LYU, Z.; LIU, D; WANG, X. The Sensitive Genes in Response to Various Metal Ion Stresses in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Protein & Peptide Letters**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 231-241, mar. 2022.
- MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; LIGR, M.; GREY, M.; SIGRIST, S.J.; WOLF, D.H.; FRÖHLICH, K.U. Oxygen Stress: a regulator of apoptosis in yeast. **Journal of Cell Biology**, [S.L.], v. 145, n. 4, p. 757-767, 17 maio 1999.
- MAHMUD, S.A.; HIRASAWA, T.; SHIMIZU, H. Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S.L.], v. 109, n. 3, p. 262-266, mar. 2010.
- MANDALIKA, A.; QIN, L.; SATO, T.K.; RUNGE, T. Integrated biorefinery model based on production of furans using open-ended high yield processes. **Green Chem.**, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 2480-2489, 2014.
- MASCAL, M.; DUTTA, S. Synthesis of the natural herbicide  $\delta$ -aminolevulinic acid from cellulose-derived 5-(chloromethyl) furfural. **Green chemistry**, v.13, n.1, p.40-41, 2011.
- MATÉ, M.J.; ZAMOCKY, M.; NYKYRI, L.M.; HERZOG, C.; ALZARI, P.M.; BETZEL, C.; KOLLER, F.; FITA, I. Structure of catalase- A from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Biology**, [S.L.], v. 286, n. 1, p. 135-149, fev. 1999.
- 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, set. 2008.
- MATSUSHIKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Expression of protein engineered NADP<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 81, n. 2, p. 243-255, nov. 2008.
- MATSUSHIKA, A.; GOSHIMA, T.; HOSHINO, T. Transcription analysis of recombinant industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals the molecular

- basis for fermentation of glucose and xylose. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 16, 2014.
- MENEGON, Y.A.; GROSS, J.; JACOBUS, A.P. How adaptive laboratory evolution can boost yeast tolerance to lignocellulosic hydrolyses. **Current Genetics**, [S.L.], v. 68, n. 3-4, p. 319-342, abr. 2022.
- MENG, D.; ZHANG, P.; LI, S.; HO, C.T.; ZHAO, H. Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. **Journal of Functional Foods**, [S.L.], v. 38, p. 36-44, nov. 2017.
- MERTENS, J.A.; SKORY, C.D.; NICHOLS, N.N.; HECTOR, R.E. Impact of stress-response related transcription factor overexpression on lignocellulosic inhibitor tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* environmental isolates. **Biotechnology Progress**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 1-10, 30 out. 2020.
- MESA, L.; MORALES, M.; GONZÁLEZ, E.; CARA, C.; ROMERO, I.; CASTRO, E.; MUSSATTO, S.I. Restructuring the processes for furfural and xylose production from sugarcane bagasse in a biorefinery concept for ethanol production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, [S.L.], v. 85, p. 196-202, nov. 2014.
- MESQUITA, A.; WEINBERGER, M.; SILVA, A.; SAMPAIO-MARQUES, B.; ALMEIDA, B.; LEÃO, C.; COSTA, V.; RODRIGUES, F.; BURHANS, W.C.; LUDOVICO, P. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide dismutase activity. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 107, n. 34, p. 15123-15128, 9 ago. 2010.
- MILESSI, T.S.; AQUINO, P.M.; SILVA, C.R.; MORAES, G.S.; ZANGIROLAMI, T.C.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C. Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, [S.L.], v. 119, p. 277-283, dez. 2018.
- MONTEIRO, C.R.M.; ÁVILA, P.F.; PEREIRA, M.A.F.; PEREIRA, G.N.; BORDIGNON, S.E.; ZANELLA, E.; STAMBUK, B.U.; OLIVEIRA, D. de; GOLDBECK, R.; POLETTO, P. Hydrothermal treatment on depolymerization of hemicellulose of mango seed shell for the production of xylooligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 253, p. 117274, fev. 2021.
- 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, 26 fev. 2015.
- MOON, J.; LIU, Z.L. Engineered NADH-dependent *GRE2* from *Saccharomyces cerevisiae* by directed enzyme evolution enhances HMF reduction using additional cofactor NADPH. **Enzyme and microbial technology**, v.50, n. 2, p.115-120, fev. 2012.

