

Bruna Raquel de Souza

**ANÁLISE DA TOLERÂNCIA AOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS
POR LEVEDURAS POTENCIALMENTE UTILIZADAS NA
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Trabalho apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

Coorientador: Me. Junior Romeo Deoti

Florianópolis
2017

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

Souza, Bruna Raquel de
Análise da tolerância aos ácidos carboxílicos por
leveduras potencialmente utilizadas na produção de etanol
de segunda geração / Bruna Raquel de Souza ; orientador,
Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk ; coorientador, Junior
Romeo Deoti. - Florianópolis, SC, 2017.
100 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Spathaspora passalidarum. 3.
Saccharomyces cerevisiae. 4. transaldolase (TAL1). 5.
inibidores de hidrolisados lignocelulósicos. I. Stambuk,
Boris Juan Carlos Ugarte. II. Deoti, Junior Romeo. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. IV. Título.

Bruna Raquel de Souza

**ANÁLISE DA TOLERÂNCIA AOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS
POR LEVEDURAS POTENCIALMENTE UTILIZADAS NA
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Trabalho julgado e aprovado em sua forma final pelos membros da banca examinadora.

Florianópolis, 6 de fevereiro de 2017.

Dra. Maria Risoleta Freire Marques
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof Dr. Diogo Robl
Universidade Federal de Santa Catarina

À minha mãe, meu exemplo de vida,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Boris Stambuk por ter me concedido a oportunidade de fazer parte do seu grupo de trabalho e por ter me orientado ao longo de todos esses anos.

Ao mestrando Junior Deoti pelos seus ensinamentos, paciência e amizade.

À toda a equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras pelo companheirismo e momentos de descontração. Em especial, agradeço à mestranda Ângela dos Santos por sempre ter me ajudado e por ter sido uma segunda coorientadora, amiga e, às vezes, mãe.

Aos amigos que me acompanharam nos experimentos noturnos e garantiram a minha segurança, e àqueles que, mesmo não me acompanhando fisicamente, sempre se preocuparam comigo.

Aos meus professores de graduação que instigaram a minha curiosidade e despertaram o meu senso crítico.

À minha família e, especialmente, à minha mãe e à minha avó que me apoiaram incondicionalmente durante toda essa jornada e que nunca deixaram eu desistir dos meus sonhos.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, meu muito obrigada!

RESUMO

O etanol de segunda geração (2G) é o etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos como o bagaço da cana-de-açúcar. Todavia, a produção do etanol 2G ainda é limitada pela falta de um microrganismo que seja, ao mesmo tempo, capaz de fermentar xilose e tolerar compostos inibitórios como os ácidos carboxílicos. Dentre as alternativas utilizadas para viabilizar tal organismo estão (1) o isolamento de leveduras que naturalmente possuam as características desejadas, e (2) a modificação genética de leveduras de espécies conhecidas. Dentre as leveduras que naturalmente fermentam xilose, a espécie *Spathasphora passalidarum* tem se destacado por sua excelente capacidade de converter esta pentose em etanol. Todavia, a tolerância desta levedura frente aos ácidos carboxílicos ainda é pouco conhecida e deve ser analisada. Dentre as leveduras que foram geneticamente modificadas para fermentar xilose, encontram-se linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*. A fermentação da xilose por essas linhagens foi possibilitada por uma série de modificações genéticas que hoje já são bem estabelecidas. Essas linhagens, entretanto, continuam sendo fortemente inibidas pela presença dos ácidos carboxílicos, de forma que, modificações genéticas adicionais são necessárias para torná-las mais tolerantes à esses inibidores. Dentre as modificações mais promissoras, encontra-se a sobre expressão do gene *TALI*. Esse gene codifica uma transaldolase da fase não oxidativa da via das pentoses fosfato e a sua sobre-expressão já mostrou que melhora a tolerância de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* frente ao ácido acético e ao ácido fórmico. Todavia, os trabalhos que realizaram a sobre-expressão do gene *TALI* utilizaram linhagens laboratoriais de *S. cerevisiae* que, sabidamente, são menos robustas do que linhagens industriais. Recentemente, nosso grupo de pesquisa construiu uma linhagem *S. cerevisiae* (JDY-01) de origem industrial que, além de conter as modificações necessárias para fermentar xilose, sobre-expressa o gene *TALI*. O perfil de crescimento e o perfil fermentativo desta linhagem na presença de concentrações crescentes de ácido acético ou de ácido fórmico foi analisado neste trabalho. Além disso, o presente trabalho avaliou a tolerância da levedura *S. passalidarum* (UFMG-HMD 2.1) frente aos mesmos ácidos. Todas as análises foram feitas utilizando xilose e/ou glicose como fonte de carbono. Os resultados para a levedura *S. passalidarum* mostraram que a levedura é altamente sensível aos ácidos testados, sendo intolerante a concentrações tão baixas quanto 30 mM de ácido acético ou 6 mM de ácido fórmico. A sensibilidade da levedura foi

independente da fonte de carbono e indicou que dificilmente esta levedura poderia ser empregada na produção de etanol 2G. Os resultados para a linhagem JDY-01 mostraram que, quando crescida na presença de xilose e em condições aeróbias, a linhagem teve a sua tolerância ao ácido acético melhorada pela sobre-expressão do gene *TALI*. Nestas condições, a cepa foi capaz de crescer na presença de até 60 mM de ácido acético. Igualmente, na co-fermentação de xilose e glicose acrescida de 30 mM de ácido acético, a cepa se mostrou levemente mais tolerante à presença deste inibidor. A tolerância observada foi acompanhada por uma leve melhora na co-fermentação da xilose. Todavia, quando apenas xilose estava presente no meio, a sobre-expressão do gene *TALI* não interferiu no perfil fermentativo da linhagem JDY-01. De forma similar, a sobre-expressão do gene *TALI* não melhorou a tolerância da linhagem ao ácido fórmico. O fato da sobre-expressão do gene *TALI* não ter melhorado a tolerância da linhagem JDY-01, parece estar associado a problemas nas etapas iniciais da via de metabolização da xilose, ou à baixa expressão do gene.

Palavras-chave: transaldolase (*TALI*), *Spathaspora passalidarum*, xilose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura lignocelulósica.....	21
Figura 2 - Desenho esquemático da metabolização da pentose xilose em leveduras	24
Figura 3 - Crescimento em microescala (painel esquerdo) e produção de etanol (painel direito) da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de xilose e concentrações crescentes de (A) ácido acético e (B) ácido fórmico.....	38
Figura 4 - Crescimento em microescala (painel esquerdo) e produção de etanol (painel direito) da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de glicose e concentrações crescentes de (A) ácido acético e (B) ácido fórmico.....	39
Figura 5 - Crescimentos aeróbio da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de xilose.....	41
Figura 6 - Crescimentos aeróbio da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de xilose e 30 mM (A) e 60 mM (B) de ácido acético.....	42
Figura 7 - Crescimentos aeróbio da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de xilose e 6 mM (A) e 10 mM (B) de ácido acético.....	43
Figura 8 - Crescimentos aeróbio da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de glicose.....	45
Figura 9 - Crescimentos aeróbio da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de glicose e (A) 30 mM ou (b) 60 mM de ácido acético.....	46
Figura 10 - Crescimentos aeróbio da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de glicose e 6 mM (A) ou 10 mM (B) de ácido fórmico.....	47
Figura 11 - Perfil fermentativo da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose.....	49
Figura 12 - Perfil fermentativo da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético; (C) 6 mM ou (D) 10 mM de ácido fórmico.....	50
Figura 13 - Perfil fermentativo da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose.....	51
Figura 14 - Perfil fermentativo da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose e (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético; (C) 6 mM ou (D) 10 mM de ácido fórmico.....	52

Figura 15 - Perfil fermentativo da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose.....	54
Figura 16 - Perfil fermentativo da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose e (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético.....	56
Figura 17 - Perfil fermentativo da levedura <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose e (A) 6 mM ou (B) 10 mM de ácido fórmico.....	57
Figura 18 - Perfil de microcrescimento (painel esquerdo) e de produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e concentrações crescentes de ácido acético.....	60
Figura 19 - Perfil de microcrescimento (painel esquerdo) e de produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e concentrações crescentes de ácido fórmico.....	60
Figura 20 - Perfil de microcrescimento (painel esquerdo) e de produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose e concentrações crescentes de ácido acético.....	61
Figura 21 - Perfil de microcrescimento (painel esquerdo) e de produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e concentrações crescentes de ácido acético.....	61
Figura 22 - Perfil de crescimento aeróbio (painel esquerdo), de consumo de açúcar (painel central) e de produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose.....	65
Figura 23 - Perfil de crescimento aeróbio (painel esquerdo), de consumo de açúcar (painel central) e de produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético.....	66
Figura 24 - Perfil de crescimento aeróbio (painel esquerdo), de consumo de açúcar (painel central) e de produção de etanol (painel direito) das linhagens MP--P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e (A) 6 mM ou (B) 10 mM de ácido fórmico.....	67
Figura 25 - Perfil de crescimento aeróbio (painel esquerdo), de consumo de açúcar (painel central) e de produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose.....	70

Figura 26 - Perfil de crescimento aeróbio (painel esquerdo), de consumo de açúcar (painel central) e de produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose e (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético.....	71
Figura 27 - Perfil de crescimento aeróbio (painel esquerdo), de consumo de açúcar (painel central) e de produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JD-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose e (A) 6 mM ou (B) 10 mM de ácido fórmico.....	72
Figura 28 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose.....	74
Figura 29 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e (A) 30 mM ou (60) mM de ácido acético.....	75
Figura 30 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e (A) 6 mM ou (B) 10 mM de ácido fórmico.....	76
Figura 31 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose.....	79
Figura 32 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose e (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético.....	80
Figura 33 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose e (A) 6 mM ou (B) 10 mM de ácido fórmico.....	81
Figura 34 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose.....	83
Figura 35 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose e 30 mM de ácido acético.....	86
Figura 36 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose e 60 mM de ácido acético.....	87
Figura 37 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose e 6 mM de ácido fórmico.....	88
Figura 38 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose e 10 mM de ácido fórmico.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens de leveduras utilizadas.....	33
Tabela 2 – Concentrações de ácido acético ou ácido fórmico utilizadas nos crescimentos em microescala.....	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 ESTRUTURA LIGNOCELULÓSICA	20
1.2 DESAFIOS DO ETANOL 2G	21
1.2.1 Ácidos carboxílicos	21
1.2.2 Metabolismo da xilose.....	23
1.3 SUPERANDO OS DESAFIOS DOS INIBIDORES E DO METABOLISMO DA XILOSE.....	25
1.3.1 Espécies selvagens naturalmente fermentadoras de xilose – <i>Sapathaspora passalidarum</i>	26
1.3.2 Linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinantes	27
1.4 MODIFICAÇÕES GENÉTICAS ADICIONAIS EM <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 LINHAGENS E MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS	33
3.2 CRESCIMENTO EM MICROESCALA	34
3.3 CRESCIMENTO AERÓBIOS.....	35
3.4 FERMENTAÇÃO EM BATELADA SIMPLES	35
3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES, ÁCIDOS E METABÓLITOS	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 ANÁLISE EM MICROESCALA DA TOLERÂNCIA DA LEVEDURA <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 FRENTE AO ÁCIDO ACÉTICO E AO ÁCIDO FÓRMICO.....	37
4.2 ANÁLISE DO CRESCIMENTO AERÓBIO DA LEVEDURA <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 NA PRESENÇA DE ÁCIDO ACÉTICO OU ÁCIDO FÓRMICO	40
4.2.1 Crescimentos aeróbios em xilose	40
4.2.2 Crescimentos aeróbios em glicose.....	44
4.3 ANÁLISE DO PERFIL FERMENTATIVO DA LEVEDURA <i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD 2.1 FRENTE AO ÁCIDO ACÉTICO E AO ÁCIDO FÓRMICO.....	48
4.4 ANÁLISE EM MICROESCALA DA TOLERÂNCIA DAS LINHAGENS MP-P5 E JDY-01 FRENTE AO ÁCIDO ACÉTICO E AO ÁCIDO FÓRMICO.....	58

4.5 ANÁLISE DO CRESCIMENTO AERÓBIO DAS LINHAGENS MP-P5 E JDY-01 NA PRESENÇA DE ÁCIDO ACÉTICO OU ÁCIDO FÓRMICO	62
4.5.1 Crescimentos aeróbios em xilose	62
4.5.2 Crescimentos aeróbios em glicose	68
4.6 ANÁLISE DO PERFIL FERMENTATIVO DAS LINHAGENS MP-P5 E JDY-01 FRENTE AO ÁCIDO ACÉTICO E AO ÁCIDO FÓRMICO	73
4.6.1 Fermentação em batelada simples em xilose	73
4.6.2 Fermentação em batelada simples em glicose.....	78
4.6.3 Co-fermentação de xilose e glicose em batelada simples	82
5 CONCLUSÕES.....	91
6 REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os biocombustíveis vêm ganhando destaque em países que desejam diversificar sua matriz energética e diminuir sua dependência em relação aos combustíveis derivados de petróleo (SÁNCHEZ & CARDONA, 2008; MATSUSHIKA *et al.*, 2009). O etanol, em especial, tem se sobressaído como o biocombustível mais utilizado no mundo (SÁNCHEZ & CARDONA, 2008) e como uma opção mais limpa do que a gasolina (GOLDEMBERG, 2008).

No Brasil, o etanol é produzido em larga escala desde a década de 1970. A produção nacional do álcool começou como uma estratégia do governo brasileiro para diminuir as importações de petróleo. Para isso, em 1975, o governo brasileiro instituiu o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) e, através de uma série de subsídios econômicos, incentivou a produção de etanol pela indústria nacional (GOLDEMBERG, 2008). A cana-de-açúcar, que se encontrava em excesso nas industriais açucareiras devido à crise no setor (ROSILLO-CALLE & CORTEZ, 1998), foi redirecionada para a produção do álcool e tornou-se a principal matéria-prima do etanol brasileiro (SOCOOL *et al.*, 2005; KOHLHEPP, 2010). Os incentivos do governo e o desenvolvimento de novas tecnologias fizeram com que o Brasil ganhasse uma posição de destaque mundial na produção desse biocombustível. Hoje, o Brasil é o segundo maior produtor de etanol no mundo (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2017), tendo produzido 30 bilhões de litros deste álcool somente em 2016 (BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL, 2016).

O combustível comercializado atualmente no país é chamado de etanol de primeira geração (1G). A produção deste álcool nas usinas brasileiras é feita através da fermentação da sacarose presente no caldo da cana-de-açúcar (GOLDEMBERG & GUARDABASSI, 2010). No processo de conversão da cana em etanol, a planta é primeiramente moída para que o seu caldo seja extraído. Uma vez extraído, o caldo pode ser utilizado tanto para a produção do combustível, quanto para a produção de açúcar. Caso seja utilizado para produção do álcool, após um tratamento de calagem, o caldo passa a ser fermentado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ao final do processo fermentativo, o etanol produzido é recuperado em destiladores (NOVA CANA, 2017).

Uma das consequências da produção do etanol brasileiro é a formação de grandes quantidades de resíduos, dentre eles o bagaço e a palha da cana-de-açúcar (PEREIRA *et al.*, 2015). Na moagem da cana para extração do seu caldo, para cada tonelada de cana processada,

aproximadamente 140 kg de bagaço em base seca são formados (DIAS *et al.*, 2011). Esse bagaço é, em grande parte, queimado para produção de energia, a qual é utilizada nas próprias usinas (GOLDEMBERG & GUARDABASSI, 2010). Todavia, o bagaço da cana-de-açúcar é um material rico em açúcares potencialmente fermentáveis que poderiam ser utilizados para produção de etanol de 2G, etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos (DIAS *et al.*, 2011). A produção de etanol 2G é uma alternativa para que o total de etanol produzido por tonelada de cana seja aumentado, sem que as áreas de cultivo da planta sejam expandidas (PEREIRA Jr *et al.*, 2008). Além disso, a produção do etanol 2G é economicamente interessante uma vez que utiliza um insumo abundante, barato e disponível localmente (DIAS *et al.*, 2012).

1.1 ESTRUTURA LIGNOCELULÓSICA

O bagaço da cana-de-açúcar é composto basicamente por três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é o maior componente do bagaço da cana-de-açúcar, e consiste em um polissacarídeo formado por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β 1 \rightarrow 4. A hemicelulose é o segundo maior componente do bagaço da cana-de-açúcar, e consiste em um polissacarídeo heterogêneo e ramificado formado por pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, glicose e galactose). A lignina, por sua vez, é formada pela polimerização dos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico. O papel da lignina é o de envolver as frações celulósicas e hemicelulósicas, dando suporte estrutural para essas frações e protegendo-as contra ataques de microrganismos (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008; QUINTERO *et al.*, 2013).

As frações de celulose e hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar concentram os monossacarídeos fermentescíveis que servem de insumo para a produção do etanol 2G (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000; MATSHUSIKA *et al.*, 2012). Esses açúcares, no entanto, não se encontram prontamente disponíveis para fermentação e são difíceis de serem liberados devido à associação covalente da lignina com as frações de celulose e hemicelulose (MARTÍN *et al.*, 2007, CARDONA *et al.* 2010). A associação da lignina e a complexidade da lignocelulose fazem com que o bagaço seja uma estrutura pouco porosa e altamente resistente à hidrólise (COSTA, 2012). De forma que, torna-se necessário que o bagaço passe por um tratamento inicial que aumente a

porosidade desse material e facilite a liberação dos seus açúcares constituintes.

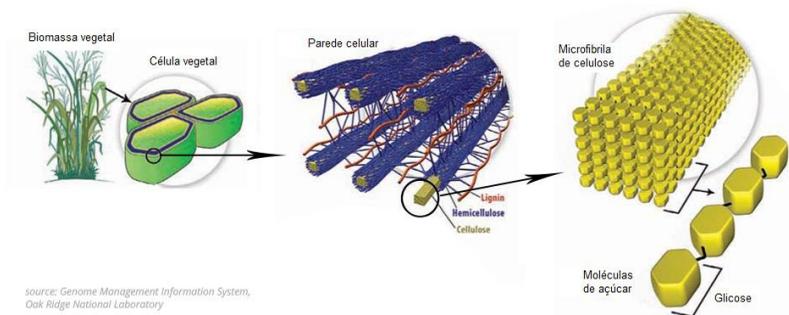


Figura 1 – Estrutura lignocelulósica. Adaptado de: Genome Management Information System (2017).

A etapa onde a porosidade do material lignocelulósico é aumentada é chamada de pré-tratamento. No pré-tratamento, a aplicação de uma série de métodos químicos (e.g. ozonólise), físico-químicos (e.g. explosão a vapor) e/ou biológicos (e.g. enzimas) (1) desestruturaram o complexo lignocelulósico, (2) removem a lignina, (3) hidrolisam parcialmente a hemicelulose, e (4) reduzem a cristalinidade da celulose (SUN & CHENG, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2007; SÁNCHEZ & CARDONA, 2008; JÖNSSON, *et al.*, 2013). Em conjunto, essas quatro ações desestruturam a lignocelulose e deixam a celulose e a hemicelulose mais susceptível à hidrólise.

Na etapa da hidrólise, os monômeros constituintes das frações celulósica e hemicelulósica são liberados através da aplicação de enzimas celulolíticas/hemicelulolíticas ou de ácidos concentrados (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000; SÁNCHEZ & CARDONA, 2008). Independente do método escolhido, a hidrólise da celulose resulta na liberação exclusiva de monômeros de glicose, enquanto que a hidrólise da hemicelulose resulta também na liberação de uma quantidade significativa de xilose (PEREIRA Jr, 2008; SÁNCHEZ & CARDONA, 2008; MATUSHIKA *et al.*, 2009, 2012; HASUNUMA *et al.*, 2011).

1.2 DESAFIOS DO ETANOL 2G

1.2.1 Ácidos carboxílicos

As condições empregadas tanto no pré-tratamento quanto na hidrólise de materiais lignocelulósicos favorecem a formação de subprodutos capazes de inibir a fermentação dos açúcares presentes nos hidrolisados (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2007; JÖNSSON, *et al.*, 2013). A presença desses inibidores tem se revelado um impasse para produção de etanol 2G porque, os efeitos negativos desses compostos sobre o metabolismo dos microrganismos fermentadores, diminuem o rendimento de etanol (Van MARIS *et al.*, 2006, ALMEIDA *et al.*, 2007, GIRIO *et al.*, 2010). Os tipos de inibidores formados e a concentração desses compostos dependem do material utilizado e das condições de tratamento empregadas. Todavia, a formação desses inibidores é especialmente favorecida pelos métodos de pré-tratamento que utilizam ácidos e/ou altas temperaturas (GIRIO *et al.*, 2010, CARDONA *et al.*, 2010), e menos favorecidas por métodos como a hidrólise enzimática, que utilizam condições mais brandas de pH e temperatura (CARDONA *et al.*, 2010, JÖNSSON, *et al.*, 2013).

Em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, os ácidos carboxílicos recebem papel de destaque porque são os inibidores encontrados em maior proporção (PEREIRA *et al.*, 2015). De forma similar ao que acontece com os outros inibidores, a concentração destes ácidos nos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar também varia de acordo com o tratamento utilizado. Entretanto, em hidrolisados obtidos via pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (DE BARROS *et al.*, 2013; BENJAMIN *et al.*, 2014), ou via pré-tratamento a vapor (ALMEIDA *et al.*, 2007), o ácido acético e o ácido fórmico são os inibidores encontrados em maiores concentrações¹. A formação desses ácidos ocorre, respectivamente, através da desacetilação da hemicelulose e da degradação de outros compostos inibitórios como o hidroximetilfurfural e o furfural (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2007; JÖNSSON, *et al.*, 2013).

Os mecanismos de inibição desses ácidos ainda não estão completamente esclarecidos, mas parecem estar relacionados com o desacoplamento e acúmulo intracelular de ânions. De acordo com a hipótese do desacoplamento, a forma não dissociada do ácido difunde-se através da membrana plasmática para o meio intracelular. Uma vez dentro da célula, o ácido se dissocia no seu respectivo ânion e próton H⁺ devido ao pH citosólico (7,0)². A dissociação do ácido leva à acidificação do pH

¹Nessa condição já foram reportadas concentrações de até 70 mM de ácido acético e 30 mM de ácido fórmico.

² PKa do ácido acético = 4,74 (25 °C), pKa do ácido fórmico = 3,75 (20 °C).

citossólico e a célula ativa uma série de mecanismos de destoxificação em uma tentativa de manter o pH intracelular. Dentre esses mecanismos de destoxificação, encontram-se ATPases de membrana que, ao custo de ATP, bombeiam os prótons em excesso para fora da célula. Todavia, o ATP gasto para manutenção do pH intracelular deixa de ser utilizado para formação de biomassa celular e afeta o crescimento da célula. Principalmente, as atividades das ATPases de membrana geram um déficit energético que pode extinguir os níveis de ATP celular e, em última instância, levar à morte da célula (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2007; JÖNSSON, *et al.*, 2013).

Ainda, de acordo com a hipótese do acúmulo intracelular de ânions, uma vez que o ácido se dissocia no citosol, o ânion formado é capturado pela célula. A forma não dissociada do ácido, passa então a difundir ainda mais para o interior celular numa tentativa de alcançar o equilíbrio entre as concentrações das formas dissociadas e não dissociadas. Como a concentração das formas dissociadas e não dissociadas ocorre em função do pH, o gradiente de pH existente entre o meio de cultivo (5,0) e o interior celular (7,0) impede que o equilíbrio seja alcançado (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2007). Como consequência, a forma não dissociada do ácido difunde cada vez mais para dentro da célula.

1.2.2 Metabolismo da xilose

Para que a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos como o bagaço da cana-de-açúcar se torne uma tecnologia economicamente viável, todos os açúcares mobilizados no tratamento deste material devem ser fermentados à etanol, inclusive a xilose. A xilose é o segundo monossacarídeo mais abundante nos hidrolisados lignocelulósicos e, apesar de várias leveduras serem capazes de metabolizar essa pentose, apenas uma pequena fração dessas leveduras são capazes de fermentá-la à álcool (Van MARIS *et al.*, 2006, HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2007). Em virtude disto, a metabolização de xilose é um outro desafio à produção do etanol 2G.

Como pode ser visto na Figura 2, em leveduras, as primeiras etapas da metabolização da xilose envolvem a conversão desta pentose em xilulose por uma reação de redução e outra de oxidação. Mais especificamente, uma vez dentro da célula, a xilose é reduzida à xilitol pela enzima xilose redutase (XR), e o xilitol formado é oxidado à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH). A xilulose é então fosforilada

à xilulose-5-fosfato (X5P) pela xilulocinase (XK), via o consumo de uma molécula de ATP. A X5P formada entra então na via das pentoses fosfato (PPP) onde continua sendo metabolizada (revisto por Van MARIS *et al.*, 2006; e por MATUSHIKA *et al.*, 2009).

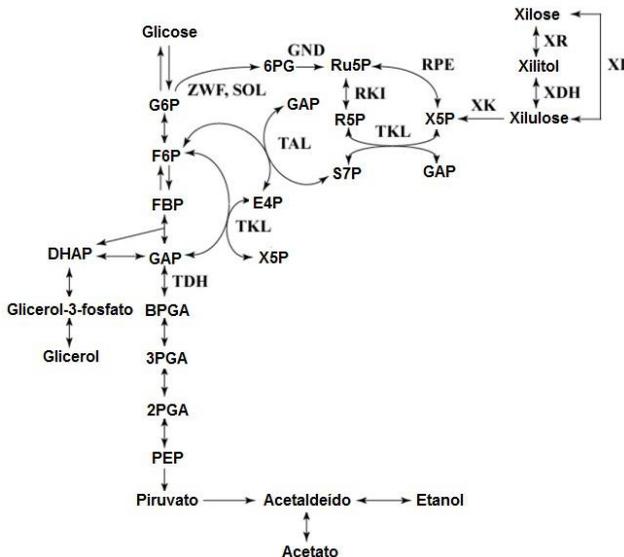


Figura 2: Desenho esquemático do metabolismo da xilose em leveduras. Adaptado de: Hasunuma *et al.* 2011. Abreviações: BPGA, 1,3-bisfosfoglicerato; fosfato; S7P, sedoheptulose-7-fosfato; X5P, xilulose-5-fosfato. Enzimas são indicadas pelo seu símbolo genético atribuído: GND, 6-fosfogluconato desidrogenase; SOL, 6-fosfogluconolactonase; TAL, transaldolase; TDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; TKL, transcetolase; RPE, ribulose-5-fosfato 4-epimerase; RKI, ribose-5-fosfato isomerase; XI, xilose isomerase; XK, xilulocinase; XDH, xilitol desidrogenase; XR, xilose redutase; ZWF, glicose-6-fosfato desidrogenase.

A PPP é essencial para a metabolização da xilose porque produz intermediários da via glicolítica (MATUSHIKA *et al.*, 2009). A produção desses intermediários conecta a PPP e a via glicolítica e, assim, permite que, em teoria, a xilose seja convertida à etanol. Na fase não oxidativa da PPP, a X5P proveniente das primeiras etapas de assimilação da xilose, é convertida junto com a ribose-5-fosfato (R5P) em sedoheptulose-7-fosfato (S7P) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP) pela enzima transcetolase (TKL). No passo seguinte, a S7P e o GAP são convertidos à eritreose-4-

fosfato (E4P) e frutose-6-fosfato (F6P) pela enzima transaldolase (TAL). Por fim, a E4P e a X5P são convertidas em GAP e F6P. O GAP e a F6P são duas moléculas intermediárias da via glicolítica e, uma vez formadas, entram nesta via para serem, potencialmente, convertidas à etanol (revisto por HASUNUMA *et al.* 2011).

É importante ressaltar que a discrepância entre o grande número de leveduras que podem assimilar xilose, e o baixo número de leveduras que eficientemente fermentam essa pentose à etanol, está relacionado com impasses intrínsecos à metabolização da xilose como o desbalanço redox. Nas primeiras etapas de assimilação da xilose a eficiente conversão desta pentose à xilulose depende do balanço redox entre as enzimas XR e XDH. Isso porque essas enzimas têm preferências distintas pelos cofatores NAD(P)H/NAD⁺. Enquanto a XR pode utilizar tanto o cofator NADPH quanto o cofator NADH, a enzima XDH mostra-se NAD⁺ dependente. Em leveduras onde a enzima XR utiliza, preferencialmente, o cofator NADPH, a diferença na utilização de cofatores gera um desbalanço redox intracelular que é especialmente evidente em condições limitadas de oxigênio. Isso porque na ausência de oxigênio o cofator NAD⁺ não é regenerado em quantidades suficientes, enquanto o NADPH é regenerado pela via das pentoses fosfato. A regeneração insuficiente de NAD⁺ interrompe a metabolização da xilose e leva ao acúmulo do substrato da XDH, o xilitol. Uma vez que a atividade da enzima XDH é restringida pela ausência do cofator NAD⁺ e o xilitol é acumulado, a xilose assimilada pela levedura acaba não entrando na PPP e não é convertida à etanol (revisto por Van MARIS *et al.*, 2006; e por MATUSHIKA *et al.*, 2009).

1.3 SUPERANDO OS DESAFIOS DOS INIBIDORES E DO METABOLISMO DA XILOSE

Conforme apresentado, a tecnologia do etanol 2G ainda é limitada pela presença de compostos inibitórios nos hidrolisados lignocelulósicos e pela necessidade de se converter a xilose à etanol. Essas limitações impõem que o microrganismo utilizado na produção do etanol 2G seja capaz de fermentar xilose e, ao mesmo tempo, tolerar os inibidores presentes nos hidrolisados lignocelulósicos (SANDA *et al.*, 2011). Para viabilizar tal organismo duas estratégias podem ser utilizadas: (1) o isolamento de espécies selvagens de naturalmente possuam as características desejadas, ou (2) a modificação genética de

espécies já conhecidas de leveduras como a espécie *Saccharomyces cerevisiae* (JÖNSSON, *et al.*, 2013).

1.3.1 Espécies selvagens naturalmente fermentadoras de xilose – *Spathaspora passalidarum*

Uma variedade de microrganismos já se mostrou naturalmente capaz de fermentar pentoses. Dentre estes microrganismos, leveduras capazes de fermentar a pentose xilose já foram reportadas entre os gêneros *Candida* sp., *Scheffersomyces* sp. e *Spathaspora* sp. (NGUYEN *et al.*, 2006; CADETE *et al.*, 2009; CADETE *et al.* 2012; CADETE *et al.* 2016). Notavelmente, os gêneros *Candida* sp. e *Scheffersomyces* sp. possuem espécies fermentadoras de xilose estudadas há décadas. Todavia, as espécies dentro desses gêneros parecem ser inviáveis à produção de etanol 2G pelo fato de necessitarem de condições controladas de oxigenação para que a fermentação da xilose ocorra (revisto por HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2007; e por KUHAD *et al.*, 2011). Por outro lado, o gênero *Spathaspora* sp. tem revelado ser uma das espécies capazes de consumir grandes volumes de xilose tanto em aerobiose quanto em microaerobiose (HOU, 2012). Dentre estas espécies, destaca-se a *S. passalidarum*.

A espécie *S. passalidarum* foi isolada do intestino de besouros decompositores de madeira por Nguyen e col. em 2006. O isolamento desta espécie é considerado recente, mas a espécie já é reconhecida por possuir algumas das melhores linhagens fermentadoras de xilose conhecidas na atualidade³ (CADETE *et al.*, 2016). Aparentemente, a vantagem desta espécie está na especificidade que a sua enzima xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) tem pelo cofator NADH. A preferência dessas enzimas pelo mesmo cofator mantém o balanço redox entre as primeiras reações de oxirredução da metabolização da xilose, e reduz a produção de xilitol (HOU, 2012). No Brasil, linhagens de *S. passalidarum* foram isoladas por Cadete e col. (2012) de madeira em decomposição de reservas da Floresta Amazônica. Dentre as linhagens isoladas, encontra-se a cepa UFMG-HMD 2.1 que já se mostrou uma excelente fermentadora de xilose (CADETE *et al.*, 2012). A capacidade dessa linhagem de fermentar xilose está alinhada com uma das características indispensáveis ao microrganismo fermentador a ser viabilizado para a produção de etanol 2G. Todavia, pouco se sabe sobre a

³ Cadete e col. (2016), nas condições de oxigenação utilizadas no trabalho.

tolerância desta linhagem aos ácidos carboxílicos fracos, de forma que, a análise desta tolerância se faz necessária para que a linhagem UFMG-HMD 2.1 seja minimamente considerada para a produção de etanol 2G.

1.3.2 Linhagens *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes

Apesar de existirem linhagens de leveduras selvagens capazes de fermentar xilose, poucas apresentam a robustez da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura *S. cerevisiae* é o principal microrganismo fermentador utilizado na produção de etanol 1G. A ampla utilização da levedura na produção do etanol se deve à robustez desta levedura frente a variações de pH, osmolaridade, temperatura e elevados nível de etanol (FUJOMITO *et al.*, 2012). Além disso, a levedura *S. cerevisiae* é uma ótima fermentadora de hexoses (MATSUSHIKA *et al.*, 2012). Em vista disso, é desejável que a levedura *S. cerevisiae* seja o microrganismo fermentador empregado também na produção de etanol 2G. Todavia, a grande limitação relacionada a utilização da *S. cerevisiae* na produção do etanol 2G é a sua incapacidade em assimilar xilose. Isto se deve à baixa expressão que esta levedura tem dos genes codificantes para as enzimas xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulocinase (XK) (MATSUSHIKA *et al.*, 2009). Diferentes abordagens, entretanto, têm sido desenvolvidas para permitir que esta espécie seja capaz de fermentar esta pentose, e uma das abordagens mais recorrentes tem sido a modificação genética da levedura para reconstrução das primeiras etapas de assimilação da xilose. Dentre as modificações genéticas já realizadas, a expressão heteróloga dos genes codificantes para a xilose redutase (XYL1) e para a xilitol desidrogenase (XYL2) de *Scheffersomyces stipitis*, em combinação com a (2) sobre expressão do gene codificante para xilulocinase (XKS1) da própria *S. cerevisiae* é uma das mais consolidadas (revisito por MATSUSHIKA *et al.*, 2009). Essas modificações foram primeiramente feitas por HO e col. (1998) e por TOIVARI e col. (2001) e, atualmente, continuam sendo uma das principais formas de tornar a levedura *S. cerevisiae* apta a fermentar xilose.

1.4 MODIFICAÇÕES GENÉTICAS ADICIONAIS EM *Saccharomyces cerevisiae*

A expressão heteróloga dos genes codificantes para as enzimas XR e XDH de *S. stipitis*, em conjunto com a sobre expressão do gene

codificante para a enzima XK de *S. cerevisiae*, de fato, permite que a espécie *S. cerevisiae* passe a fermentar xilose. Entretanto, vários pesquisadores já relataram que, mesmo com essas modificações genéticas, o consumo de xilose pela levedura é dramaticamente afetado pela presença de ácidos carboxílicos fracos (ALMEIDA *et al.*, 2011, HASUNUMA *et al.*, 2011). Em vista disso, outras modificações são aparentemente necessárias para que a levedura *S. cerevisiae* passe a fermentar xilose eficientemente, também na presença desses inibidores.

Recentemente, um estudo metabolômico realizado por Hasunuma e col. (2011) demonstrou que, além das sobre expressão da XR, XDH e XK, a sobre expressão de enzimas envolvidas na fase não oxidativa da PPP pode ser uma estratégia promissora para melhorar a tolerância de linhagens *S. cerevisiae* aos ácidos carboxílicos. Segundo esse estudo, quando linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* foram submetidas à concentrações crescentes de ácido acético, o menor consumo de xilose por essas leveduras foi acompanhado pelo acúmulo de metabólitos da fase não oxidativa da PPP, sugerindo que a presença do ácido acético, de alguma forma, inibia essa fase da via. Como o fluxo da fase não oxidativa da PPP parece ser limitado por enzimas como a transaldolase (TAL), que converte a sedoheptulose-7-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato em eritrose-4-fosfato e frutose-6-fosfato (Figura 2) (SENAC & HAHN-HAGERDAL, 1990; WALFRIDSSON *et al.*, 1995; HASUNUMA *et al.*, 2011), os pesquisadores sobre expressaram o gene codificante para essa enzima (*TALI*). Os resultados mostraram que a sobre expressão do gene *TALI* foi suficiente para restaurar o consumo de xilose e diminuir o acúmulo de metabólitos da fase não oxidativa da PPP, mesmo na presença dos inibidores. Mais interessante, as leveduras que sobre expressavam o gene *TALI* foram capazes de consumir a xilose em uma taxa maior e de produzir mais etanol do que a linhagem controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Sanda e col. (2011) onde a sobre expressão do gene *TALI*, em combinação com outras modificações genéticas, também aumentou o consumo de xilose e a tolerância da levedura *S. cerevisiae* frente aos ácidos carboxílicos.

Os resultados desses trabalhos foram promissores e mostraram uma possibilidade para contornar o efeito negativo que os ácidos carboxílicos têm sobre a fermentação de xilose por linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*. Todavia, os trabalhos citados utilizaram linhagens de *S. cerevisiae* laboratoriais que não apresentam a mesma robustez de linhagens industriais. Isso significa que dificilmente as linhagens desenvolvidas nos trabalhos citados poderiam ser utilizadas em

processos industriais. Principalmente, fica incerto como a sobre expressão do gene *TALI* afetaria o perfil fermentativo de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* de origem industrial. Na tentativa de esclarecer a influência dessa modificação genética em linhagens de origem industrial, nosso grupo de pesquisas criou uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* que (1) sobre expressa o gene *TALI*, (2) que possui as modificações genéticas necessárias para fermentar xilose, e (3) que tem origem industrial. A análise da tolerância desta nova linhagem aos ácidos carboxílicos ainda não foi realizada e é um dos objetivos deste trabalho. Ainda, como forma de comparar os efeitos da sobre expressão do gene *TALI* sobre a tolerância da linhagem recém construída, a cepa parental utilizada para criar a nova linhagem também foi avaliada aqui. A cepa parental possui todas as características genéticas da nova linhagem, exceto a sobre expressão do gene *TALI*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a tolerância de três linhagens distintas de leveduras (UFMG-HMD 2.1, MP-P5 e JDY-01) frente ao ácido acético e ao ácido fórmico e, assim, contribuir para a obtenção de um microrganismo que fermenta xilose na presença de ácidos carboxílicos e que possa ser utilizado na produção do etanol 2G.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a tolerância da levedura fermentadora de xilose *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 frente à concentrações crescentes de ácido acético ou ácido fórmico, e na presença de glicose ou xilose como fontes de carbono;
- Avaliar a tolerância da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* MP-P5 (derivada da linhagem industrial PE-2, mas modificada para fermentar xilose), frente à concentrações crescentes de ácido acético ou ácido fórmico na presença de glicose ou xilose como fontes de carbono;
- Avaliar a tolerância da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* JDY-01 (derivada da MP-P5, mas que sobre expressa o gene *TALI*), frente à concentrações crescentes de ácido acético ou ácido fórmico na presença de glicose ou xilose como fontes de carbono.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS E MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

A Tabela 1 descreve as linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho. Para o cultivo destas linhagens utilizou-se meio rico YPD contendo 10 g/L extrato de levedura, 20 g/L de peptona bacteriológica e 20 g/L de glicose. Para os crescimentos em microescala, crescimentos aeróbios e fermentações em batelada simples utilizou-se meio mínimo YNB contendo 6,7 g/L de *Yeast Nitrogen Base* com aminoácidos acrescido de 20 g/L da fonte de carbono de interesse. Todos os meios tiveram seu pH ajustado para 5 com solução de HCl e foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 min. Após a esterilização, ao meio YNB utilizado nas microplacas, adicionou-se ácido acético ou ácido fórmico nas concentrações listadas na Tabela 2. Aos meios YNB utilizados nos crescimentos aeróbios e nas fermentações em batelada simples adicionou-se uma das concentrações a seguir: 30 mM ou 60 mM de ácido acético; 6 mM ou 10 mM de ácido fórmico.

Tabela 1 – Linhagens de leveduras utilizadas.

Linhagem	Descrição	Fonte
<i>Spathaspora passalidarum</i>		
UFMG-HMD 2.1	Linhagem selvagem naturalmente fermentadora de xilose isolada de madeira em decomposição encontrada na cidade de São João da Balisa -AM.	Departamento de Microbiologia da UFMG*
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
MP-P5	Linhagem diplóide isogênica à PE-2 (linhagem industrial utilizada na produção de etanol 1G), mas transformada com plasmídeo integrativo pAUR-XKXDHXR que possibilita a sobre expressão da xilulocinase (XK) de <i>S. cerevisiae</i> , e a expressão heteróloga da xilitol desidrogenase (XDH) e xilose redutase (XR) de <i>S. stiptis</i> , além de conferir resistência ao antibiótico aureobasidina A.	Golçalves (2014)

JDY-01	Linhagem diplóide isogênica à MP-P5, mas transformada com o módulo de sobre expressão <i>loxP-KanMX-loxP-PADH1::TALI</i> , e confere resistência ao antibiótico geneticina. LBMBL**
--------	---

*Cedida gentilmente pelo Dr. Carlos A. Rosa do Departamento de Microbiologia da UFMG. **Obtida pelo mestrando Júnior R. Deoti do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras, Departamento de Bioquímica da UFSC.

Tabela 2 – Concentrações de ácido acético ou ácido fórmico utilizadas nos crescimentos em microescala.

	Concentração (mM)					
Ác. acético	0	10	20	30	40	60
Ác. fórmico	0	2	4	6	8	10

3.2 CRESCIMENTO EM MICROESCALA

Para o crescimento em microplaca as linhagens foram pré cultivadas em 3 mL de meio líquido YPD mantido à 28 ° C sob agitação orbital constante de 160 r.p.m em agitador INNOVA® 44 (New Brunswick Scientific) por 48 h. Após 48 h, as células do pré cultivo foram inoculadas nas microplacas de 96 poços com cada poço contendo meio sintético YNB suplementado com 20 g/L de xilose ou glicose e uma das concentrações listadas na Tabela 2. Para evitar a contaminação e a evaporação do conteúdo de cada poço, as microplacas foram seladas com AccuClear Sealing Film for qPCR (E & K Scientific), o que limitou a disponibilidade de oxigênio por poço fazendo com que o crescimento ocorresse em microaerobiose. As placas foram mantidas à 28 ° C sob agitação orbital constante de 160 r.p.m no leitor de placas TECAN Infinite® M200 Pro por 48 h. A absorbância a 600 nm de cada inóculo foi medida a cada 15 minutos. Ao final do crescimento, as microplacas foram centrifugadas a 3500 g por 4 minutos, e foram congeladas à -20 ° C para posterior análise do etanol produzido. A partir do crescimento em microescala foram determinadas as concentrações de ácido acético e fórmico a serem utilizadas nos crescimentos em frascos sob agitação, e nas fermentações em bateladas simples. Os crescimentos em microplacas foram realizados em duplicatas.

3.3 CRESCIMENTO AERÓBIOS

Para os crescimentos aeróbios as linhagens foram novamente pré cultivadas em 3 mL de meio líquido YPD mantido à 28 °C sob agitação orbital constante de 160 r.p.m. em agitador INNOVA® 44 (New Brunswick Scientific) por 48 h. A partir dos pré cultivos, as linhagens foram então inoculadas em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 1/5 do seu volume preenchido com meio sintético YNB contendo 20 g/L da fonte de carbono de interesse, e uma das concentrações de ácido acético: 30 mM/60 mM, ou de ácido fórmico: 6 mM/10 mM. Os crescimentos também foram realizados em meio YNB isento de inibidores. A concentração celular inicial de cada inóculo foi ajustada para $DO_{600nm} = 0,1$. Os inóculos foram mantidos à 28 °C sob agitação orbital constante de 160 r.p.m. em agitador INNOVA® 44 (New Brunswick Scientific) por 72 h.