- MORENO, A.D.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M.; TOMÁS-PEJÓ, E. Insoluble solids at high concentrations repress yeast's response against stress and increase intracellular ROS levels. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-1, 22 ago. 2019.
- MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p.673-686, abr. 2005.
- MOURO, A.; SANTOS, A.A. dos; AGNOLO, D.D.; GUBERT, G.F.; BON, E.P.S.; ROSA, C.A.; FONSECA, C.; STAMBUK, B.U. Combining xylose reductase from *Spathaspora arborariae* with xylitol dehydrogenase from *Spathaspora passalidarum* to promote xylose consumption and fermentation into xylitol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Fermentation**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 72, 21 jul. 2020.
- MUKAI, Y.; KAMEI, Y.; LIU, X.; JIANG, S.; SUGIMOTO, Y.; NANYAN, N.S.B.M.; WATANABE, D.; TAKAGI, H. Proline metabolism regulates replicative lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 482-490, 7 out. 2019.
- MUMBERG, D.; MULLER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, v.156, n.1, p.119-122. Abr. 1995.
- MURPHY, M.P.; BAYIR, H.; BELOUSOV, V.; CHANG, C.J.; DAVIES, K.J.A.; DAVIES, M.J.; DICK, T.P.; FINKEL, T.; FORMAN, H.J.; JANSSEN-HEININGER, Y. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. **Nature Metabolism**, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 651-662, 27 jun. 2022.
- MYBURGH, M.; ROSE, S.H.; VILJOEN-BLOOM, M. Evaluating and engineering *Saccharomyces cerevisiae* promoters for increased amylase expression and bioethanol production from raw starch. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 6, p. foaa047, 1 set. 2020.
- NAMBU-NISHIDA, Y.; SAKIHAMA, Y.; ISHII, J.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Selection of yeast *Saccharomyces cerevisiae* promoters available for xylose cultivation and fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S.L.], v. 125, n. 1, p. 76-86, jan. 2018.
- NAVARRO, A.R. Effects of furfural on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: mathematical models. **Current Microbiology**, v.29, n.2, p.87-90, 1994.
- NICKENS, D.G; SAUSEN, C.W.; BOCHMAN, M.L. The biochemical activities of the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 helicase are regulated by its N-Terminal domain. **Genes**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 411, 28 maio 2019.
- NIJKAMP, J.F; BROEK, M.D; DATEMA, E.; KOK, S. de; BOSMAN, L.; A LUTTIK, M.; DARAN-LAPUJADE, P.; VONGSANGNAK, W.; NIELSEN, Jens.; HEIJNE, W.H. De novo sequencing, assembly and analysis of the genome of the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, a model for modern industrial biotechnology. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-1, 26 mar. 2012.

- NISHIMOTO, T.; WATANABE, T.; FURUTA, M.; KATAOKA, M.; KISHIDA, M. Roles of catalase and tin in the protection from hydrogen peroxide toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biocontrol Science**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 179-182, 2016.
- NIU, Y.; WU, L.; SHEN, Y.; ZHAO, J.; ZHANG, J.; YI, Y.; LI, H.; BAO, X. Coexpression of  $\beta$ -xylosidase and xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of saccharification and fermentation from xylo-oligosaccharides. **Cellulose**, [S.L.], v. 26, n. 13-14, p. 7923-7937, 7 ago. 2019.
- OKADA, N.; OGAWA, J.; SHIMA, J. Comprehensive analysis of genes involved in the oxidative stress tolerance using yeast heterozygous deletion collection. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 3, p. 425-434, 3 fev. 2014.
- OSIRO, K.O.; BRINK, D.P.; BORGSTRÖM, C.; WASSERSTROM, L.; CARLQUIST, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Assessing the effect of d-xylose on the sugar signaling pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in strains engineered for xylose transport and assimilation. **FEMS Yeast Research**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-1, 5 jan. 2018.
- OUYANG, Y.; LI, Q.; KUANG, X.; WANG, H.; WU, J.; AYEPA, E.; CHEN, H.; ABRHA, G.T.; ZHANG, Z.; XI, L.; MA, M. *YMR152W* from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a novel aldehyde reductase for detoxification of aldehydes derived from lignocellulosic biomass. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S.L.], v. 131, n. 1, p. 39-46, jan. 2021.
- PACHECO, T.F.; MACHADO, B.R.; DE MORAIS JÚNIOR, W.G.; ALMEIDA, J.R.; GONÇALVES, S.B. Enhanced tolerance of *Spathaspora passalidarum* to sugarcane bagasse hydrolysate for ethanol production from xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S.L.], v. 193, n. 7, p.1-16, 8 mar. 2021.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p.25-33, ago. 2000.
- PANDEY, A.K.; KUMAR, M.; KUMARI, S.; KUMARI, P.; YUSUF, F.; JAKEER, S.; NAZ, S.; CHANDNA, P.; BHATNAGAR, I.; GAUR, N.A. Evaluation of divergent yeast genera for fermentation-associated stresses and identification of a robust sugarcane distillery waste isolate *Saccharomyces cerevisiae* NGY10 for lignocellulosic ethanol production in SHF and SSF. **Biotechnology for Biofuels**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-10, 27 fev. 2019.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 74, n. 1, p. 81-87, ago. 2000.
- PARK, S.E.; KOO, H.M.; PARK, Y.K.; PARK, S.M.; PARK, J.C.; LEE, O.K.; PARK, Y.C.; SEO, J.H. Expression of aldehyde dehydrogenase 6 reduces inhibitory effect of furan derivatives on cell growth and ethanol production in *Saccharomyces*

- cerevisiae*. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 102, n. 10, p. 6033-6038, maio 2011.
- PARTOW, S.; SIEWERS, V.; BJØRN, S.; NIELSEN, J.; MAURY, J. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, [S.L.], v. 27, n. 11, p. 955-964, nov. 2010.
- PETRACEK, M.E.; LONGTINE, M.S. PCR-based engineering of yeast genome. **Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology - Part B**, [S.L.], p. 445-469, 2002.
- PELETEIRO, S.; RIVAS, S.; ALONSO, J.L.; SANTOS, V.; PARAJÓ, J.C. Furfural production using ionic liquids: a review. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 202, p. 181-191, 2016.
- PELLEGRINI, V. de O.A.; RATTI, R.P.; FILGUEIRAS, J.G.; FALVO, M.; CORAL, M. A.L.; GUIMARAES, F.E.G.; DEAZEVEDO, E.R.; POLIKARPOV, I. Differences in chemical composition and physical properties caused by industrial storage on sugarcane bagasse result in its efficient enzymatic hydrolysis. **Sustainable Energy & Fuels**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 329-348, 2022.
- PENG, B.; WILLIAMS, T.C.; MATTHEW, H.; NIELSEN, L.K.; VICKERS, C.E. Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: a comparison of yeast promoter activities. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 1-11, jun. 2015.
- PEREIRA, I.O.; SANTOS, A.A. dos.; GUIMARÃES, N.C.; LIMA, C.L.; MATSUSHIKA, A.; RABELO, S.C.; STAMBUK, B.U.; IENCZAK, J.L. **First- and second-generation integrated process for bioethanol production: fermentation of sugarcane molasses and hemicellulosic hydrolysate by recombinant *Saccharomyces cerevisiae***. 2022 (submetido).
- PEREIRA, I. de O.; DOS SANTOS, A.A.; GONÇALVES, D.L.; PURIFICAÇÃO, M.; GUIMARÃES, N.C.; TRAMONTINA, R.; COUTOUNÉ, N.; ZANELLA, E.; MATSUSHIKA, A.; STAMBUK, B.U. Comparison of *Spathaspora passalidarum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for integration of first- and second-generation ethanol production. **FEMS Yeast Research**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 1-14, set. 2021.
- PETROVA, V.Y.; KUJUMDZIEVA, A.V. Robustness of *Saccharomyces cerevisiae* genome to antioxidative stress. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.24, n.1, p.474-483, 14 abr. 2014.
- PETROVA, V.Y.; RASHEVA, T.V.; KUJUMDZIEVA, A.V. Catalase enzyme in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.5, n.1, p.11-12, 5 abr. 2002.
- QIN, L.; DONG, S.; YU, J.; NING, X.; XU, K.; ZHANG, S.J; XU, L.; LI, B.Z.; LI, J.; YUAN, Y.J. Stress-driven dynamic regulation of multiple tolerance genes improves robustness and productive capacity of *Saccharomyces cerevisiae* in industrial