Em intervalos de tempo determinados, foram retiradas amostras de cada inóculo para que a densidade óptica (DO) celular do crescimento fosse medida em espectrofotômetro com feixe de 600 nm. As medidas obtidas foram utilizadas para determinar o crescimento celular de cada linhagem inoculada.

Alíquotas de cada inóculo, também foram retiradas em intervalos pré-estabelecidos e foram centrifugadas por 53 min a 6.000 g. Os sobrenadantes foram filtrados e armazenados (-20 °C) para posterior determinação do consumo de açúcar e produção de etanol, xilitol e glicerol via cromatografia líquida de alta pressão.

3.4 FERMENTAÇÃO EM BATELADA SIMPLES

Para as fermentações em batelada simples as linhagens foram pré cultivadas em frascos Erlenmeyer contendo 1/5 do seu volume de meio rico YPD. Os frascos foram mantidos à 28 °C sob agitação orbital constante de 160 r.p.m. em agitador INNOVA® 44 (New Brunswick Scientific) por 48 h. Em seguida, os pré crescimentos foram transferidos para tubos estéreis do tipo Falcon e foram centrifugados a 4 000 r.p.m por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas por duas vezes com água destilada gelada e estéril. As células tiveram sua concentração celular inicial ajustada para 10,0 g/L e foram inoculadas em 20 mL de meio sintético YNB suplementado com 20 g/L da fonte de carbono de interesse e uma das concentrações: 30 mM/60 mM de ácido acético ou 6 mM/10 mM de ácido fórmico. Alternativamente, as células

foram inoculadas em 20 mL de meio YNB isento de inibidores. Os frascos utilizados para as fermentações possuíam volume máximo de 20 mL e foram vedados com lacre de plástico, de forma que a fermentação ocorreu em condições de microaerobiose. Os frascos foram mantidos à 28 °C sob agitação orbital constante de 160 r.p.m por 24 h. Em intervalos de tempo determinados retirou-se uma alíquota de cada inóculo, e essas alíquotas foram utilizadas para determinação do crescimento celular via espectrofotômetro, e do consumo de açúcares, produção de etanol, xilitol e glicerol via cromatografia líquida de alta pressão.

3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES, ÁCIDOS E METABÓLITOS

Para determinação do etanol produzido no crescimento em microescala, as enzimas álcool oxidase (Sigma) e peroxidase (Toyobo do Brasil) foram utilizadas conforme previamente descrito por Salgado *et al.* (2000). Para essa determinação, 10 µl de amostra de cada crescimento celular foi incubada com 200 µl do reagente enzimático contendo 0,5 U/mL de álcool oxidase, 4 U/mL de peroxidase, 14 mM de 4-aminoantipirina e 60 mM de fenol em tampão 0,1 M fosfato de sódio. As amostras foram incubadas com o reagente enzimático por 1 h à 28 °C em leitor de placas TECAN Infinite® M200 Pro, onde ao longo da incubação, cada poço teve sua absorbância a 600 nm determinada pelo leitor. A concentração de etanol em cada poço foi determinada pela correlação do valor de absorbância obtido com a equação da reta extraída de uma curva padrão construída com soluções padrão de etanol (1-10 g/L).

As concentrações de glicose, xilose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol das alíquotas retiradas dos crescimentos em frasco sob agitação e da fermentação em batelada simples foram determinadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC – Jasco XLC), com detector por índice de refração (RI 2031 plus – Jasco) e coluna para ácidos orgânicos (Aminex HPX-87H Column – Bio-rad). A fase móvel utilizada foi de 5,0 mM de ácido sulfúrico à 50 °C com fluxo de 0,6 mL min⁻¹ durante 30 minutos. As curvas de calibração foram estabelecidas para todas as amostras analisadas utilizando quatro concentrações diferentes, na faixa de 0,5 a 20,0 g/L.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levedura *Spathaspora passalidarum* UFMG-HMD 2.1

4.1 ANÁLISE EM MICROESCALA DA TOLERÂNCIA DA LEVEDURA *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 FRENTE AO ÁCIDO ACÉTICO E AO ÁCIDO FÓRMICO

Como forma de triar e pré-avaliar a tolerância da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 frente aos ácidos carboxílicos, a levedura foi primeiramente cultivada em microplacas de 96 poços contendo concentrações crescentes de ácido acético e ácido fórmico. Os crescimentos em microescala permitiram que a levedura fosse simultaneamente cultivada em cinco concentrações diferentes de ácido acético e ácido fórmico (Tabela 2 – Material e Métodos) bem como em meio isento de inibidores (meio controle). Ainda foi possível crescer a levedura em duas fontes de carbono distintas (xilose ou glicose a 20 g/L) como forma de verificar se a tolerância da levedura é influenciada pelo açúcar disponível no meio. Todos os crescimentos foram realizados em condições de microaerobiose e tiveram a sua concentração celular inicial (OD_{600nm}) ajustada para 0,1. O etanol produzido ao final de cada cultivo celular foi dosado enzimaticamente conforme descrito na Seção 4-Material e Métodos deste trabalho.

Os gráficos mostrados na Figura 3 apresentam as curvas de microcrescimento e de produção de etanol da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 em meio contendo xilose e diferentes concentrações de ácido acético (Figura 3-A) ou ácido fórmico (Figura 3-B). Conforme mostram os gráficos, a presença dos inibidores afetou o crescimento da levedura, e a linhagem foi capaz de crescer apenas no meio controle e nos meios contendo baixas concentrações de inibidores. Todavia, mesmo nos meios contendo baixas concentrações de inibidores, o crescimento da levedura foi severamente afetado, indicando que a cepa é altamente sensível a esses compostos. Mais especificamente, concentrações tão baixas quanto 10 mM de ácido acético foram suficientes para aumentar a fase *lag* da linhagem de 12 para 14 horas, e para diminuir a sua concentração celular e produção de etanol para aproximadamente metade daquela observada no crescimento em meio controle. Enquanto isso, concentrações tão baixas quanto 2 mM de ácido fórmico estenderam a fase *lag* da linhagem para 19 h, mas não afetaram a sua concentração celular e produção de etanol.

Os efeitos negativos observados sob o crescimento da cepa foram ainda diretamente proporcionais à concentração desses compostos inibitórios. Mais interessante, o fato da produção de etanol ter se mantido igual na presença do ácido fórmico, mas ter diminuído na presença do ácido acético, sugere que a produção do álcool pela linhagem foi mais dependente do crescimento celular do que da eficiente assimilação do açúcar presente no meio.

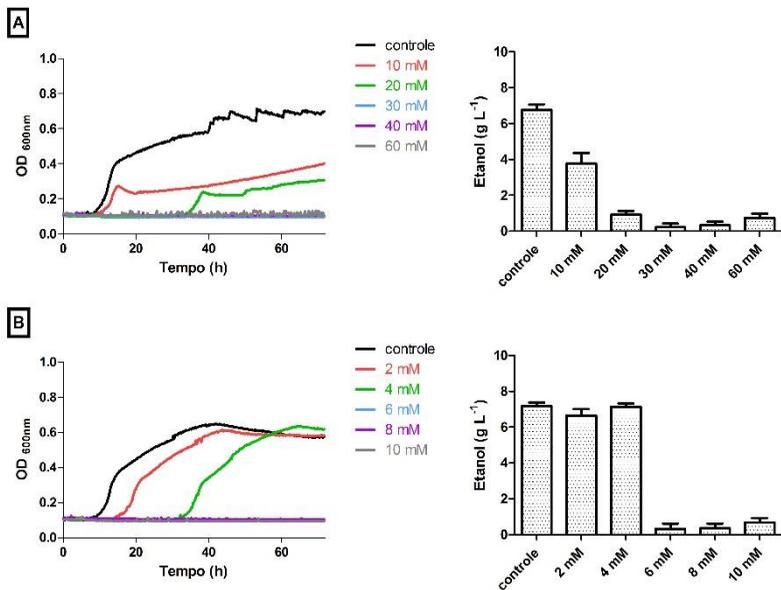


Figura 3 - Crescimento em microescala (painel esquerdo) e produção de etanol (painel direito) da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de xilose e concentrações crescentes de (A) ácido acético e (B) ácido fórmico.

Os gráficos mostrados na Figura 4 apresentam os microcrescimentos da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 em meio contendo glicose acrescida de ácido acético (Figura 4-A) ou ácido fórmico (Figura 4-B). Como pode ser observado nas figuras, concentrações de 10 mM de ácido acético ou 2 mM de ácido fórmico também foram suficientes para aumentar a fase *lag* da levedura e/ou diminuir a sua concentração celular. Principalmente, a forma heterogênea com que cada ácido afetou o crescimento da levedura se manteve. Todavia, o efeito negativo de ambos os inibidores sob o crescimento da cepa foi menos severo do que o observado em xilose. Além disso, a produção de etanol foi levemente maior na presença de 10 mM de ácido

acético ou 2 mM de ácido fórmico sugerindo que, em meio contendo glicose, baixas concentrações desses inibidores são capazes de induzir a produção de etanol pela cepa. Resultado similar já foi descrito na literatura e é associado com a indução que baixas concentrações desses ácidos teriam sobre a produção de ATP, que em condições limitadas de oxigênio levaria a uma maior produção de etanol (ALMEIDA *et al.*, 2007; JÖNSSON, *et al.*, 2013).

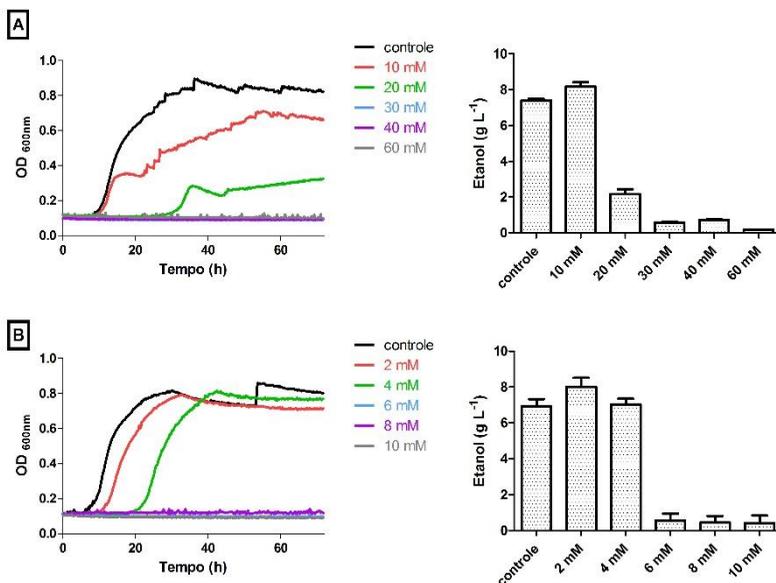


Figura 4 - Crescimento em microescala (painel esquerdo) e produção de etanol (painel direito) da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de glicose e concentrações crescentes de (A) ácido acético e (B) ácido fórmico.

De forma geral, os crescimentos em microescala revelaram que a levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 possui baixa tolerância aos ácidos carboxílicos testados. Ainda, os crescimentos mostraram que o ácido fórmico foi mais tóxico para a cepa do que o ácido acético, e que a tolerância da levedura na fonte de carbono glicose foi levemente melhor do que na fonte de carbono xilose. Todavia, em nenhum dos açúcares a levedura foi capaz de tolerar mais do que 20 mM de ácido acético ou mais do que 4 mM de ácido fórmico

4.2 ANÁLISE DO CRESCIMENTO AERÓBIO DA LEVEDURA *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 NA PRESENÇA DE ÁCIDO ACÉTICO OU ÁCIDO FÓRMICO

A partir dos crescimentos em microescala, e com base nas concentrações de ácido acético e ácido fórmico já encontradas em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar¹, foram escolhidas duas concentrações de ácido acético (30-60 mM) e duas concentrações de ácido fórmico (6-10 mM) para serem utilizadas nos crescimentos aeróbios. Os crescimentos aeróbios foram realizados com o propósito de melhor entender os efeitos individuais de cada ácido sobre o perfil de crescimento, consumo de açúcar e produção de etanol da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1. Para isso a cepa foi crescida em frascos Erlenmeyer preenchido com meio sintético mínimo contendo 20 g/L de xilose ou glicose e uma das concentrações de ácido acético ou ácido fórmico citadas. Com propósito de referência, a levedura também foi crescida em meio sem inibidor.

4.2.1 Crescimentos aeróbios em xilose

A Figura 5 mostra os resultados obtidos para o crescimento aeróbios da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 em meio contendo apenas xilose (meio controle). Como mostra a figura, a levedura apresentou a capacidade de consumir xilose e convertê-la em etanol mesmo em condições aeróbias, uma característica incomum em leveduras fermentadoras de xilose, mas que tem se mostrado recorrente entre as linhagens de *S. passalidarum* (HOU, 2012; JEFFRIES *et al.*, 2013). A levedura ainda apresentou uma curta fase *lag* (12 h) e atingiu uma alta concentração celular (~16 OD 600nm) que foram condizentes com o rápido consumo da xilose presente no meio, e que evidenciaram a boa capacidade da cepa em crescer utilizando essa pentose como fonte de carbono.

Após estabelecido o perfil de crescimento da cepa em meio controle, a levedura foi crescida na presença de xilose contendo 30 mM ou 60 mM de ácido acético. Os resultados obtidos em ambas condições são mostrados na Figura 6. Como pode ser observado na figura, o crescimento da levedura em xilose foi completamente inibido pela presença do ácido acético em ambas as concentrações. O mesmo pode ser observado quando a levedura foi crescida em xilose contendo ácido fórmico nas concentrações de 6 mM ou 10 mM (Figura 7).

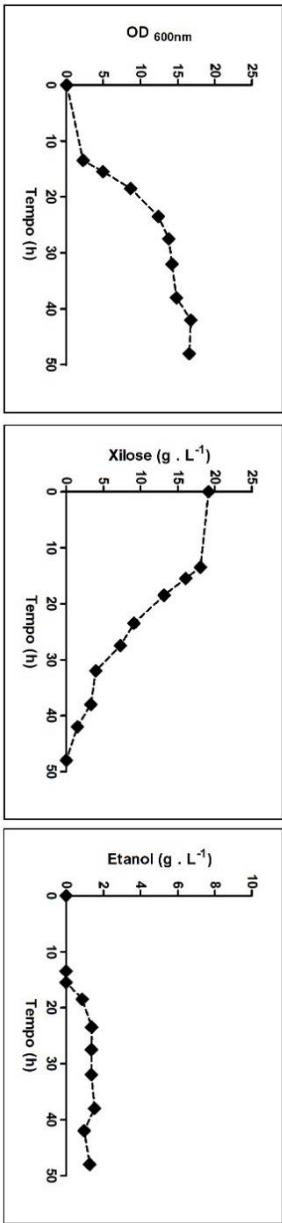


Figura 5- Crescimento aeróbio da levedura *S. passolidarum* UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de xilose. Concentração celular (OD_{600nm}) (painel esquerdo), consumo de açúcar (painel central), produção de etanol (painel direito).

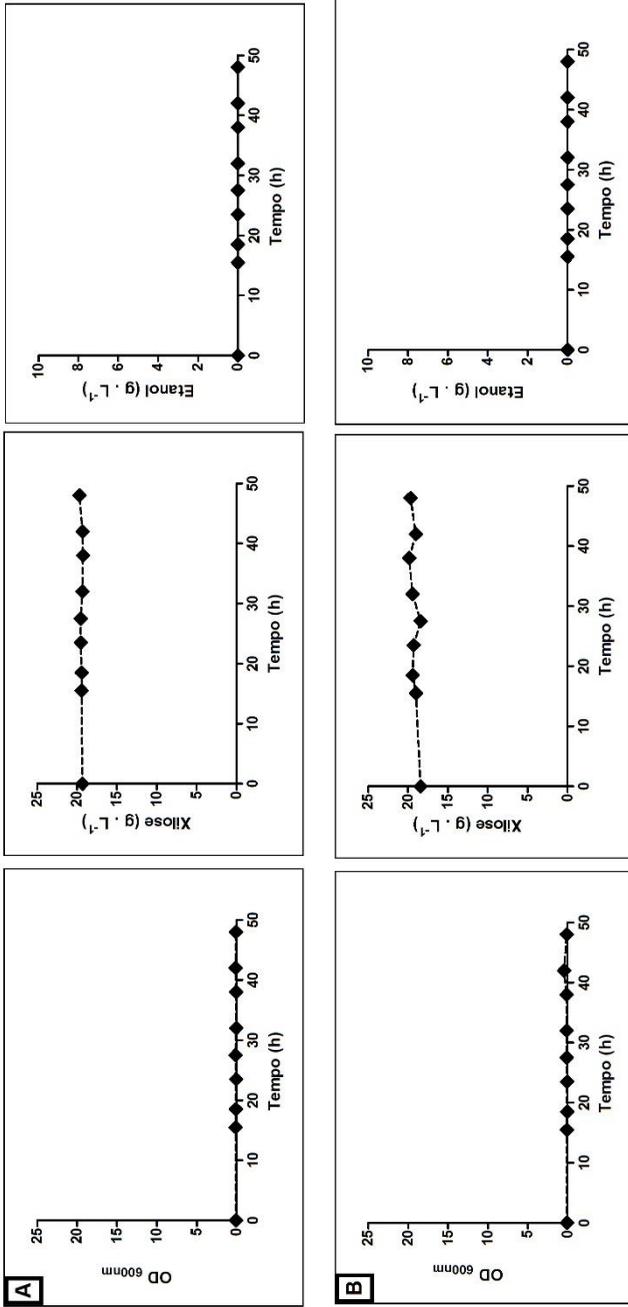


Figura 6 - Crescimento aeróbio da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de xilose e (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético. Concentração celular (OD_{600nm}) (painel esquerdo), consumo de açúcar (painel central), produção de etanol (painel direito).

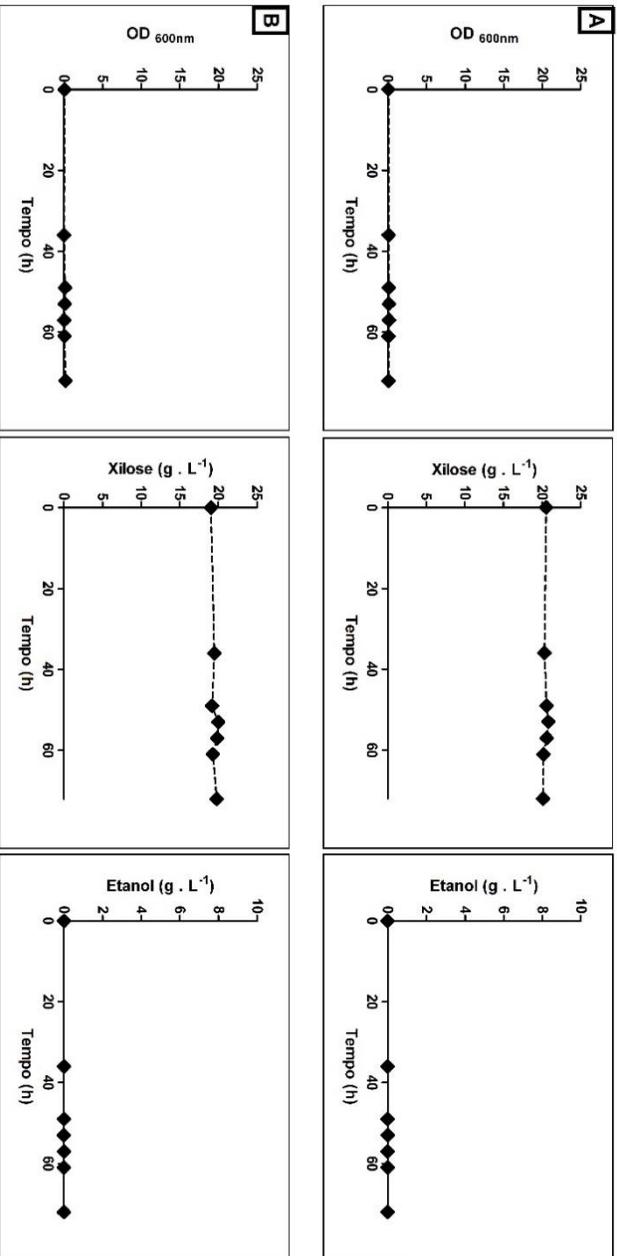


Figura 7 - Crescimento aeróbio da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de xilose acrescida de (A) 6 mM ou (B) 10 mM de ácido acético. Concentração celular (OD_{600nm}) (painel esquerdo), consumo de açúcar (painel central), produção de etanol (painel direito).

A intolerância da levedura a concentrações tão baixas quanto 30 mM de ácido acético e 6 mM de ácido fórmico corroboram com os crescimentos em microescala, e vão ao encontro do que já foi observado para outras linhagens de *S. passalidarum*. Por exemplo, Costa (2016) relatou que o crescimento em meio sólido da linhagem UFMG-HMD14.1 foi inibido por concentrações igualmente baixas de ácido acético (30 mM) e ácido fórmico (20 mM). Mais importante, a intolerância da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 a concentrações tão baixas quanto 30 mM de ácido acético e 6 mM de ácido fórmico indicam que dificilmente a levedura poderia ser utilizada como o microrganismo fermentador de hidrolisados lignocelulósicos de bagaço de cana, porque nesses hidrolisados já foram encontradas concentrações de até 70 mM e 30 mM de cada ácido, respectivamente (ALMEIDA *et al.*, 2007).

4.2.2 Crescimentos aeróbios em glicose

Nos crescimentos realizados em 20 g/L de glicose isenta de inibidores (meio controle), o perfil de crescimento, consumo de açúcar e produção de etanol da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 aproximou-se bastante daquele observado em xilose pura (Figura 8). Novamente, a fase *lag* da levedura foi curta (10 h) e a concentração celular alcançada ao final do crescimento foi de ~16 (OD_{600nm}). Ainda, 90% da glicose do meio já havia sido consumida e convertida em 2 g/L de etanol em 45 h. A semelhança entre os perfis de crescimento na presença individual de cada açúcar indicam que, na condição aeróbia testada, a levedura foi capaz de consumir as duas fontes de carbono com quase a mesma eficiência, uma característica que também já foi relatada para outras linhagens de *S. passalidarum* (MOURO, 2012; JEFFRIES *et al.*, 2013).

Quando a levedura foi crescida em glicose contendo 30 mM ou 60 mM de ácido acético, mais uma vez observou-se a completa inibição do crescimento da cepa pela presença de ambas as concentrações do inibidor. Esse resultado sugere que, em condições aeróbias, a intolerância da levedura não foi influenciada pela fonte de carbono (Figura 9), e que o seu crescimento foi igualmente afetado pelo ácido acético tanto em glicose quanto em xilose. A mesma constatação pode ser feita quanto ao crescimento da levedura em glicose acrescida de 6 mM e 10 mM de ácido fórmico, condições nas quais a linhagem foi novamente incapaz de crescer (Figura 10).

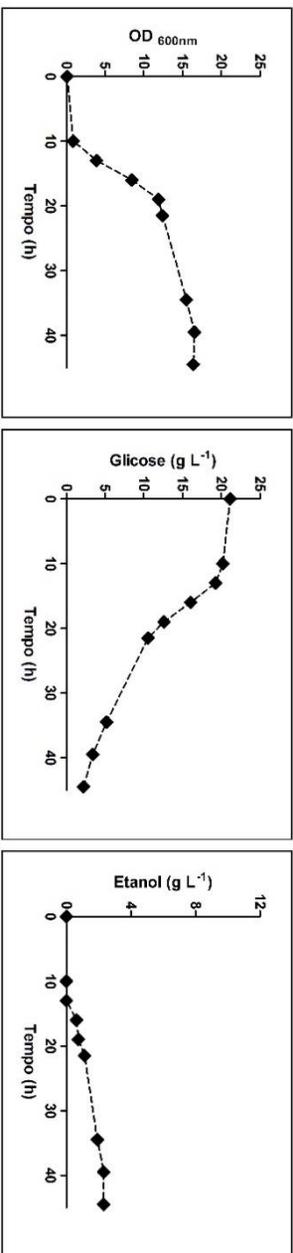


Figura 8 - Crescimento aeróbio da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de glicose. Concentração celular (OD_{600nm}) (painel esquerdo), consumo de açúcar (painel central), produção de etanol (painel direito).

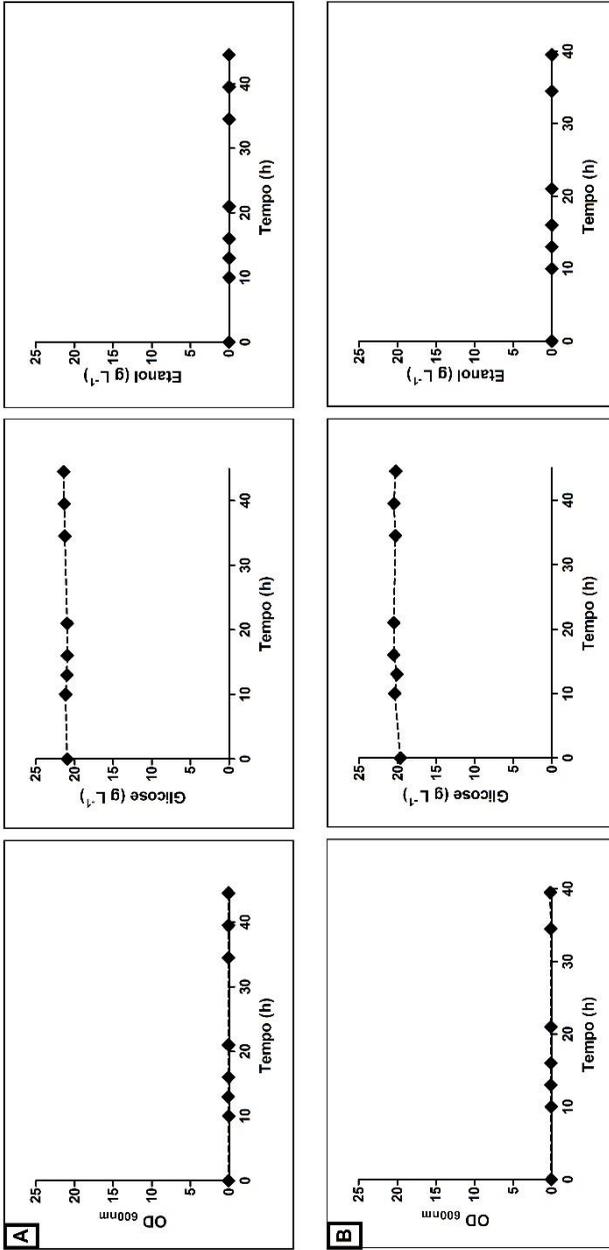


Figura 9 - Crescimento aeróbio da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de glicose acrescida de (A) 30 ou (B) 60 Mm de ácido acético. Concentração celular (OD_{600nm}) (painel esquerdo), consumo de açúcar (painel central), produção de etanol (painel direito).

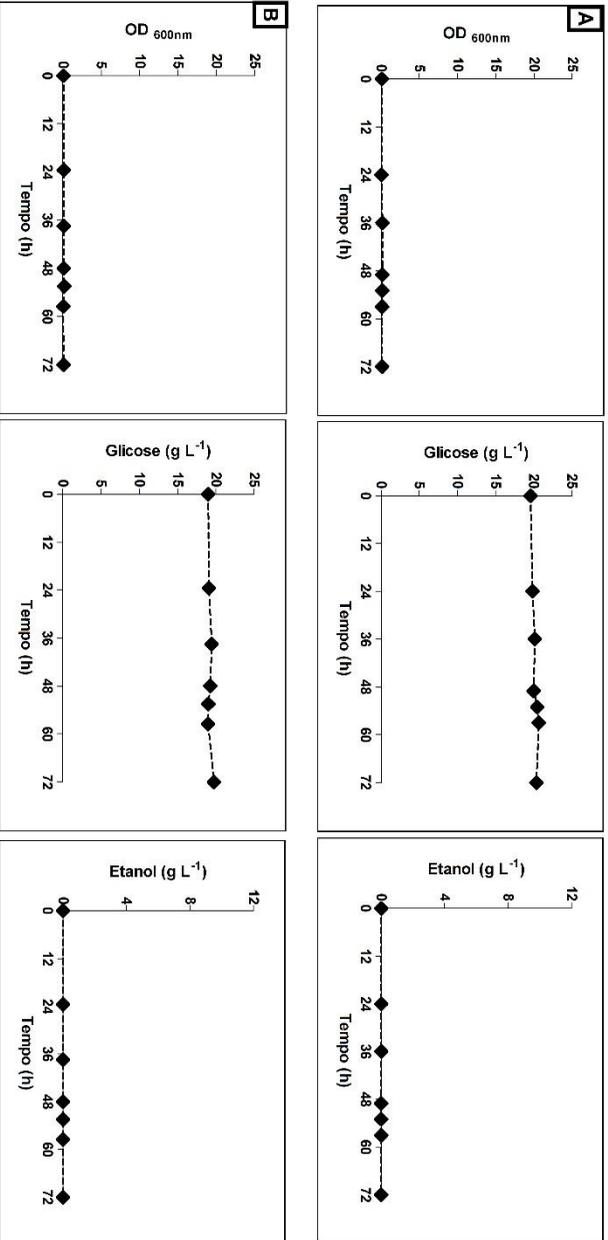


Figura 10 - Crescimento aeróbio da levedura *S. passiflorarum* UFMG-HMD 2.1 na presença de 20 g/L de glicose acrescida de (A) 6 ou (B) 10 Mm de ácido fórmico. Concentração celular (OD_{600nm}) (painel esquerdo), consumo de açúcar (painel central), produção de etanol (painel direito).

De forma geral, os resultados obtidos nos crescimentos aeróbios tanto em xilose quanto em glicose, indicam que a levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 2.1 foi eficiente em crescer e produzir etanol a partir de ambos os açúcares. Mas que, independente da fonte de carbono, a levedura foi intolerante à concentrações iguais ou maiores do que 30 mM de ácido acético ou 6 mM de ácido fórmico.

4.3 ANÁLISE DO PERFIL FERMENTATIVO DA LEVEDURA *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 FRENTE AO ÁCIDO ACÉTICO E AO ÁCIDO FÓRMICO

Para avaliar o perfil de consumo de açúcar, produção de biomassa e produção de metabólitos da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 em condições similares às aplicadas nas indústrias sucroalcooleiras, a levedura foi submetida a ensaios fermentativos em microaerobiose e com alta concentração celular (10 g/L). As fermentações foram realizadas em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose ou glicose como fonte de carbono. Como forma de verificar se o perfil fermentativo da levedura mudaria na presença simultânea dos dois açúcares, realizou-se também um ensaio de co-fermentação na qual utilizou-se 20 g/L de cada fonte de carbono. As fermentações foram realizadas primeiramente em meio sem inibidores (controle) e, posteriormente, em meios acrescidos das concentrações de 30-60 mM de ácido acético ou 6-10 mM de ácido fórmico.

A Figura 11 mostra o perfil de consumo de açúcar, crescimento celular e produção de etanol na fermentação realizada em meio contendo apenas xilose. Conforme pode ser observado na figura, em 24 h de fermentação, 90% da xilose presente no meio foi rapidamente consumida pela levedura. Do açúcar consumido, parte foi direcionado para produção de ~7 g/L de etanol e parte para a produção de 1,7 g/L de xilitol.

A fermentação rápida e completa da xilose apresentada pela levedura está em conformidade com os resultados reportados por Cadete e col. (2012). Segundo o autor, a fermentação de 50 g/L de xilose em meio rico YPX pela mesma linhagem resultou no consumo de 98% do açúcar presente no meio, e na produção de 15 g/L de etanol e 1.1 g/L de xilitol. Ainda, a baixa produção de xilitol⁴ mencionada em ambos os estudos¹, está em conformidade com os valores observados para outras linhagens de *S. passalidarum* que sabidamente exibem uma xilose redutase com

⁴ Metabólito associado ao desbalanço redox causado pela diferença no uso dos cofatores NAD(P)H/NAD⁺ pelas enzimas XR e XDH – Seção 1 – Introdução.

preferência pelo cofator NADH (HOU, 2012). De forma que, em trabalho futuros, seria interessante analisar mais detalhadamente as enzimas XR e XDH da linhagem UFMG-HMD 2.1.

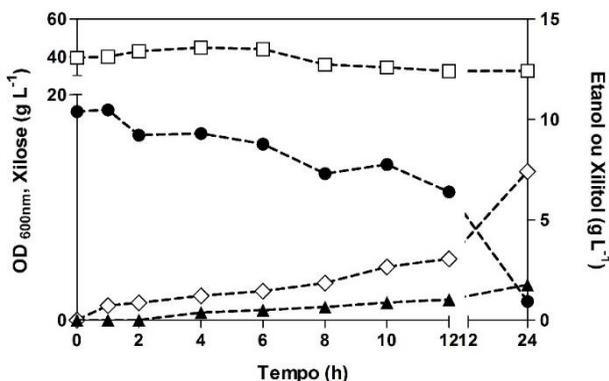


Figura 11 – Perfil fermentativo da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose. Concentração celular (quadrado), xilose (círculo), etanol (diamante), xilitol (triângulo).

A Figura 12 mostra o perfil fermentativo da levedura em xilose acrescida de ácido acético (A-B) ou ácido fórmico (C-D). Na presença tanto de 30 mM quanto de 60 mM de ácido acético, o consumo de açúcar, a produção de etanol e a produção de xilitol da levedura foram fortemente afetados. Em 24 h de fermentação, a presença de 30 mM do ácido inibiu a fermentação da xilose, e apenas 7% do açúcar presente no meio foi consumido (Figura 12-A). Em conformidade com o menor consumo do açúcar, a produção de etanol diminuiu e pouco mais de 1 g/L do álcool foi produzido. Não foi detectada a produção de xilitol. Já na presença de 60 mM de ácido acético a levedura foi completamente incapaz de fermentar a xilose (Figura 12-B), o que evidencia que os efeitos negativos deste inibidor aumentaram de forma proporcional à sua concentração.

Semelhante ao ocorrido na presença de 60 mM de ácido acético, a presença de 6 mM ou 10 mM de ácido fórmico impediram a fermentação de xilose pela levedura (Figura 12-C-D). Neste caso, ficou evidente que o ácido fórmico foi mais tóxico para a linhagem do que o ácido acético. Isso porque concentrações muito maiores de ácido acético (60 mM) foram necessárias para que a fermentação de xilose pela levedura fosse completamente inibida, enquanto que para o ácido fórmico uma concentração tão baixa quanto 6 mM foi suficiente para ocasionar o mesmo efeito.

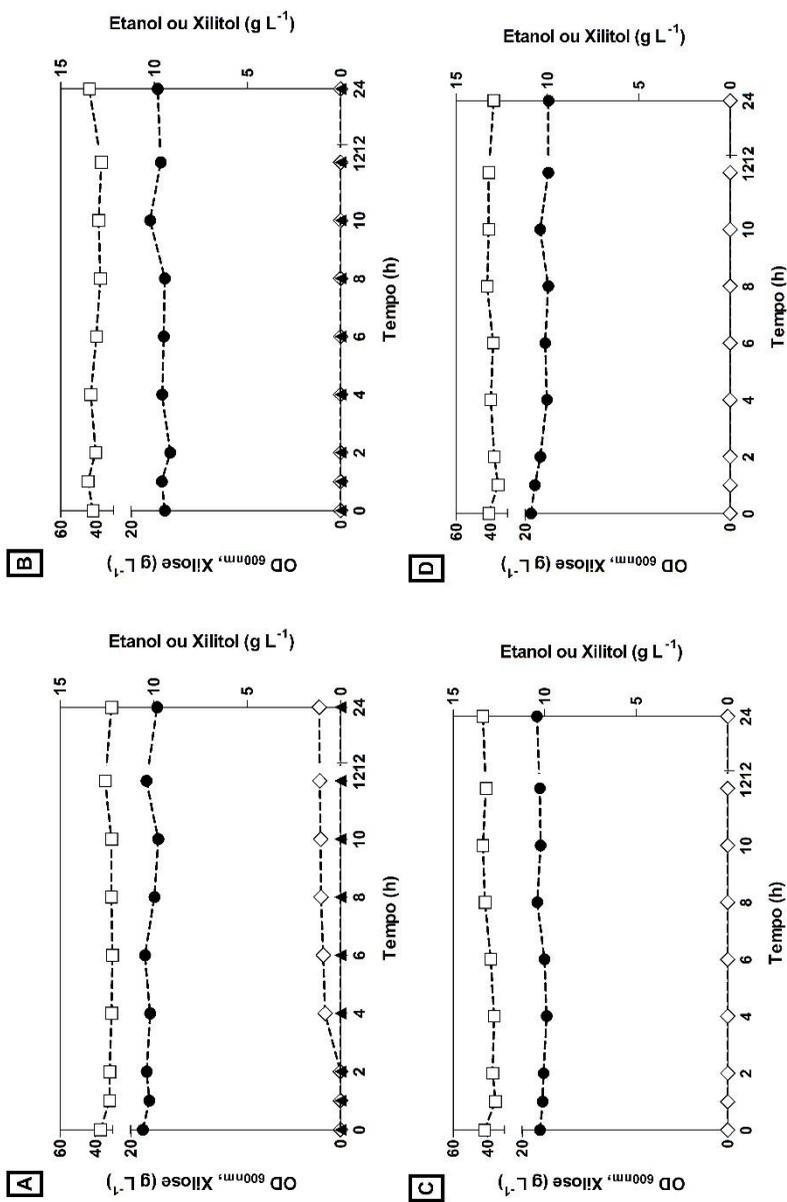


Figura 12 – Perfil fermentativo da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose acrescida de (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético; (C) 6 mM ou (D) 10 mM de ácido fórmico. Concentração celular (quadrado), xilose (círculo), etanol (diamante) e xilitol (triângulo).

Na fermentação realizada em glicose sem inibidores (Figura 13), observa-se que a levedura consumiu a glicose mais rapidamente (10 h) do que havia feito com a xilose (24 h) e que a produção de etanol também foi maior e chegou a ~9 g/L. A diferença entre os perfis de consumo de xilose e glicose não havia sido observada nos crescimentos aeróbios. Contudo, é evidente que nas condições testadas, a levedura consumiu a glicose de forma mais eficiente do que fez com a xilose. Isso indica que, em fermentações com altas concentrações celulares, a glicose foi consumida preferencialmente. Ainda, pode-se notar que a conversão da glicose em etanol foi superior àquela observada para xilose, provavelmente, porque a glicose consumida não foi desviada para produção de intermediários como aqueles observados durante a fermentação da xilose (xilitol - Figura 11).

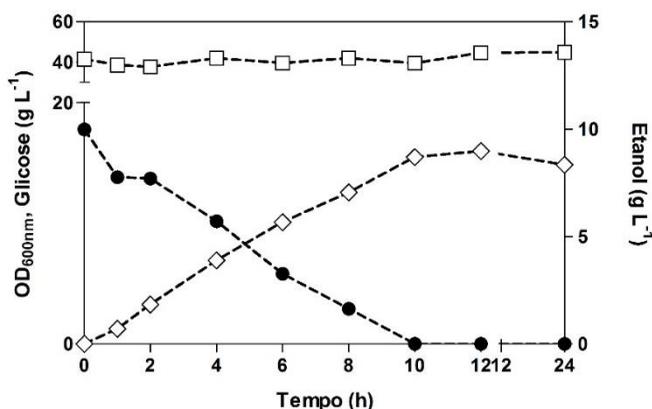


Figura 13 – Perfil fermentativo da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose. Concentração celular (quadrado), glicose (círculo), etanol (diamante).

As fermentações realizadas na presença de 30 mM ou 60 mM de ácido acético, mostraram que o consumo de glicose também foi negativamente afetado pela presença do inibidor (Figura 14-A-B). Entretanto, em comparação com as fermentações em xilose, o consumo da glicose foi menos inibido pela presença de ambas as concentrações do ácido. Na presença de 30 mM de ácido acético, 33,9% da glicose presente no meio foi consumida e 3,6 g/L de etanol foram produzidos após 24 h de fermentação (Figura 14-A). Igualmente, em meio contendo de 60 mM de ácido acético, 5% da glicose do meio foram consumidas (Figura 14-B). Por outro lado, a presença de 6 mM ou 10 mM de ácido fórmico foi

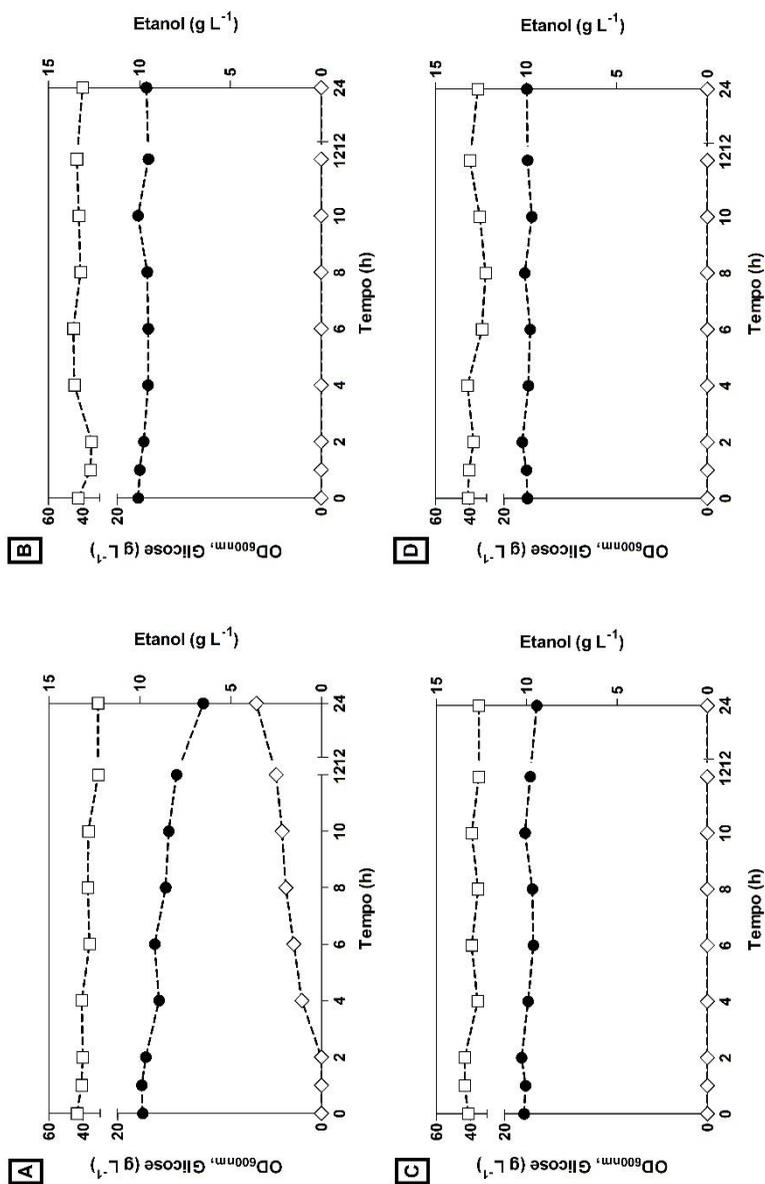


Figura 14 – Perfil fermentativo da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose acrescida de (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético; (C) 6 mM ou (D) 10 mM de ácido fórmico. Concentração celular (quadrado), glicose (círculo), etanol (diamante)

suficiente para impedir completamente a fermentação da glicose pela levedura (Figura 14-C-D) da mesma forma que havia sido observado para a fermentação da xilose (Figura 12-C-D).