- lignocellulose fermentation. **Metabolic Engineering**, [S.L.], v. 61, p. 160-170, set. 2020.
- QU, C.; DAI, K.; FU, H.; WANG, J. Enhanced ethanol production from lignocellulosic hydrolysates by thermoanaerobacterium aotearoense SCUT27/ $\Delta$ argR1864 with improved lignocellulose-derived inhibitors tolerance. **Renewable Energy**, v.173, p.652-661, 2021.
- RACHAMONTREE, P.; DOUZOU, T.; CHEENKACHORN, K.; SRIARIYANUN, M.; RATTANAPORN, K. Furfural: a sustainable platform chemical and fuel. **Applied Science and Engineering Progress**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-10, jan. 2020.
- RÁCZ, H.V.; MUKHTAR, F.; IMRE, A.; RÁDAI, Z.; GOMBERT, A.K.; RÁTONYI, T.; NAGY, J.; PÓCSI, I.; PFLIEGLER, W.P. How to characterize a strain? Clonal heterogeneity in industrial *Saccharomyces* influences both phenotypes and heterogeneity in phenotypes. **Yeast**, [S.L.], v. 38, n. 8, p. 453-470, 5 maio 2021.
- RAJKUMARI, J.; DYAVAI AH, M.; SUDHARSHAN, S.J.; BUSI, S. Evaluation of in vivo antioxidant potential of *Syzygium jambos* (L.) Astlon and *Terminalia citrina* Roxb. towards oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Food Science and Technology**, [S.L.], v. 55, n. 11, p. 4432-4439, 19 set. 2018.
- RAYA, F.T.; ABREU, L.G.F. de; MARONE, M.P.; SALVADOR, M. de A.; BRESSIANI, J.A.; LABORDE, J.I. del R; PEREIRA, G.A.G. New feedstocks for bioethanol production: energy cane and agave. **Biofuel and Biorefinery Technologies**, [S.L.], p. 431-455, 2022.
- RFA, Renewable Fuel Association. **Annual fuel ethanol production: U.S. and World Ethanol production**. 2021. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>>. Acesso 06 set 2021.
- RIBEIRO, T.P.; FERNANDES, C.; MELO, K.V.; FERREIRA, S.S.; LESSA, J.A.; FRANCO, R.W.A.; SCHENK, G.; PEREIRA, M.D.; HORN, A. Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 80, p. 67-76, mar. 2015.
- ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of Second-Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. **Food Technology and Biotechnology**, [S.L.], v. 56, n. 2, p. 1-12, 2018.
- ROGOSKI, W.; PEREIRA, G.N.; CESCO, K.; SILVA, M.A. da; ZANELLA, E.; STAMBUK, B.U.; ÁVILA, P.F.; GOLDBECK, R.; OLIVEIRA, D. de; ANDRADE, C.J. de. Production of cassava peel-based xylooligosaccharides using endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Trichoderma longibrachiatum*: the effect of alkaline pretreatment. **Biomass Conversion And Biorefinery**, [S.L.], p. 1-13, 13 set. 2022.
- ROSSI, L.M.; GALLO, J.M.R.; MATTOSO, L.H.C.; BUCKERIDGE, M.S.; LICENCE, P.; ALLEN, D.T. Ethanol from sugarcane and the brazilian biomass-based energy and