Esses resultados indicam que, apesar do perfil fermentativo da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 ter sido afetado pelos inibidores em ambas as fontes de carbono, os efeitos negativos desses inibidores sobre a fermentação da glicose foram menores. De fato, já nos crescimentos em microescala a levedura havia sido menos afetada por ambos os inibidores quando glicose era a fonte de carbono disponível. Aqui é possível sugerir que, na presença de glicose, a maior tolerância da levedura ao ácido acético pode estar relacionada ao rápido consumo desta hexose. Isso porque, em condições limitadas de oxigênio, o ATP necessário para a manutenção de mecanismos de detoxificação, como ATPases de membrana, são obtidos através do consumo do açúcar no meio (BELLISSIMI *et al.*, 2009). De forma que, se esse consumo de açúcar é mais rápido em glicose, a produção de ATP para manter esses mecanismos também é mais rápida e os efeitos dos ácidos carboxílicos na fermentação deste açúcar menores.

Depois de estabelecido o perfil fermentativo da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 na presença individual de xilose e glicose, com ou sem inibidores, foram realizados ensaios de co-fermentação com ambos os açúcares. Como as concentrações iniciais de cada fonte de carbono foram ajustadas para 20 g/L, as co-fermentações iniciaram com um total de 40 g/L de açúcares. Outra vez, primeiramente, realizou-se a co-fermentação em meio sem inibidores e, posteriormente, na presença destes.

Na co-fermentação em meio sem inibidores, o consumo da glicose foi igual ao observado para a fermentação individual desta hexose, e a glicose presente no meio foi depletada em 10 h (Figura 15). Esse perfil de consumo mostra que a presença da xilose não alterou a assimilação da glicose. Em contrapartida, a presença da glicose alterou o perfil de consumo da xilose, atrasando-o e diminuindo-o. Mais especificamente, a xilose só começou a ser efetivamente consumida após 8 h de fermentação, depois que uma grande parte de glicose já havia sido consumida. Ainda, apenas 52% da xilose disponível no meio foi assimilada durante o tempo de amostragem da fermentação. Essas duas características indicam que a glicose inibiu a assimilação da xilose e foi consumida preferencialmente. De fato, as mesmas observações já foram feitas para a co-fermentação de xilose e glicose por outras linhagens de *S. passalidarum* (JEFFRIES *et al.*, 2013; IVERSEN & AHRING, 2014). E, aparentemente, o efeito

negativo da glicose sobre o consumo de xilose está relacionado com a inibição das atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) (HOU, 2012) causada pela glicose.

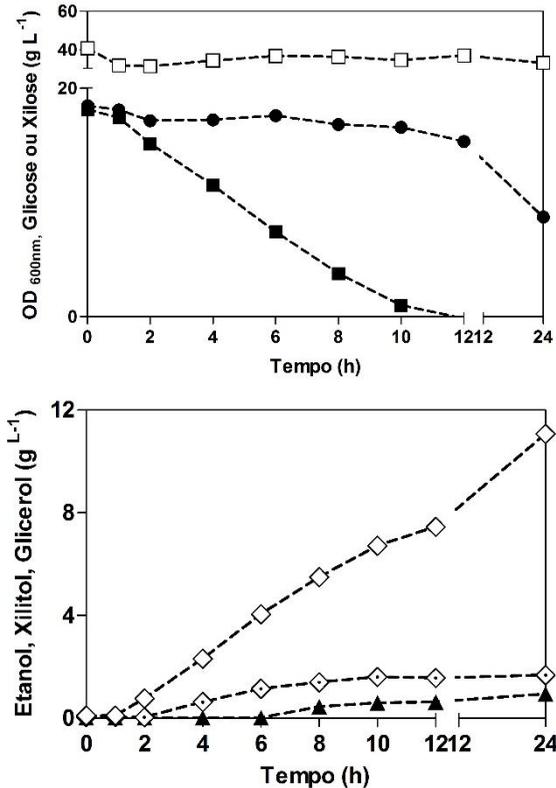


Figura 15 – Perfil fermentativo da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose. Painel superior: concentração celular (quadrado aberto), xilose (círculo) e glicose (quadrado fechado) Painel inferior: etanol (diamante), xilitol (triângulo) e glicerol (diamante pontuado).

Ainda conforme a Figura 15, a produção de metabólitos também foi alterada pela fermentação simultânea de ambos os açúcares. Enquanto que a produção de xilitol diminuiu para menos de 1 g/L, a produção de etanol aumentou para 11 g/L. A menor produção de xilitol provavelmente ocorreu em virtude de um menor consumo de xilose. Já a produção maior

de etanol, mostra que ambos os açúcares foram utilizados para produção do álcool.

Curiosamente, nas co-fermentações isenta de inibidores, observou-se também a produção de um terceiro metabólito, o glicerol (2 g/L). A produção de glicerol durante a fermentação é geralmente associada ao desbalanço redox entre os cofatores NADPH/NADH e ao estresse osmótico. De forma que, esse metabólito pode ser produzido para reoxidar o cofator NADH, ou para manter o equilíbrio osmótico entre a célula e o meio (HOHMANN, 2002). Como nas fermentações individuais de cada açúcar a linhagem não produziu glicerol, pode-se inferir que o consumo desses açúcares não sofreu com um desbalanço redox e que, portanto, a produção de glicerol nas co-fermentações poderia estar relacionada ao estresse osmótico causado pela presença dos 40 g/L de açúcares.

Após a co-fermentação ter sido realizada na ausência de inibidores, uma nova rodada de co-fermentações foi realizada em meios contendo 30 mM ou 60 mM de ácido acético. A Figura 16, apresenta os dados obtido nestas condições. Como mostra a figura, a presença concomitante de xilose, glicose e ácido acético inviabilizou a fermentação da levedura. Nenhum dos açúcares foi consumido e, conseqüentemente, não houve produção de metabólitos. De forma similar, a presença de 6 mM ou 10 mM de ácido fórmico também se mostraram tóxicas demais para permitir que a levedura conseguisse fermentar os açúcares disponíveis no meio (Figura 17).

As co-fermentações deixaram ainda mais evidente que apesar de ser uma ótima fermentadora de glicose e xilose, a levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 dificilmente poderia ser empregada como microrganismo fermentador para produção de etanol 2G. A levedura mostrou que, além de ser intolerante à baixas concentrações de ácido acético e ácido fórmico, tem o consumo de xilose reprimido pela presença mutua da glicose. A repressão do consumo da xilose vai contra as características desejadas pela indústria em virtude de que ambos os açúcares se encontram simultaneamente presentes nos hidrolisados lignocelulósicos, devendo ser eficientemente fermentados à etanol para garantir a viabilidade econômica do processo.

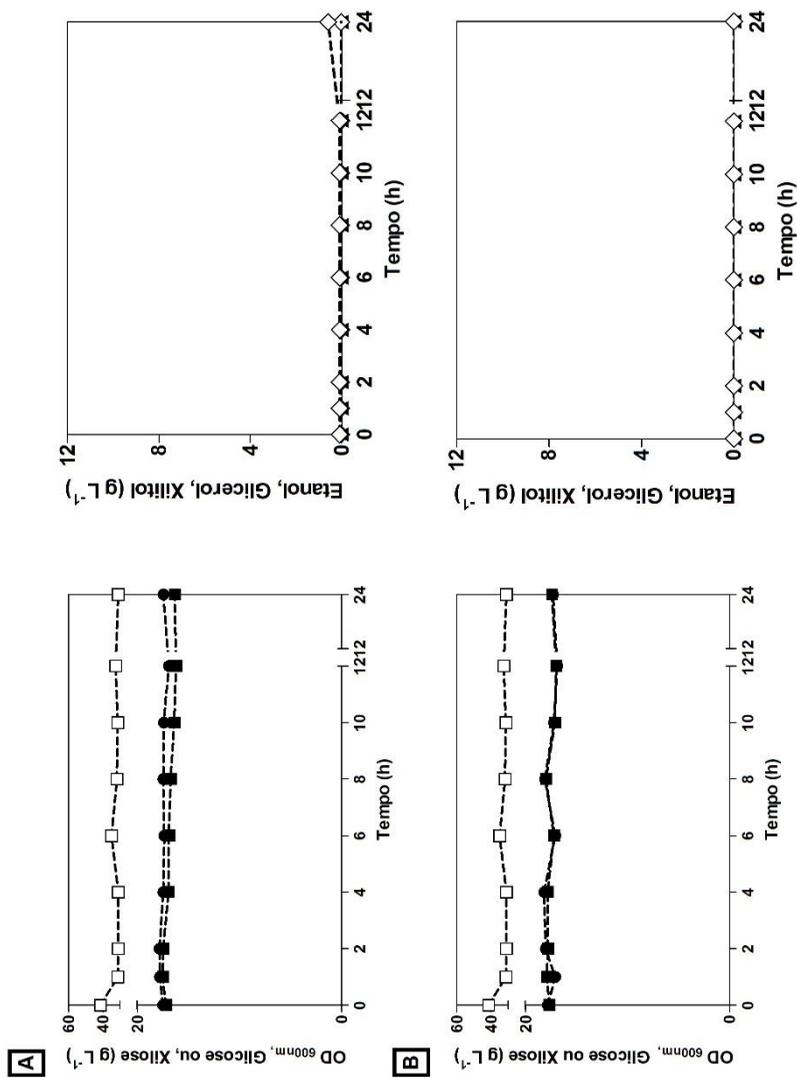


Figura 16 – Perfil fermentativo da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose, 20 g/L de glicose e (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético. Painel superior: concentração celular (quadrado aberto), xilose (círculo) e glicose (quadrado fechado) Painel inferior: etanol (diamante), xilitol (triângulo) e glicerol (diamante pontuado).

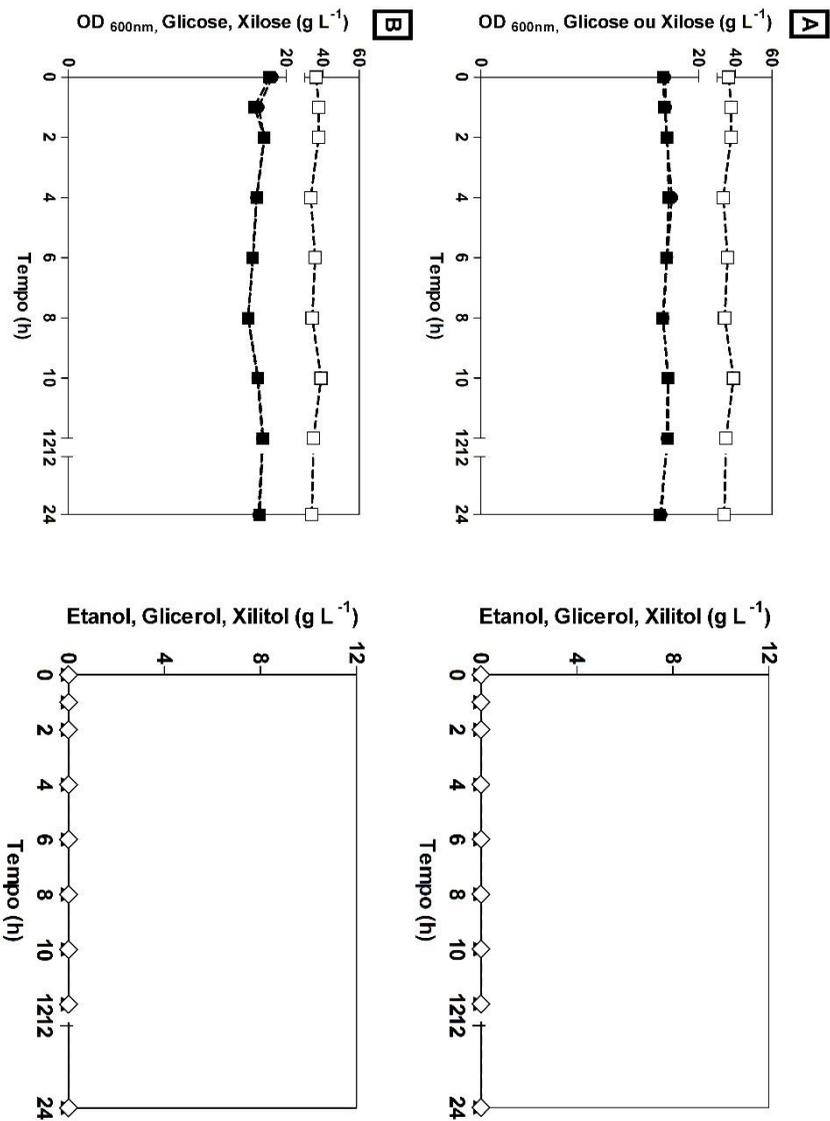


Figura 17 – Perfil fermentativo da levedura *S. passalidarum* UFMG-HMD 2.1 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose, 20 g/L de glicose e (A) 6 mM ou (B) 10 mM de ácido fórmico. Painel superior: concentração celular (quadrado aberto), xilose (círculo) e glicose (quadrado fechado) Painel inferior: etanol (diamante), xilitol (triângulo) e glicerol (diamante pontuado).

Linhagens MP-P5 e JDY-01 – *Saccharomyces cerevisiae*

4.4 ANÁLISE EM MICROESCALA DA TOLERÂNCIA DAS LINHAGENS MP-P5 E JDY-01 FRENTE AO ÁCIDO ACÉTICO E AO ÁCIDO FÓRMICO

A primeira análise do comportamento das linhagens MP-P5 e JDY-01 frente ao ácido acético e ao ácido fórmico foi realizada em microescala. As linhagens foram crescidas em microplacas de 96 poços contendo concentrações crescentes de ambos os inibidores. Os crescimentos em microescala foram realizados com o objetivo de triar as faixas de concentração de ácido acético e ácido fórmico que ambas as linhagens são capazes de tolerar quando duas fontes diferentes de carbono são disponibilizadas (xilose ou glicose). Os crescimentos foram realizados em meio sintético mínimo contendo 20 g/L de uma das fontes de carbono de interesse e uma das concentrações de ácido acético ou ácido fórmico listadas na Tabela 2 da Seção Material e Métodos. Utilizou-se ainda meio isento de inibidores como meio controle. Todos os microcrescimentos foram realizados em condições microaeróbias, e tiveram a sua concentração celular inicial ajustada para 0,1 (OD_{600nm}). A dosagem do etanol produzido ao final de cada microcrescimento foi feita enzimaticamente conforme descrito na seção 4 deste trabalho.

Os primeiros crescimentos em microescala foram realizados na presença de 20 g/L de xilose, acrescida ou não de uma das concentrações dos inibidores. Os resultados obtidos para esses microcrescimentos encontram-se nas Figuras 18 e 19. Como pode ser observado nas figuras, a tolerância da linhagem JDY-01 foi superior à da linhagem MP-P5, e a cepa recombinante que sobre expressa o gene *TALI* foi tolerante à concentrações de até 40 mM de ácido acético e 8 mM de ácido fórmico. Enquanto isso, a cepa parental foi tolerante somente a 10 mM de ácido acético. Notavelmente, mesmo no meio controle a linhagem JDY-01 cresceu melhor do que a linhagem MP-P5 e, enquanto a cepa parental apresentou um crescimento basal (OD_{600nm} 0,2), a cepa recombinante alcançou a maior concentração celular (OD_{600nm} 0,72) dentre todas as condições na qual foi testada. Em linha com a concentração celular alcançada, a cepa recombinante ainda produziu ~2 g/L de etanol. Esses resultados indicam que a sobre-expressão do gene *TALI* afetou profundamente a capacidade da linhagem JDY-01 de crescer em xilose, corrigindo, inclusive, o crescimento deficiente da linhagem parental em xilose pura. Nota-se, entretanto, que mesmo a linhagem JDY-01 foi

afetada pela presença dos inibidores, e concentrações tão baixas quanto 10 mM de ácido acético e 2 mM de ácido fórmico foram suficientes para aumentar a fase *lag* da linhagem e/ou diminuir a sua concentração celular. Todavia, esses efeitos são bem conhecidos, e estão relacionados com o período necessário para que a célula ative uma série de respostas moleculares e se adapte aos efeitos adversos desses inibidores (MIRA *et al.*, 2010), e com o déficit energético que a ativação desses mecanismos de detoxificação gera (WARTH, 1988; PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 2000, SWINNEN *et al.*, 2014).

Nos microcrescimentos realizados em 20 g/L de glicose (Figuras 20 e 21), os perfis de crescimento das linhagens JDY-01 e MP-P5 em meio sem inibidor (meio controle) foi similar. As linhagens ainda foram igualmente tolerantes a concentrações de até 60 mM de ácido acético e 10 mM de ácido fórmico. Todavia, as fases *lag* das linhagens e a suas concentrações celulares também foram afetadas por concentrações tão baixas quanto 10 mM de ácido acético e 2 mM de ácido fórmico, sendo que esses efeitos aumentaram de forma diretamente proporcional às concentrações crescentes dos compostos inibidores. Esses resultados indicam que sobre expressão do gene *TALI* não alterou o crescimento ou a tolerância das cepas quando glicose foi disponibilizada como fonte de carbono. De fato, esse resultado era esperado visto que a transaldolase codificada pelo gene *TALI* não participa diretamente do metabolismo da glicose. Esses resultados indicam ainda que os efeitos negativos do ácido acético e do ácido fórmico foram similares nas duas fontes de carbono utilizadas.

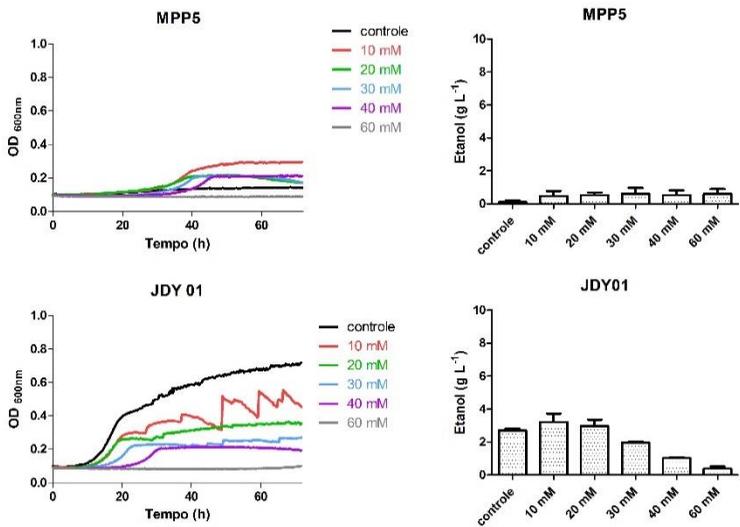


Figura 18 - Crescimento em microescala (painel esquerdo) e produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JDY-01 na presença de 20 g/L de xilose e concentrações crescentes de ácido acético.

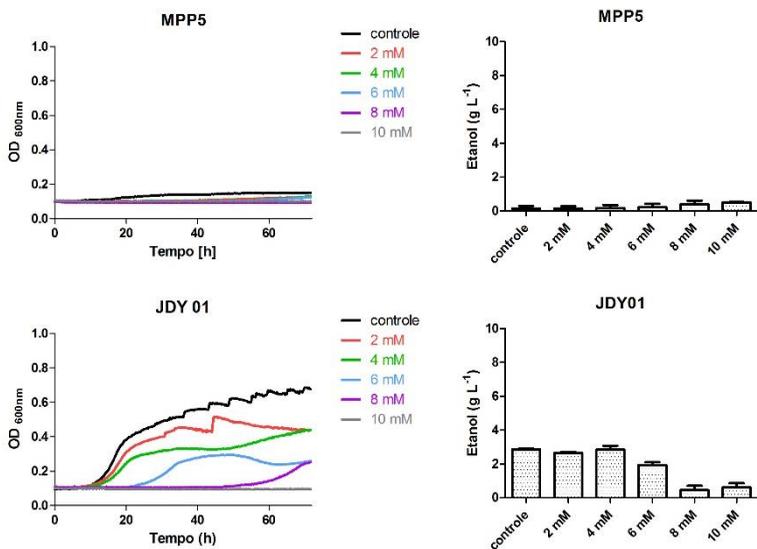


Figura 19 - Crescimento em microescala (painel esquerdo) e produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JDY-01 na presença de 20 g/L de xilose e concentrações crescentes de ácido fórmico.

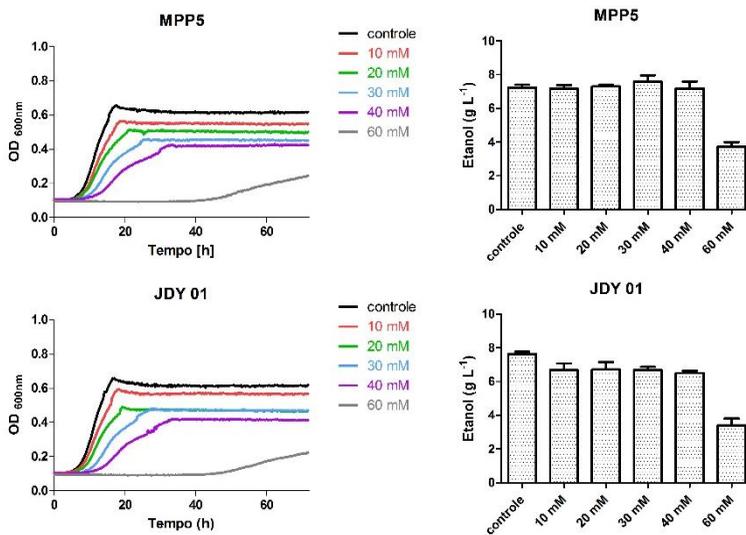


Figura 20 - Crescimento em microescala (painel esquerdo) e produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JDY-01 na presença de 20 g/L de glicose e concentrações crescentes de ácido acético.

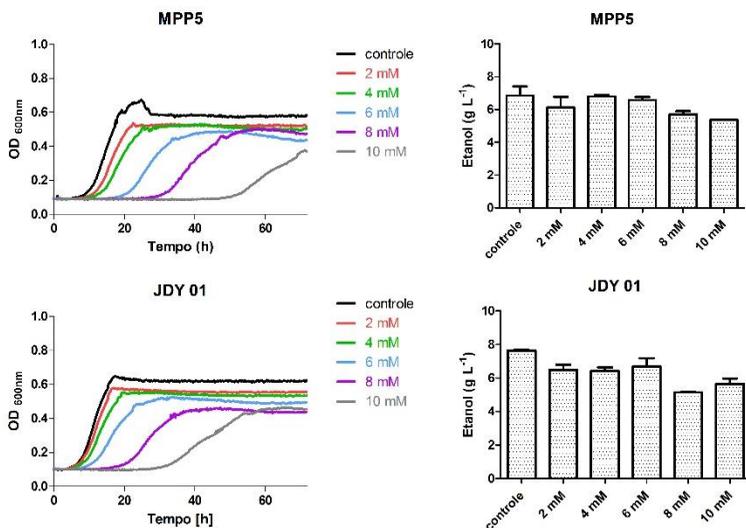


Figura 21 - Crescimento em microescala (painel esquerdo) e produção de etanol (painel direito) das linhagens MP-P5 e JDY-01 na presença de 20 g/L de glicose e concentrações crescentes de ácido fórmico.

4.5 ANÁLISE DO CRESCIMENTO AERÓBIO DAS LINHAGENS MP-P5 E JDY-01 NA PRESENÇA DE ÁCIDO ACÉTICO OU ÁCIDO FÓRMICO

Com o propósito de melhor avaliar o comportamento das linhagens JDY-01 e MP-P5 frente ao ácido acético e ao ácido fórmico, ambas as linhagens tiveram os seus perfis de crescimento aeróbio analisados na presença desses inibidores. A partir dos crescimentos em microescala, duas concentrações de ácido acético (30 mM e 60 mM) e duas concentrações de ácido fórmico (6 mM e 10 mM) foram selecionadas para serem utilizadas nos crescimentos aeróbios. Com o propósito de referência, as linhagens também foram crescidas em meio sem inibidores (meio controle). Todos os crescimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer contendo meio sintético suplementado com 20 g/L de xilose ou glicose, e iniciaram com uma concentração celular igual a 0,1 (OD_{600nm}).

4.5.1 Crescimentos aeróbios em xilose

Os crescimentos das linhagens MP-P5 e JDY-01 em xilose foram primeiramente realizados em meio controle (sem inibidores), e os resultados destes crescimentos podem ser vistos na Figura 22. Comparando as duas linhagens, já na presença exclusiva de xilose, percebe-se que a sobre expressão do gene *TALI* foi suficiente para melhorar o consumo de açúcar e a produção de biomassa da linhagem JDY-01, indicando que essa modificação genética pode ter aumentado o fluxo de xilose para a PPP. Mais especificamente, em 72 h de experimento, a linhagem JDY-01 consumiu 93% da xilose presente no meio e atingiu uma concentração celular final de 18 (OD_{600nm}). Enquanto isso, a linhagem MP-P5 mostrou um perfil de crescimento lento no qual apenas 10% do açúcar presente no meio foi consumido, resultando em uma baixa concentração celular (1,72 OD_{600nm}). O açúcar consumido por ambas as linhagens, no entanto, não foi direcionado para produção de etanol.

Outros autores já reportaram a melhora no crescimento em xilose de linhagens de *S. cerevisiae* sobre expressando o gene *TALI* (WALFRIDSSON *et al.*, 1995; NI *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014; LINCK *et al.*, 2014). No entanto, a melhora no crescimento aeróbio da linhagem JDY-01 utilizada neste trabalho foi maior do que o apresentado por esses autores. Uma explicação para tal resultado pode ser a origem industrial

da linhagem. Curiosamente, esses autores reportaram também que as linhagens recombinantes utilizadas não produziram etanol, mas redirecionaram parte do açúcar consumido para produção de xilitol. Aqui, a produção de xilitol pela linhagem JDY-01 não foi observada.

Quando crescidas na presença de 30 mM ou 60 mM de ácido acético, a superioridade da linhagem JDY-01 em relação à linhagem MP-P5 se manteve (Figura 23). E, mesmo na presença do ácido acético, a sobre expressão do gene *TAL1* foi suficiente para que o consumo de açúcar e a produção de biomassa da linhagem JDY-01 fosse maior do que o da parental. Na presença de 30 mM do inibidor, a linhagem JDY-01 consumiu 85,34% do açúcar presente no meio e atingiu uma concentração celular final de 17 (OD_{600nm}) (Figura 23-A). Enquanto isso, a linhagem MP-P5 apresentou uma fase *lag* quase duas vezes maior do que a da linhagem JDY-01, consumiu apenas 40,14% da xilose presente no meio, e alcançou uma concentração celular final de apenas 11 (OD_{600nm}). Ainda mais contrastante, na presença de 60 mM de ácido acético, apenas a linhagem JDY-01 foi capaz de crescer e consumir xilose. A adição de 60 mM do inibidor, no entanto, aumentou em cerca de três vezes a fase *lag* da linhagem, e afetou a sua produção de biomassa (OD_{600nm} de 6,67 após 72 h) e consumo de açúcar (16,12% após 72 h) (Figura 23-B). Novamente, não se observou a produção de etanol por ambas as linhagens.

Ressalta-se que, apesar da linhagem JDY-01 ter sido mais tolerante ao ácido acético do que a linhagem MP-P5, o crescimento da linhagem MP-P5 foi aparentemente estimulado pela presença do inibidor em uma baixa concentração. Isso porque na presença de 30 mM de ácido acético a linhagem cresceu ~20 h mais cedo e consumiu 4 vezes mais xilose do que quando cultivada em meio controle. Já foi reportado na literatura que baixas concentrações de ácidos carboxílicos fracos parecem estimular o consumo de açúcar e a produção de ATP de linhagens expostas a esses inibidores (WARTH, 1998; PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2007; BELLISSIMI *et al.*, 2009; JÖNSSON, *et al.*, 2013; SWINNEN *et al.*, 2014). Esses efeitos, entretanto, só haviam sido reportados em condições anaeróbias. Aqui sugere-se que o comportamento da linhagem MP-P5 foi estimulado pelo ácido acético também na condição aeróbia. Os mecanismos por trás deste estímulo, no entanto, não ficaram claros.

Diferente do esperado, nos crescimentos contendo 6 mM ou 10 mM de ácido fórmico, tanto a linhagem MP-P5 quanto a linhagem JDY-01 não cresceram nem consumiram a xilose presente no meio (Figura 24-

A e B). Portanto, a sobre expressão do gene *TALI*, aparentemente, não foi suficiente para melhorar o perfil de crescimento aeróbio da linhagem JDY-01 na presença deste ácido. Enquanto que para a linhagem MP-P5 este resultado já havia sido observado no crescimento em microescala, para a linhagem JDY-01 este resultado foi o contrário do previamente visto. No crescimento em microplaca, quando xilose foi utilizada como fonte de carbono, a linhagem JDY-01 mostrou tolerância às concentrações de até 8 mM de ácido fórmico. O crescimento aeróbio, no entanto, mostrou que uma concentração de 6 mM desse inibidor foi suficiente para impedir o crescimento da linhagem JDY-01 em condições aeróbicas.

No geral, os resultados obtidos aqui mostraram que, também em condições aeróbicas, a sobre-expressão do gene *TALI* teve um efeito positivo sobre o crescimento da linhagem JDY-01 em xilose pura ou acrescida de ácido acético. Principalmente, os crescimentos aeróbios mostraram que o melhor crescimento da linhagem JDY-01 foi acompanhado de um consumo mais eficiente de xilose. De fato, como mencionado na Introdução deste trabalho (Seção 1), a enzima transaldolase codificada pelo gene *TALI* tem sido apontada como uma das enzimas responsáveis por controlar o fluxo da fase não oxidativa da via das pentoses fosfatos (PPP), e a sua sobre expressão vem sendo apontada como uma alternativa para melhorar o consumo da xilose e, conseqüentemente, o crescimento das linhagens nesta pentose (SENAC & HAHN-HAGERDAL, 1990; WALFRIDSSON *et al.*, 1995; HASUNUMA *et al.*, 2011).

Pode-se ainda extrapolar a interpretação dos resultados obtidos nos crescimentos aeróbios e sugerir que o maior consumo de xilose foi o que permitiu a maior tolerância da linhagem JDY-01 a ambos os inibidores. Isso porque os mecanismos de detoxificação utilizados pelas leveduras para contornar os efeitos dos ácidos carboxílicos fracos geram um déficit energético (WARTH, 1988; PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 2000; SWINNEN *et al.*, 2014) que pode ser suprido pelo consumo da fonte de carbono no meio. Uma vez que a linhagem JDY-01 consumiu mais eficientemente a xilose do meio, mais energia pode ter sido direcionada para ativação e manutenção desses mecanismos de detoxificação, melhorando a tolerância da linhagem aos compostos inibitórios.

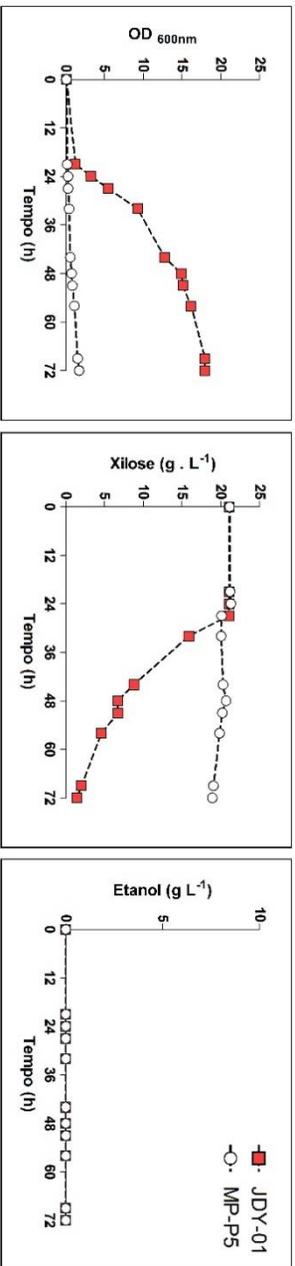


Figura 22 - Crescimento aeróbio das leveduras MP-P5 e JDY-01 na presença de 20 g/L de xilose. Concentração celular (OD_{600nm}) (painel esquerdo), consumo de açúcar (painel central), produção de etanol (painel direito).

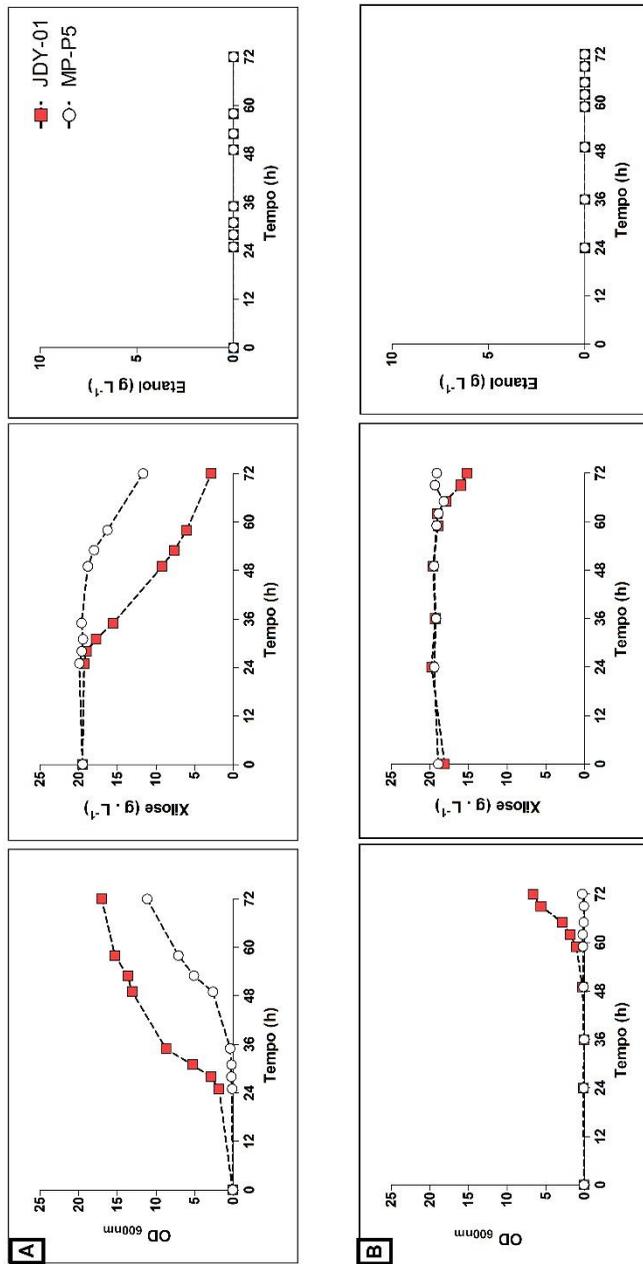


Figura 23 - Crescimento aeróbio das linhagens MP-P5 e JDY-01 na presença de 20 g/L de xilose acrescida de (A) 30 mM (B) 60 mM de ácido acético. Concentração celular (OD_{600nm}) (painel esquerdo), consumo de açúcar (painel central), produção de etanol (painel direito).

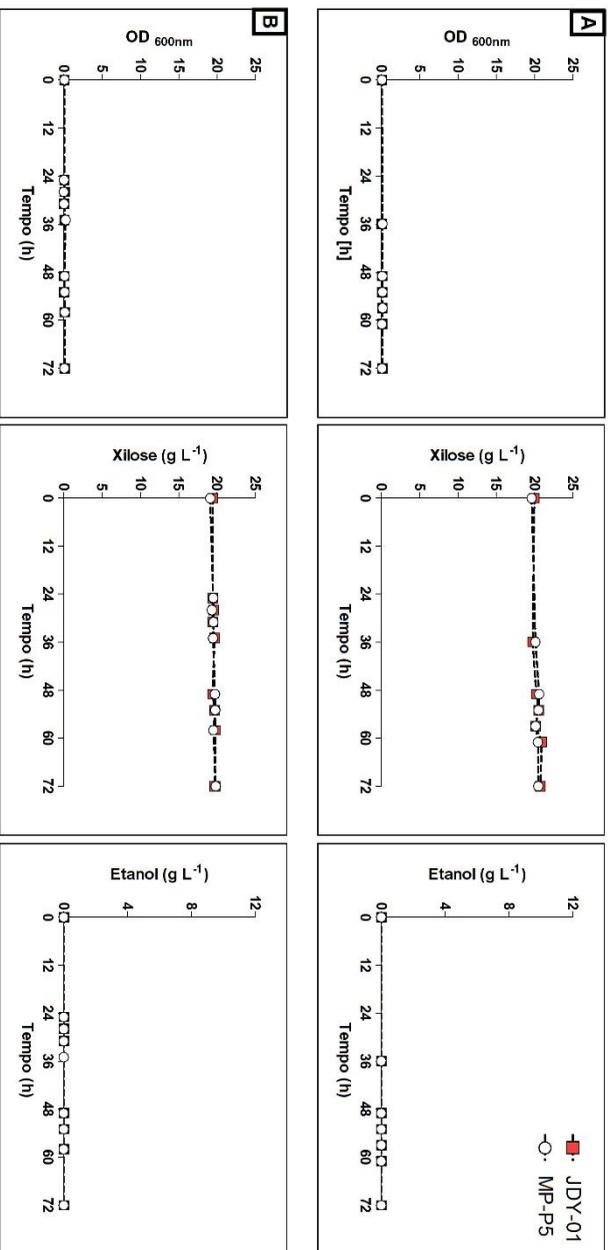


Figura 24 - Crescimento aeróbico das linhagens MP-P5 e JDY-01 na presença de 20 g/L de xilose acrescida de (A) 6 mM ou (B) 10 mM de ácido fórmico. Concentração celular (OD_{600nm}) (painel esquerdo), consumo de açúcar (painel central), produção de etanol (painel direito).

4.5.2 Crescimentos aeróbios em glicose

Da mesma forma que nos crescimentos em microescala, os crescimentos aeróbios em glicose foram realizados a fim de confirmar que a sobre expressão do gene *TAL1* não interfere no crescimento e não altera a tolerância da linhagem JDY-01 em meios contendo esta hexose. Os resultados obtidos para o crescimento aeróbio das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio contendo apenas glicose (meio controle) são mostrados na Figura 25. Conforme esperado, quando crescidas em meio controle, a linhagem parental (MP-P5) e a linhagem recombinante (JDY-01) não apresentaram diferenças entre os seus perfis de crescimento, consumo de açúcar e produção de etanol. Nesta condição, os 20 g/L de glicose presente no meio foram consumidos por ambas linhagens em aproximadamente 20 h, e a produção de etanol chegou a ~8 g/L (Figura 25). Ainda, parte do etanol produzido foi consumido após a depleção da glicose no meio, ao mesmo tempo a concentração celular de ambas as linhagens continuou a aumentar. Isso indica que, após a depleção da glicose, o etanol passou a ser consumido como fonte de carbono para manter o crescimento das células.

Quando crescidas na presença de 30 mM e 60 mM de ácido acético (Figura 26), novamente, as linhagens JDY-01 e MP-P5 cresceram de forma similar. A presença do ácido acético, no entanto, afetou o crescimento celular e o consumo de açúcar de ambas as cepas. Conforme a Figura 26-A, na presença de 30 mM de ácido acético, a fase *lag* das linhagens aumentou de 12 h para aproximadamente 18 h, e a concentração celular diminuiu para metade (OD_{600nm} de 8 para 4) daquela obtida quando o inibidor não estava presente.

O efeito negativo do inibidor sobre o crescimento celular também influenciou negativamente o consumo de açúcar, de forma que, a depleção da glicose presente no meio ocorreu após 30 h de crescimento. O pico máximo de etanol produzido também ocorreu mais tardiamente (34 h), mas manteve-se em ~8 g/L. Na presença de 60 mM de ácido acético a fase *lag* das linhagens estendeu-se à 48 h e a concentração celular total não ultrapassou 3 (OD_{600nm}). O consumo total do açúcar presente no meio foi igualmente tardio, ocorrendo em 60 h, com produção máxima de 9 g/L de etanol após 70 h de crescimento (Figura 26-B).

É interessante ressaltar que nas duas concentrações de ácido acético a produção de etanol manteve-se, mesmo após a diminuição da biomassa celular causada pela presença do inibidor. Isso pode indicar que a produção do álcool pelas linhagens é mais dependente do eficiente

consumo da glicose do que de uma alta concentração celular. Ainda, o efeito negativo do ácido acético sobre o crescimento de linhagens de *S. cerevisiae* em glicose já foi observado anteriormente por Ludovico e col. (2001). De acordo com esse autor a presença de 20-200 mM do ácido induziu a morte celular programada de linhagens crescidas em meio contendo glicose e ácido acético.

Quando as linhagens foram crescidas na presença de ácido fórmico, seus perfis de consumo de açúcar, produção de etanol e produção de biomassa diferiram levemente, mas não o suficiente para se inferir que o gene *TAL1* afetou negativamente o crescimento da linhagem JDY-01 nesta condição (Figura 27). Na presença de ácido fórmico a uma concentração de 6 mM, a linhagem MP-P5 apresentou uma fase *lag* ligeiramente menor do que aquela observada para a linhagem JDY-01, e consumiu todo o açúcar presente no meio mais precocemente, em aproximadamente 50 h (Figura 27-A). De forma similar, a produção de etanol pela linhagem MP-P5 iniciou mais cedo do que o observado para a linhagem JDY-01, ocorrendo em aproximadamente 36 h. A linhagem JDY-01, por sua vez, consumiu toda a glicose do meio em 60 h, e iniciou sua produção de etanol em 50 h. Notavelmente, ambas as linhagens atingiram a mesma produção de biomassa ao final do crescimento, e produziram a mesma quantidade máxima de etanol, cerca de 10 g/L. Na presença de 10 mM de ácido fórmico, nenhuma das linhagens conseguiu crescer e consumir a glicose presente no meio (Figura 27-B). De forma geral, os inibidores afetaram as linhagens da mesma forma com que fizeram nos crescimentos em xilose, aumentando a fase *lag*, diminuindo a concentração celular, e atrasando o consumo da glicose.

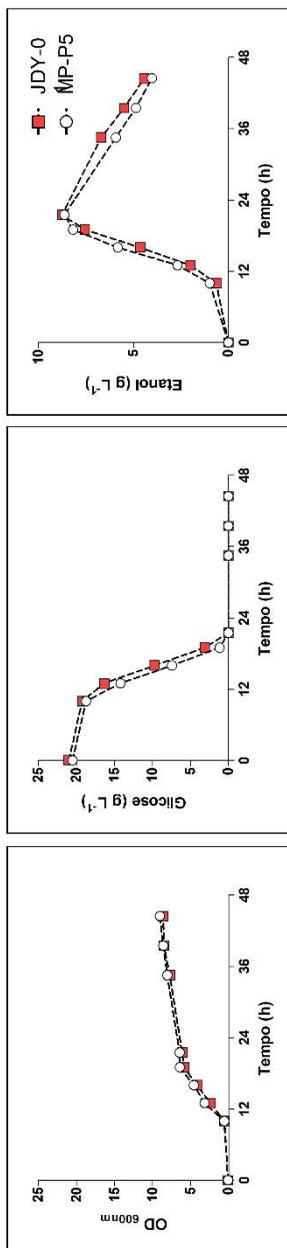


Figura 25 - Crescimento aeróbio das linhagens MP-P5 e JDY-01 na presença de 20 g/L de glicose. Concentração celular (OD_{600nm}) (painel esquerdo), consumo de açúcar (painel central), produção de etanol (painel direito).