- chemicals sector. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, [S.L.], v. 9, n. 12, p. 4293-4295, 29 mar. 2021.
- RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BETTIGA, M. Increased expression of the oxidative pentose phosphate pathway and gluconeogenesis in anaerobically growing xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v.8, n.1, p.1-12. 24 set. 2009.
- SALGADO, A.M.; FOLLY, R.O.M.; VALDMAN, B.; COS, O.; VALERO, F. Colorimetric method for the determination of ethanol by Flow Injection Analysis. **Biotechnology Letters**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 327-330, 2000.
- SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V.; CASTRO, E.; MOYA, A.J.; CAMACHO, F. The fermentation of mixtures of d-glucose and d-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [S.L.], v. 77, n. 6, p. 641-648, 4 abr. 2002.
- SANG, Y.; XUE, Q.; BAI, Z.; WANG, J.; CAO, L. Rational promoter elements and evolutionary engineering approaches for efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Renewable And Sustainable Energy**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 053104, set. 2016.
- SANTOS, A.A. dos. **Engenharia genômica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* visando prevenir a endocitose de transportadores de açúcares**. 2021. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.
- SARDI, M.; ROVINSKIY, N.; ZHANG, Y.; GASCH, A.P. Leveraging genetic-Background effects in *Saccharomyces cerevisiae* to improve lignocellulosic hydrolysate tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 82, n. 19, p. 5838-5849, out. 2016.
- SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 19-27, jan. 2012.
- SILVA, P.C.; CEJA-NAVARRO, J.A.; AZEVEDO, F.; KARAOZ, U.; BRODIE, E.L.; JOHANSSON, B. A novel d-xylose isomerase from the gut of the wood feeding beetle *Odontotaenius disjunctus* efficiently expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-50, 26 fev. 2021.
- SILVEIRA, J.M. da; SOARES, L.B.; CESCO, K.; SILVA, A.F.V. da; LONGO, L.; ZANELLA, E.; STAMBUK, B.U.; BIAZI, L.E.; IENCZAK, J.L. Immobilization of *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 in calcium alginate aiming the production of second-generation ethanol. **Bioenergy Research**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 264-279, 24 jul. 2021.

- SJ, S.; VEERABHADRAPPA, B.; SUBRAMANIYAN, S. DYAVAI AH, M. Astaxanthin enhances the longevity of *Saccharomyces cerevisiae* by decreasing oxidative stress and apoptosis. **FEMS Yeast Research**, [S.L.], p. 1-11, 12 out. 2018.
- SOARES, L.B.; BONAN, C.I.D.G.; BIAZI, L.E.; DIONÍSIO, S.R.; BONATELLI, M.L.; ANDRADE, A.L.D.; RENZANO, E.C.; COSTA, A.C.; IENCZAK, J.L. Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in *non-saccharomyces* species. **Biomass and Bioenergy**, [S.L.], v. 137, p. 105549, jun. 2020.
- SOCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P. de S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4820-4825, jul. 2010.
- STAMBUK, B. U. Yeasts: the leading figures on Bioethanol production. *In*: TREICHEL, H.; ALVES JÚNIOR, S.L.; FONGARO, G.; MÜLLER, C. (Org.). **Ethanol as a green alternative fuel: insight and perspectives**. 1ed. Hauppauge, N.Y: Nova Science, 2019. p.57-91.
- STAMBUK, B.U.; ELEUTHERIO, E.C.A; LUZ, F.; SOUTO-MAIOR, A.M. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Scientific and Industrial Research**. v. 67, n.11, p. 918-926, 2008.
- STAMBUK, B.U.; DUNN, B.; ALVES, S.L.; DUVAL, E.H.; SHERLOCK, G. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. **Genome Research**, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 2271-2278, 6 nov. 2009.
- STOVICEK, V.; DATO, L.; ALMQVIST, H.; SCHÖPPING, M.; CHEKINA, K.; PEDERSEN, L.E.; KOZA, A.; FIGUEIRA, D.; TJOSÁS, F.; FERREIRA, B.S. Rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of dicarboxylic acids from lignocellulosic biomass and exploring genetic mechanisms of the yeast tolerance to the biomass hydrolysate. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 15, n. 1, p. 22, 27 fev. 2022.
- STURTZ, L.A.; DIEKERT, K.; JENSEN, L.T.; LILL, R.; CULOTTA, V.C. A fraction of yeast Cu, Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 276, n. 41, p. 38084-38089, out. 2001.
- SUBRAMANIAM, Y.; MASRON, T.A. The impact of economic globalization on biofuel in developing countries. **Energy Conversion and Management: X**, [S.L.], v. 10, p. 100064, 2021.
- SUKWONG, P.; SUNWOO, I.Y.; JEONG, D.Y.; KIM, S.R.; JEONG, G.T.; KIM, S.K. Improvement of bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* through the deletion of GLK1, MIG1 and MIG2 and overexpression of PGM2 using the red