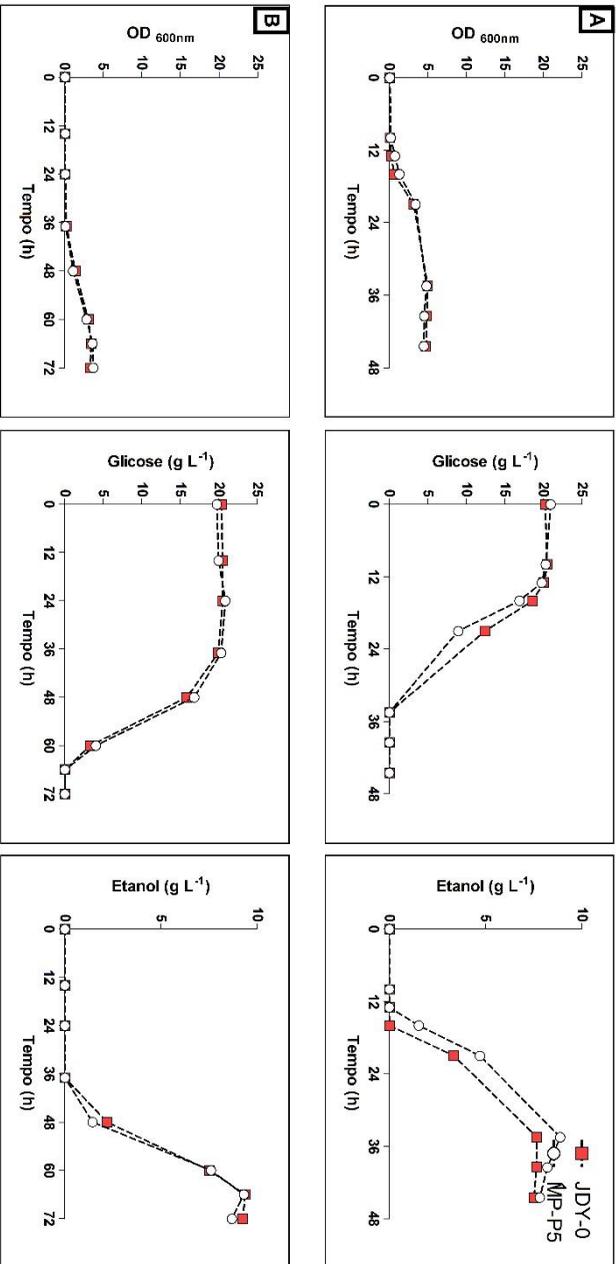


Figura 26 - Crescimento aeróbio das linhagens MP-P5 e JDY-01 na presença de 20 g/L de glicose acrescida de (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético. Concentração celular (OD_{600nm}) (painel esquerdo), consumo de açúcar (painel central), produção de etanol (painel direito).

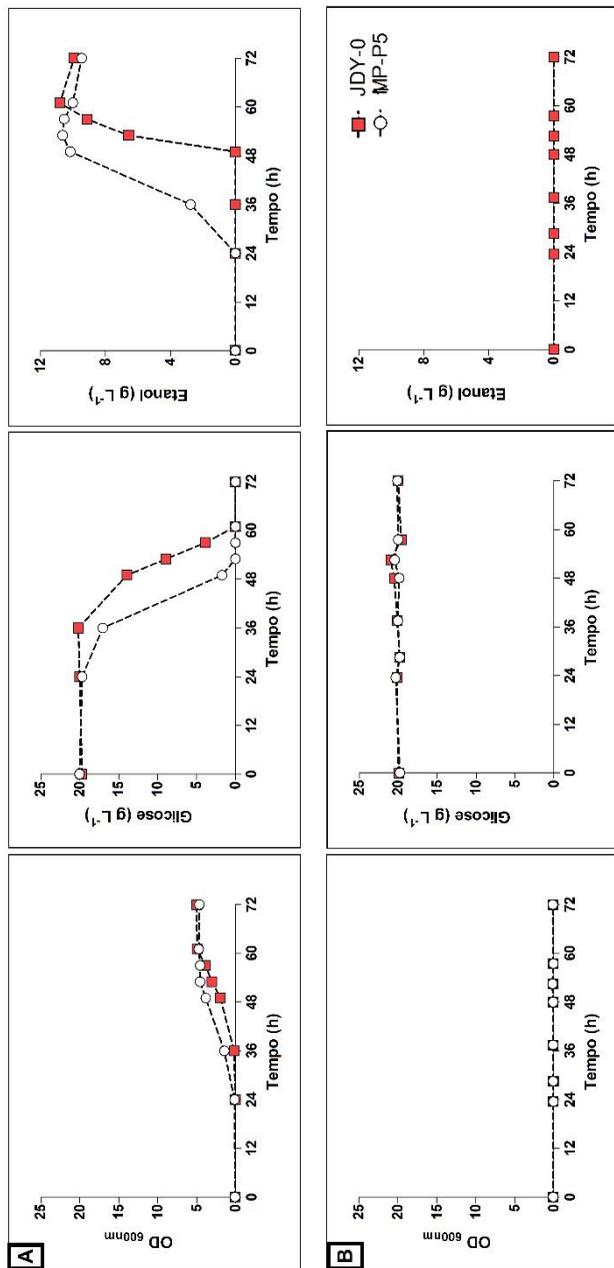


Figura 27 - Crescimento aeróbio das linhagens MP-P5 e JDY-01 na presença de 20 g/L de glicose acrescida de (A) 6 mM ou (B) 10 mM de ácido fórmico. Concentração celular (OD_{600nm}) (painel esquerdo), consumo de açúcar (painel central), produção de etanol (painel direito).

4.6 ANÁLISE DO PERFIL FERMENTATIVO DAS LINHAGENS MP-P5 E JDY-01 FRENTE AO ÁCIDO ACÉTICO E AO ÁCIDO FÓRMICO

As fermentações em batelada foram realizadas com o objetivo de comparar o comportamento das linhagens MP-P5 e JDY-01 quando essas cepas são submetidas às condições fermentativas similares às aquelas utilizadas nas indústrias sucroalcooleiras. Para isso as fermentações foram realizadas em condições microaeróbias e na presença de altas concentrações celulares (10 g/L). Todas as fermentações foram realizadas em meio sintético contendo 20 g/L de xilose ou glicose, acrescidos ou não das concentrações de (30-60 mM) ácido acético ou (6-10mM) de ácido fórmico. Foram realizadas ainda, ensaios de co-fermentação com ambos os açúcares a uma concentração inicial de 20 g/L.

4.6.1 Fermentação em batelada simples em xilose

O primeiro ensaio de fermentação em xilose foi realizado na ausência de inibidores. Os resultados obtidos nesta condição são mostrados na Figura 28. Como mostra a figura, ao contrário do esperado pelo perfil de crescimento (vide acima), não houve diferença entre o consumo de xilose e a produção de metabólitos pelas linhagens JDY-01 e MP-P5. Ao invés disso, o consumo de xilose pelas duas linhagens foi similar e quase todo o açúcar presente no meio foi consumido já nas 12 primeiras horas de fermentação. A produção de etanol acompanhou o consumo de açúcar e ambas as linhagens produziram cerca de ~6 g/L do álcool. As linhagens produziram ainda ~5 g/L de xilitol. Esses resultados vão contra os previamente observados nos crescimentos aeróbios e nos microcrescimentos, e indicam que a sobre expressão do gene *TALI* não melhorou o perfil fermentativo da linhagem JDY-01.

O segundo ensaio de fermentação em xilose foi realizado na presença de 30 mM (Figura 29-A) e 60 mM (Figura 29-B) de ácido acético. Novamente, mesmo na presença do inibidor, o perfil fermentativo das cepas pouco diferiu. A adição do inibidor, entretanto, afetou severamente o consumo de açúcar e a produção de etanol de ambas as cepas. Na presença de 30 mM de ácido acético, as linhagens JDY-01 e MP-P5 consumiram apenas ~30% da xilose presente no meio após as 24 h de fermentação, e a produção de etanol e xilitol também diminuiu para 2-3 g/L e 1 g/L, respectivamente. O consumo de xilose na presença de 60 mM de ácido acético foi ainda menor (~15%), e a produção de etanol

mantve-se em 1 g/L. Não houve produção de xilitol na presença de 60 mM de ácido acético.

O terceiro ensaio de fermentação em xilose foi realizado na presença de 6 mM e 10 mM de ácido fórmico. Como pode ser observado na Figura 32, o perfil fermentativo apresentado pelas linhagens foi ainda mais contrastante com aqueles observados no meio controle, e tanto na presença de 6 mM quanto de 10 mM de ácido fórmico, nenhuma das linhagens conseguiu fermentar o açúcar presente no meio (Figura 30).

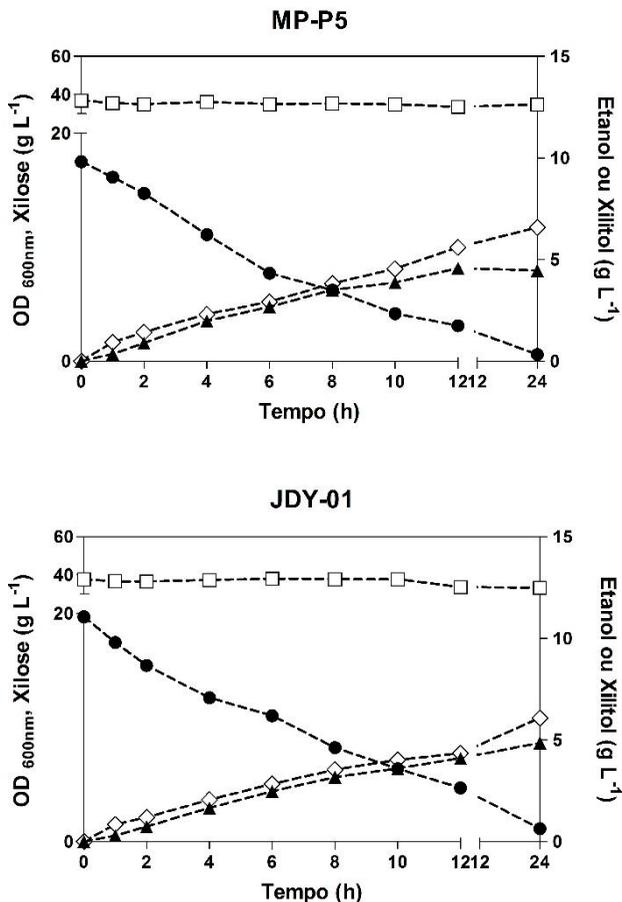


Figura 28- Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose. Concentração celular (quadrado), xilose (círculo), etanol (diamante) e xilitol (triângulo).

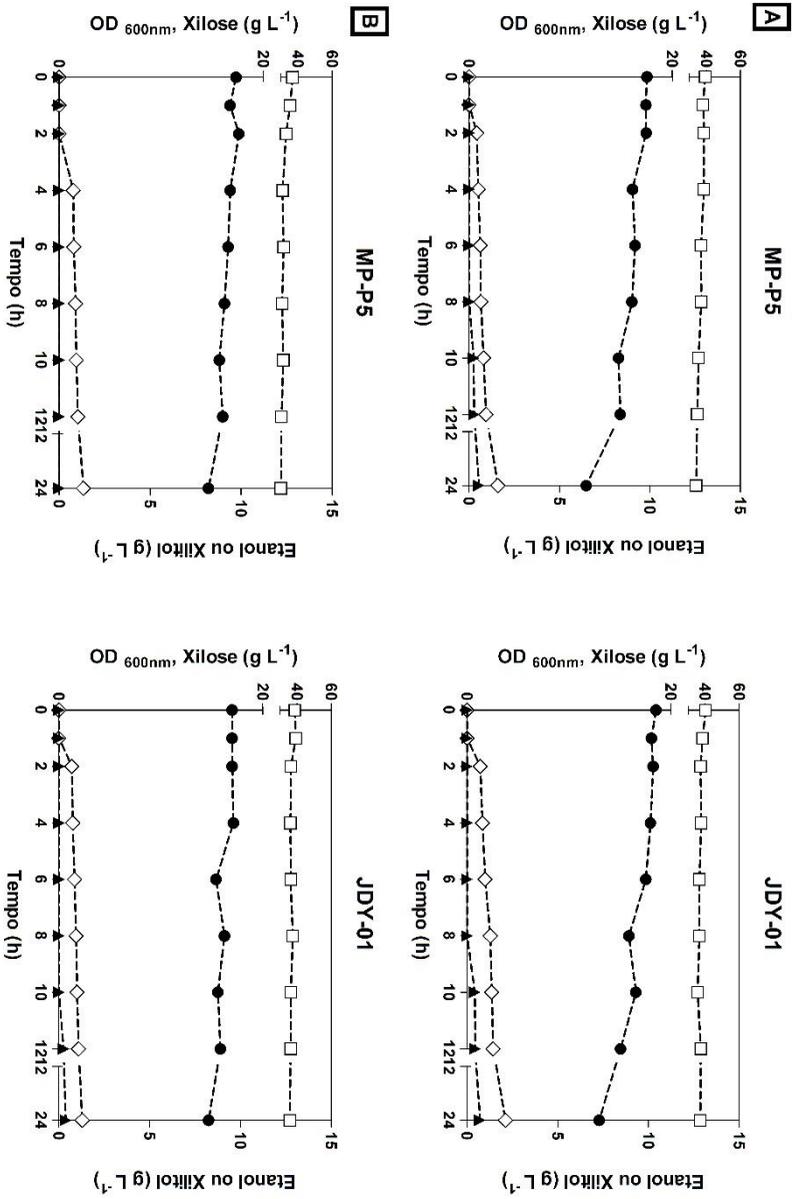


Figura 29- Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose acrescida de (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético. Concentração celular (quadrado), xilose (círculo), etanol (diamante) e xilitol (triângulo).

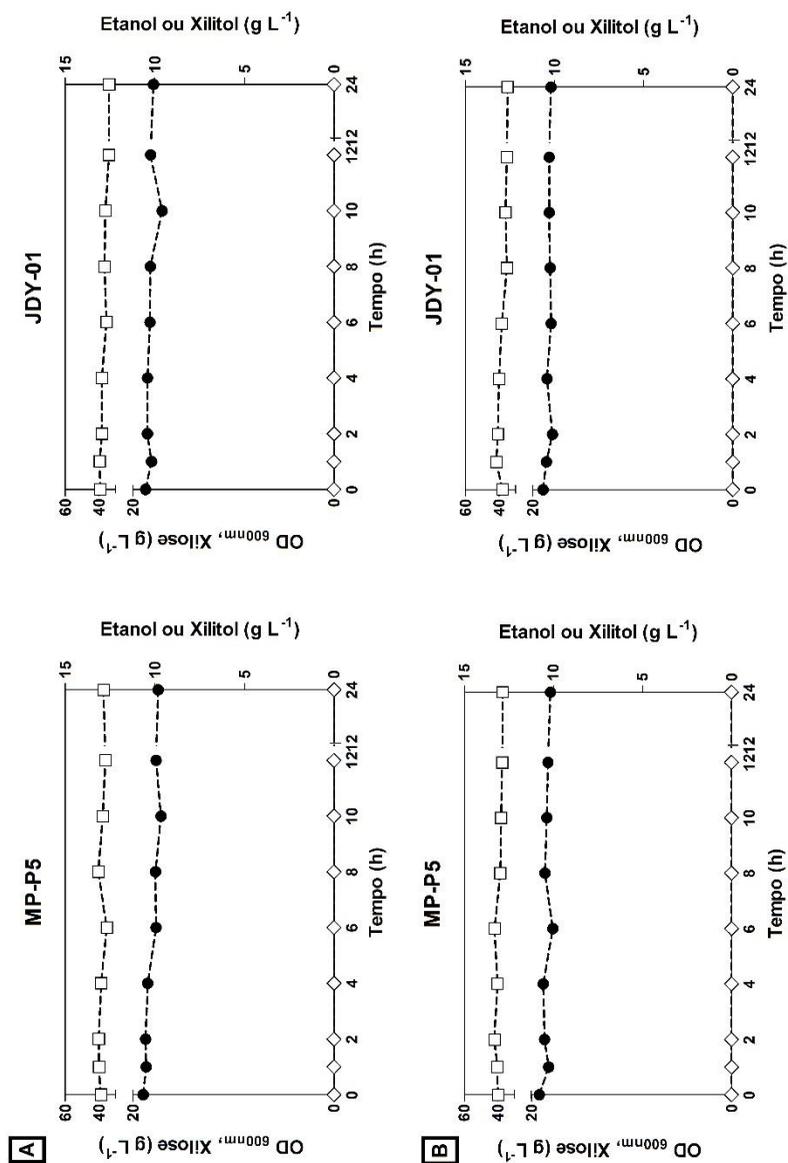


Figura 30- Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de xilose acrescida de (A) 6 mM ou (B) 10 mM de ácido fórmico. Concentração celular (quadrado), xilose (círculo), etanol (diamante) e xilitol (triângulo).

Diferente do relatado por outros autores (HASUNUMA *et al.*, 2011; SANDA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014), os resultados das fermentações em xilose obtidas no presente trabalho, mostraram que a linhagem sobre expressando o gene *TALI* não apresentou melhora no seu consumo de açúcar, produção de etanol ou tolerância aos ácidos carboxílicos em condições fermentativas. Em Hasunuma (2011), na presença de 30 mM de ácido acético e 40 g/L de xilose, a linhagem recombinante utilizada pelos autores (MT8-1X/TAL) havia produzido 1.72 vezes mais etanol do que a linhagem controle. Em Sanda (2011), a linhagem recombinante utilizada (MT8-1X/TAL-p*H) havia consumido os 40 g/L de xilose presentes no meio duas vezes mais rápido do que a linhagem controle. Aqui, no entanto, a linhagem controle e a linhagem recombinante não só mostraram o mesmo perfil fermentativo em todas as condições testadas, como também foram fortemente afetadas pelos inibidores. Todavia, é relevante destacar que a ausência dos efeitos esperados em relação à sobre expressão do gene *TALI* já foi reportada na literatura por Matsushika e col. (2012), e da mesma forma com que fez o autor, serão apresentadas aqui duas sugestões que possivelmente expliquem os resultados observados.

Primeiramente, nas fermentações em xilose houve o acúmulo de uma grande quantidade de xilitol (~5 g/L). Esse intermediário da via das pentoses fosfatos não havia sido observado durante os crescimentos aeróbios, e o seu aparecimento durante as fermentações sugere a presença de um desbalanço redox intracelular. Conforme mencionado anteriormente (Seção 1-Introdução), as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), responsáveis pelas etapas iniciais de assimilação da xilose, têm preferências distintas pelos cofatores NADPH/NADH. Enquanto a XR utiliza preferencialmente NADPH, a enzima XDH é NAD⁺ dependente. Essa diferença na utilização de cofatores gera um desbalanço redox intracelular que é especialmente evidente em condições limitadas de oxigênio. Isso porque na ausência de oxigênio o NADH não consegue ser regenerado em quantidades suficientes, enquanto o NADPH é regenerado pela via das pentoses fosfato. A regeneração insuficiente de NADH interrompe a metabolização da xilose e acarreta no acúmulo do substrato da XDH, o xilitol (revisto por Van MARIS *et al.*, 2006; e por MATUSHIKA *et al.*, 2009). Portanto, o acúmulo de xilitol nas fermentações e a sua ausência nos crescimentos aeróbios, é um forte indicativo de desbalanço redox. Uma vez que há desbalanço redox, os problemas nas partes iniciais da via de metabolização da xilose desviam a xilose assimilada para a produção

de xilitol e, assim, diminuem a quantidade de xilose que entra na PPP. Uma vez que menos xilose entra na PPP, os efeitos positivos da sobre expressão da TAL talvez deixem de ser observados.

Em segundo lugar está a sobre expressão em níveis inadequados do gene *TALI*. Lu & Jeffries (2007) reportaram que o efeito positivo da sobre expressão do gene *TALI* sobre a produção de etanol está relacionado com a expressão moderada do gene referido. Na linhagem JDY-01 sabe-se que a expressão do gene *TALI* esta sob o controle do promotor forte e constitutivo do gene *ADH1* – gene que codifica para a enzima álcool desidrogenase de *S. cerevisiae*. Todavia, não foram realizados ensaios que quantifiquem o nível de expressão do gene *TALI* na linhagem JDY-01, de forma que, a sobre expressão do gene pode não ter alcançado os níveis necessários para que os seus efeitos fossem observados.

4.6.2 Fermentação em batelada simples em glicose

Mesmo tendo obtido resultados diferentes do esperado nas fermentações em xilose, as linhagens ainda foram submetidas à fermentação de meio contendo glicose. As fermentações em glicose foram feitas com o propósito de confirmar que a sobre expressão do gene *TALI* não alterou o perfil fermentativo da linhagem JDY-01 nesta hexose. Mas principalmente, as fermentações em glicose foram feitas como forma de estabelecer o perfil fermentativo das linhagens na presença individual desse açúcar. De forma que nas co-fermentações (Tópico 4.6.3) fosse possível verificar se o consumo da glicose foi alterado pela presença da xilose. Novamente, as fermentações foram realizadas primeiramente em meio controle, e os resultados obtidos nesta condição podem ser observados na Figura 31. Conforme o esperado, na ausência de inibidores, os perfis fermentativos das linhagens MP-P5 e JDY-01 foram iguais. Sobretudo, a glicose foi rapidamente fermentada pelas duas linhagens nas primeiras 4 h de fermentação e, da glicose consumida, a maior parte foi convertida em etanol a uma eficiência de 90%.