- seaweed *Gracilaria verrucosa*. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 89, p. 134-145, fev. 2020.
- TAHERZADEH, M.J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 53, n. 6, p. 701-708, 13 jun. 2000.
- TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects. **Biofuels**, [S.L.], p. 287-311, 2011.
- TAKAGI, H. Molecular mechanisms and highly functional development for stress tolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S.L.], v. 85, n. 5, p. 1017-1037, 12 fev. 2021.
- TANG, W.; WU, X.; HUANG, C.; LING, Z.; LAI, C.; YONG, Q. Natural surfactant-aided dilute sulfuric acid pretreatment of waste wheat straw to enhance enzymatic hydrolysis efficiency. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 324, p. 124651, mar. 2021.
- THOMAS, P.B.; KALUÇ, N.; AYBASTDER, Ö. SLX5 deletion confers tolerance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, [S.L.], v. 369, n. 1, p. 1-1, 2022.
- THOMPSON, O.A.; HAWKINS, G.M.; GORSICH, S.W.; DORAN-PETERSON, J. Phenotypic characterization and comparative transcriptomics of evolved *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved tolerance to lignocellulosic derived inhibitors. **Biotechnology for Biofuels**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-16, 20 set. 2016.
- UNICA, União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Produção de etanol bate recorde e abre caminho para RenovaBio**. 2019. Disponível em: <<https://unica.com.br/noticias/producao-de-etanol-bate-recorde-historico-e-abre-caminho-para-renovabio/>>. Acesso: 01 set 2022.
- UNICA, União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Safra 2021/2022 processa 523 milhões de toneladas de cana**. 2022. Disponível em: <<https://unica.com.br/noticias/safra-2021-2022-processa-523-milhoes-de-toneladas-de-cana/>>. Acesso: 03 set 2022.
- UNREAN, P.; GÄTGENS, J.; KLEIN, B.; NOACK, S.; CHAMPREDA, V. Elucidating cellular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* tolerant to combined lignocellulosic-derived inhibitors using high-throughput phenotyping and multiomics analyses. **FEMS Yeast Research**, [S.L.], v. 18, n. 8, p. 1-1, 25 set. 2018.
- US, ENERGY EFFICIENCY & RENEWABLE ENERGY. **Bioenergy Technologies Office**. 2022. Disponível em: <<https://www.energy.gov/eere/bioenergy/bioenergy-technologies-office>>. Acesso: 17 Set 2022.
- VANDENBERGHE, L.P.S.; VALLADARES-DIESTRA, K.K.; BITTENCOURT, G.A.; TORRES, L.A.Z.; VIEIRA, S.; KARP, S.G.; SYDNEY, E.B.; CARVALHO, J.C. de; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C.R. Beyond sugar and ethanol: the future of sugarcane

- biorefineries in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 167, p. 112721, out. 2022.
- VARIZE, C.S.; BÜCKER, A.; LOPES, L.D.; CHRISTOFOLETI-FURLAN, R.M.; RAPOSO, M.S.; BASSO, L.C.; STAMBUK, B.U. Increasing ethanol tolerance and ethanol production in an industrial fuel ethanol *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Fermentation**, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 470, 20 set. 2022.
- VEERABHADRAPPA, B.; SUBRAMANIAN, S.; SUDHARSHAN, S.J.; DYAVAIHAH, M. Evaluating the genetic basis of anti-cancer property of Taxol in *Saccharomyces cerevisiae* model. **FEMS Microbiology Letters**, [S.L.], v. 368, n. 13, p. 1-10, 6 jul. 2021.
- VISSER, E.M.; LEAL, T.F.; ALMEIDA, M.N. de; GUIMARÃES, V.M. Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. **Biotechnology for Biofuels**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-10, 22 jan. 2015.
- WANG, H.; LI, Q.; ZHANG, Z.; ZHOU, C.; AYEPA, E.; ABRHA, G.T.; HAN, X.; HU, X.; YU, X.; XIANG, Q. YKL107W from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a novel aldehyde reductase for detoxification of acetaldehyde, glycolaldehyde, and furfural. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 103, n. 14, p. 5699-5713, 21 maio 2019.
- WANG, S.; HE, Z.; & YUAN, Q. Xylose enhances furfural tolerance in *Candida tropicalis* by improving NADH recycle. **Chemical Engineering Science**, v.158, p.37-40, fev. 2017.
- WANG, Y.; ZHAN, P.; SHAO, L.; ZHANG, L.; QING, Y. Effects of inhibitors generated by dilute phosphoric acid plus steam-exploded poplar on *Saccharomyces cerevisiae* Growth. **Microorganisms**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1456, 19 jul. 2022.
- WEI, F.; LI, M.; WANG, M.; LI, H.; LI, Z.; QIN, W.; WEI, T.; ZHAO, J.; BAO, X. A C6/C5 co-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain with the alleviation of antagonism between xylose utilization and robustness. **Gcb Bioenergy**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 83-97, 24 nov. 2020.
- WONISCH, W.; SCHAUR, R.J.; BILINSKI, T.; ESTERBAUER, H. Assessment of growth inhibition by aldehydic lipid peroxidation products and related aldehydes by *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Biochemistry and Function**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 91-98, jun. 1995.
- XIONG, L.; ZENG, Y.; TANG, R.Q.; ALPER, H.S.; BAI, F.W.; ZHAO, X.Q. Condition-specific promoter activities in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-10, 10 abr. 2018.
- XU, K.; GAO, L.; HASSAN, J. UI; ZHAO, Z.; LI, C.; HUO, Y.X.; LIU, G. Improving the thermo-tolerance of yeast base on the antioxidant defense system. **Chemical Engineering Science**, [S.L.], v. 175, p. 335-342, jan. 2018.

- YATABE, F.; OKAHASHI, N.; SEIKE, T.; MATSUDA, F. Comparative <sup>13</sup>C-metabolic flux analysis indicates elevation of ATP regeneration, carbon dioxide, and heat production in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 2000438, 25 maio 2021.
- ZANELLA, E. **Influência de compostos furânicos em leveduras assimiladoras de pentoses**. 2018. Dissertação (Mestrado).. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Centro de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2018.
- ZHA, J.; SHEN, M.; HU, M.; SONG, H.; YUAN, Y. Enhanced expression of genes involved in initial xylose metabolism and the oxidative pentose phosphate pathway in the improved xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 27-39, 1 jan. 2014.
- ZHANG, H.; XU, Y.; YU, S. Co-production of functional xylooligosaccharides and fermentable sugars from corncob with effective acetic acid prehydrolysis. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 234, p. 343-349, jun. 2017.
- ZHAO, L.; SUN, Z.F.; ZHANG, C.C.; NAN, J.; REN, N.Q.; LEE, D.J.; CHEN, C. Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy production: challenges and perspectives. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 343, p. 126123, jan. 2022.
- ZHAO, M.J.; XU, Q.Q.; LI, G.M.; ZHANG, Q.Z.; ZHOU, D.; YIN, J.Z.; ZHAN, H.S. Pretreatment of agricultural residues by supercritical CO<sub>2</sub> at 50–80 °C to enhance enzymatic hydrolysis. **Journal of Energy Chemistry**, [S.L.], v. 31, p. 39-45, abr. 2019.
- ZHU, J.Y.; PAN, X. Efficient sugar production from plant biomass: current status, challenges, and future directions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 164, p. 112583, ago. 2022.
- ZHU, L.; LI, P.; SUN, T.; KONG, M.; LI, X.; ALI, S.; LIU, W.; FAN, S.; QIAO, J.; LI, S. Overexpression of SFA1 in engineered *Saccharomyces cerevisiae* to increase xylose utilization and ethanol production from different lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 313, p. 123724, out. 2020.
- ZHU, Y.; ZHANG, J.; ZHU, L.; JIA, Z.; LI, Q.; XIAO, W.; CAO, L. Minimize the xylitol production in *Saccharomyces cerevisiae* by balancing the xylose redox metabolic pathway. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S.L.], v. 9, p. 1-10, 26 fev. 2021.

**Publicações em coautoria durante o doutoramento:**

LEONARSKI, E.; CESCA, K.; ZANELLA, E.; STAMBUK, B.U.; OLIVEIRA, D. de.; POLETTO, P. Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola byproduct as raw material. **Lwt**, [S.L.], v. 135, p. 110075, jan. 2021.

MARTÍNEZ-JIMENEZ, F.D.; PEREIRA, I.O.; RIBEIRO, M.P.A.; SARGO, C.R.; SANTOS, A.A. dos.; ZANELLA, E.; STAMBUK, B.U.; IENCZAK, J.L.; MORAIS, E.R.; COSTA, A.C. Integration of first- and second-generation ethanol production: evaluation of a mathematical model to describe sucrose and xylose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Renewable Energy**, [S.L.], v. 192, p. 326-339, jun. 2022.

PEREIRA, G.N.; CESCA, K.; CUBAS, A.L.V.; BIANCHET, R.T.; JUNIOR-BORDIGNON, S.E.; ZANELLA, E.; STAMBUK, B.U.; POLETTO, P.; OLIVEIRA, DÉBORA de. Non-thermal plasma as an innovative pretreatment technology in delignification of brewery by-product. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S.L.], v. 74, p. 102827, dez. 2021.

PEREIRA, G.N.; CESCA, K.; PEREIRA, M.A.; BORGES, O.M.A.; CUBAS, A.L.V.; ZANELLA, E.; STAMBUK, B.U.; POLETTO, P.; OLIVEIRA, DÉBORA de. Non-thermal plasma as an efficient pretreatment to lignocellulosic raw materials. **Journal of Food Process Engineering**. 2022 (submetido).

PEREIRA, I.O.; SANTOS, A.A. dos.; GONÇALVES, D.L.; PURIFICAÇÃO, M.; GUIMARÃES, N.C.; TRAMONTINA, R.; COUTOUNÉ, N.; ZANELLA, E.; MATSUSHIKA, A.; STAMBUK, B.U.; IENCZAK, J.L. Comparison of *Spathaspora passalidarum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for integration of first- and second-generation ethanol production. **Fems Yeast Research**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 1-15, set. 2021.

PEREIRA, M.A.; MONTEIRO, C.R.M.; PEREIRA, G.N.; JÚNIOR-BORDIGNON, S.E.; ZANELLA, E.; ÁVILA, F.P.; STAMBUK, B.U.; GOLDBECK, R.; OLIVEIRA, D. de.; POLETTO, P. Deconstruction of banana peel for carbohydrate fractionation. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 297-306, 18 set. 2020.

ROGOSKI, W.; PEREIRA, G.N.; CESCA, K.; DA SILVA, M.A.; ZANELLA, E.; STAMBUK, B.; ÁVILA, P.F.; GOLDBECK, R.; OLIVEIRA, D. ANDRADE, C.J. Production of cassava peel-based xylooligosaccharides using endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Trichoderma longibrachiatum*: the effect of alkaline pretreatment. **Biomass Conversion And Biorefinery**, [S.L.], p. 1-15, 13 set. 2022.

SILVEIRA, J.M.; SOARES, L.B.; CESCA, K.; DA SILVA, A.F.V.; LONGO, L.; ZANELLA, E.; STAMBUK, B.U.; BIAZI, L.E.; IENCZAK, J.L. Immobilization of *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 in Calcium Alginate Aiming the Production of Second-Generation Ethanol. **Bioenergy Research**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 264-279, 24 jul. 2021.

**APÊNDICE A - Cofermentação em batelada simples das linhagens CENPK-X-RDK e sCTA1 em meios ricos YP contendo 40 g L<sup>-1</sup> de glicose e 20 g L<sup>-1</sup> de xilose. Os dados expressam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes (n=2).**