Com a adição de 30 mM e 60 mM de ácido acético, os perfis fermentativos das linhagens permaneceram semelhantes (Figura 32). Todavia, a presença do ácido afetou o consumo da glicose de ambas as linhagens, corroborando com o que já havia sido observado nos crescimentos aeróbios e nos microcrescimentos. Na concentração de 30 mM do ácido, o consumo completo da glicose pelas cepas ocorreu nas primeiras 6 h de fermentação (Figura 32-A), enquanto que na presença de

60 mM do inibidor, o açúcar só foi completamente consumido após 12 h (Figura 32-B). Apesar do efeito inibitório do ácido acético sobre o consumo da glicose, a quantidade de etanol produzida pelas cepas permaneceu entre 9-10 g/L nas duas condições.

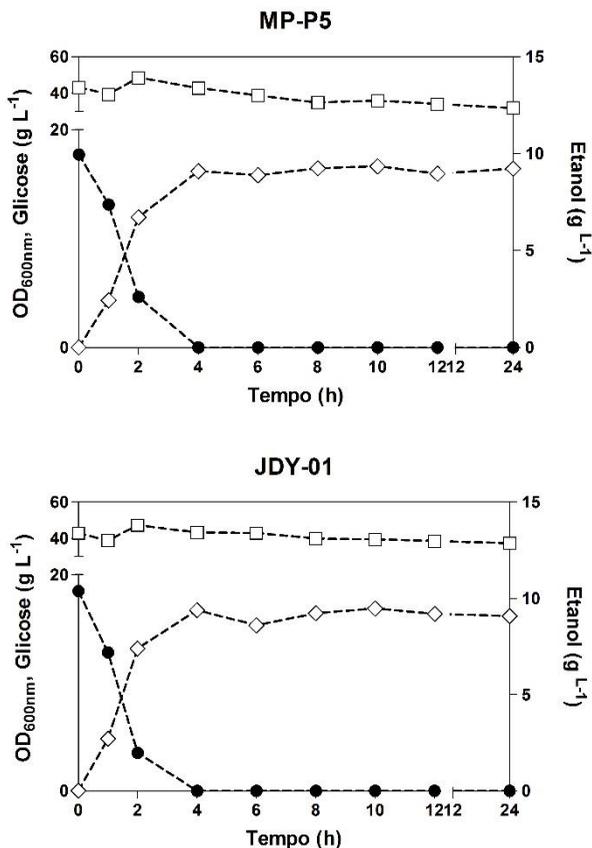


Figura 31- Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose. Concentração celular (quadrado), glicose (círculo) e etanol (diamante).

Nas fermentações em ácido fórmico, o consumo de glicose por ambas as linhagens foi mais afetado (Figura 33). A presença de 6 mM do inibidor atrasou e diminuiu o consumo desta hexose, e durante as 12 h primeiras horas de fermentação apenas 40% da glicose presente no meio foi consumida. A produção de etanol foi igualmente tardia e ocorreu

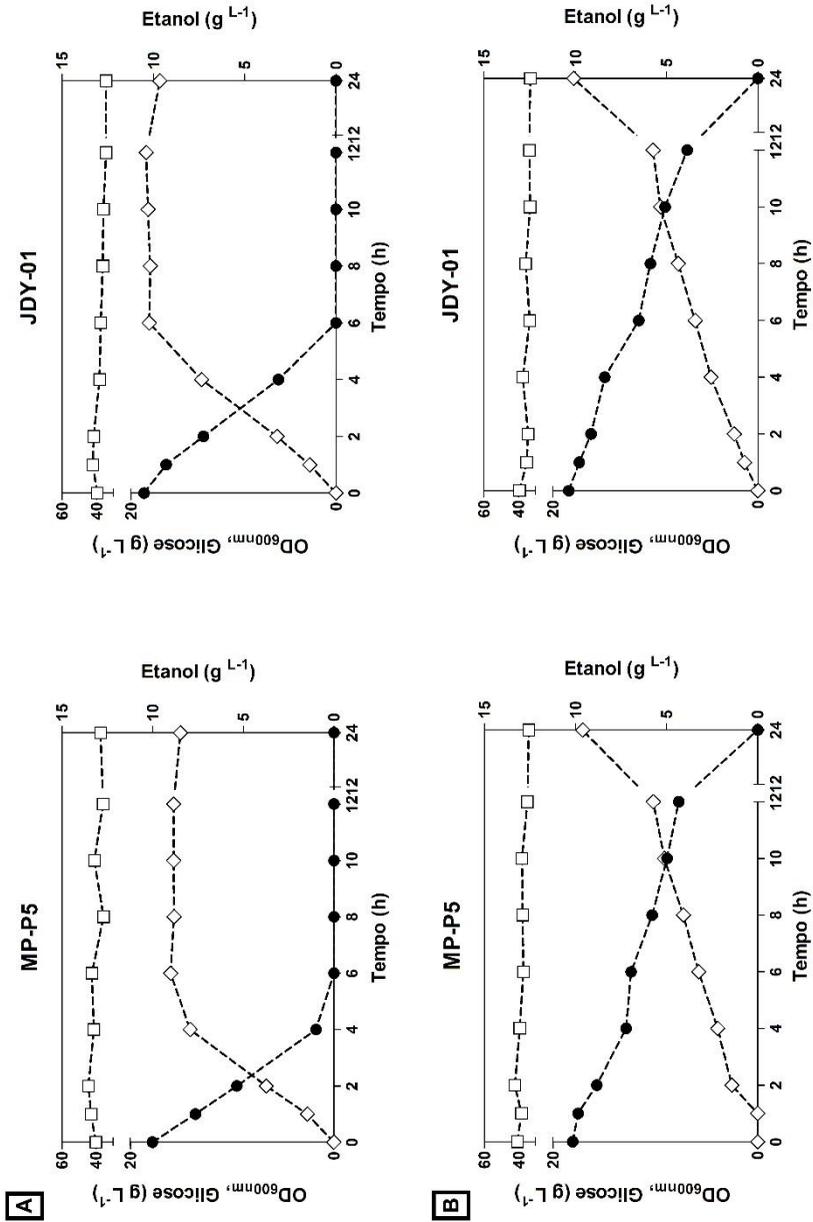


Figura 32 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose acrescida de (A) 30 mM ou (B) 60 mM de ácido acético. Concentração celular (quadrado), glicose (círculo) e etanol (diamante).

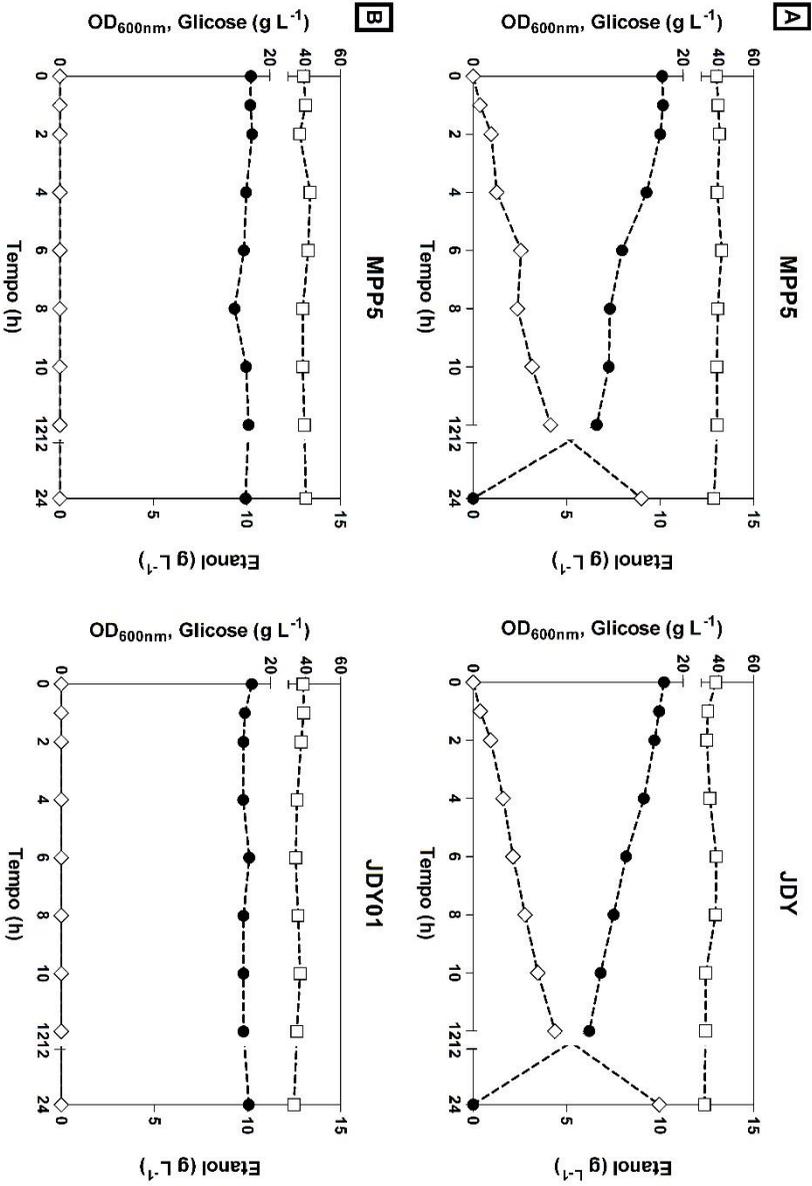


Figura 33 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose acrescida de (A) 6 mM ou (B) 10 mM de ácido fórmico. Concentração celular (quadrado), glicose (círculo) e etanol (diamante).

majoritariamente nas últimas 12 h de fermentação. Apesar disso ambas as linhagens produziram cerca de 9 g/L de etanol indicando que, mesmo com o consumo tardio da glicose, esta ainda foi convertida em etanol. Na presença de 10 mM de ácido fórmico a glicose presente no meio não foi consumida.

4.6.3 Co-fermentação de xilose e glicose em batelada simples

Como forma de investigar o comportamento das linhagens na presença de fontes mistas de carbono, foram realizados ensaio de co-fermentação na presença simultânea de xilose e glicose. Como a concentração de cada fonte de carbono foi ajustada para 20 g/L, o meio utilizado para as co-fermentações continha um total de 40 g/L de açúcar.

Na co-fermentação em meio sem inibidores, tanto a linhagem MP-P5 quanto a linhagem JDY-01 consumiram os açúcares glicose e xilose da mesma forma com que fizeram quando esses açúcares foram testados isoladamente (Figura 34). Mais importante, os dois açúcares foram consumidos simultaneamente. Esse padrão de consumo indica que a presença da glicose não inibiu a assimilação da xilose, uma característica altamente desejada para linhagens empregadas na indústria. As linhagens ainda mostraram uma produção de etanol contínua e superior àquela obtida quando cada açúcar foi fermentado individualmente. A maior produção de etanol (~13 g/L) indica que o álcool foi produzido a partir dos dois açúcares. Já a produção contínua indica que a xilose e a glicose foram convertidas à etanol ao mesmo tempo. Observou-se ainda a produção de ~4 g/L de xilitol e ~4 g/L de glicerol. O glicerol não havia sido detectado nas fermentações individuais de xilose ou glicose. A produção deste metabólito, além de ser conhecida por afetar o desempenho fermentativo de leveduras, está fortemente relacionada com o desbalanço redox intracelular. É através da produção deste subproduto que a célula regenera o cofator NAD⁺ utilizado pela enzima XDH. A alta produção de glicerol observada, portanto, é um indicativo de as linhagens sofreram um desbalanço redox intracelular também na presença dos dois açúcares. Da mesma forma que o glicerol, a alta produção de xilitol também é um indicativo do desbalanço redox (Figura 34).

Na co-fermentação realizada na presença de 30 mM de ácido acético, a linhagem JDY-01 mostrou ser superior à linhagem MP-P5 pela primeira vez. Como mostra a Figura 35, mesmo na presença do ácido acético, a sobre expressão do gene *TALI* aparentemente permitiu que a

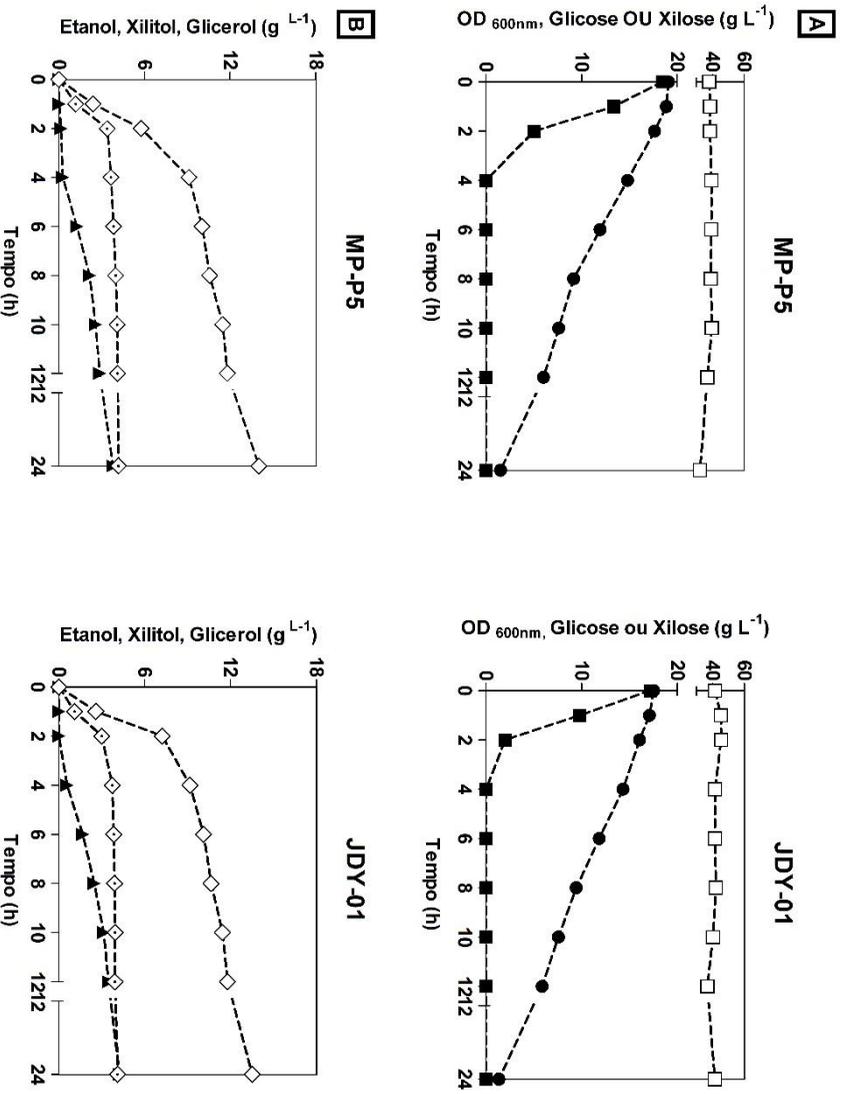


Figura 34 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose. Concentração celular (quadrado aberto), glicose (quadrado fechado), xilose (círculo), etanol (diamante), xilitol (triângulo) e glicerol (diamante pontuado).

linhagem JDY-01 co-consumisse a xilose ligeiramente melhor do que a linhagem MP-P5. Ainda, a linhagem JDY-01 consumiu 17,18% de xilose a mais do que a parental e depletou a glicose duas vezes mais rápido do que a linhagem MP-P5. A melhora apresentada pela linhagem JDY-01 no co-consumo de xilose, pode explicar porque o consumo da glicose pela linhagem JDY-01 não foi tão afetado quanto o da MP-P5.

Segundo Bellissimi e col. (2009), em condições microaeróbias, o déficit energético criado por mecanismos de detoxificação como as ATPases de membrana⁵ é suprido pelo consumo da fonte de carbono disponível. Uma vez que a xilose foi melhor co-consumida, pode-se inferir que a energia obtida através do consumo da xilose pode ter sido utilizada para ajudar a manter esses mecanismos de detoxificação. Uma vez que esses mecanismos foram mantidos, menores seriam os efeitos negativos do ácido acético, inclusive, sobre o consumo de glicose.

Ainda na presença de 30 mM de ácido acético, a melhora no consumo de açúcares pela linhagem JDY-01 foi acompanhada por uma melhor produção de etanol. Essa linhagem foi capaz de produzir o etanol mais rapidamente e em maior quantidade (~10 g/L) do que a linhagem MP-P5 (~9 g/L). A explicação para isso encontra-se no maior consumo de açúcar apresentado pela linhagem, mas também na possível indução que o ácido acético a uma baixa concentração teve sobre a produção de etanol. Isso porque, em condições limitadas de oxigênio, baixas concentrações de ácido acético estimulam a produção de ATP que é alcançada também através de uma maior produção de etanol (WARTH, 1998; PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2007; BELLISSIMI *et al.*, 2009; JÖNSSON, *et al.*, 2013; SWINNEN *et al.*, 2014).

Nas co-fermentações realizadas na presença de 60 Mm de ácido acético, a superioridade da linhagem recombinante não se manifestou (Figura 36). Ao invés disso, o ácido acético afetou o consumo de açúcar e a produção de etanol das duas cepas igualmente. Dentre os dois açúcares, o consumo da xilose foi o mais afetado e ao longo das 24 h de fermentação apenas 10% da xilose foi consumida. Enquanto isso, a glicose presente no meio foi depletada. A produção de etanol também diminuiu (~8 g/L), enquanto que a produção de glicerol se manteve em 2,5 g/L. Nas co-fermentações realizadas na presença de ácido fórmico, os perfis das linhagens se mantiveram iguais (Figura 37 e 38). Na presença de 6 mM de ácido fórmico o consumo de glicose e xilose ocorreu

⁵ As ATPases de membrana expulsam os prótons formados com a dissociação intracelular dos ácidos carboxílicos e, assim, evitam a acidificação do citosol.

simultaneamente, mas a xilose foi consumida lentamente. Em contrapartida, a glicose foi depletada do meio em 10 h (Figura 37). O incremento na produção de etanol após a depleção da glicose foi pequeno, sugerindo que a xilose consumida não foi convertida no álcool. Em compensação, a linhagem produziu mais glicerol (4 g/L) durante o consumo exclusivo da xilose, indicando, mais uma vez, a presença de um desbalanço redox. Na presença de 10 mM do inibidor, as linhagens não consumiram nenhum dos dois açúcares da mesma forma que o fizeram quando esses açúcares foram testados individualmente (Figura 38).

Em suma, a sobre expressão do gene *TAL1* permitiu que a linhagem JDY-01 co-consumisse melhor a xilose na presença de 30 mM de ácido acético, fazendo com que o seu perfil fermentativo fosse melhor do que o da linhagem parental. Todavia, em todas as outras condições testadas a sobre expressão do gene não melhorou o perfil fermentativo da linhagem recombinante. Mais importante, a presença dos metabólitos xilitol e glicerol indicam que as linhagens estavam sujeitas a um desbalanço redox e que isto pode ter influenciado nos resultados apresentados pela linhagem JDY-01.

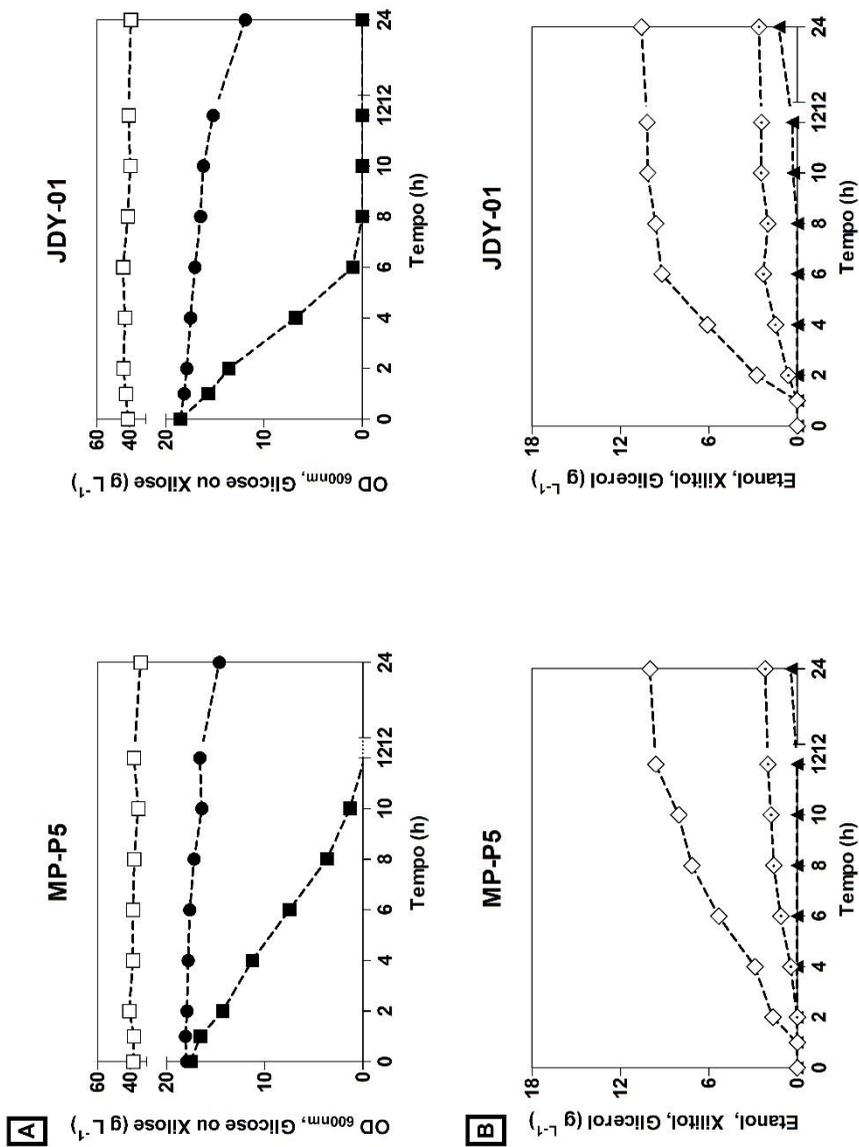


Figura 35 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose acrescido de 30 mM de ácido acético. Concentração celular (quadrado aberto), glicose (quadrado fechado), xilose (círculo), etanol (círculo), xilitol (triângulo) e glicerol (diamante pontuado).

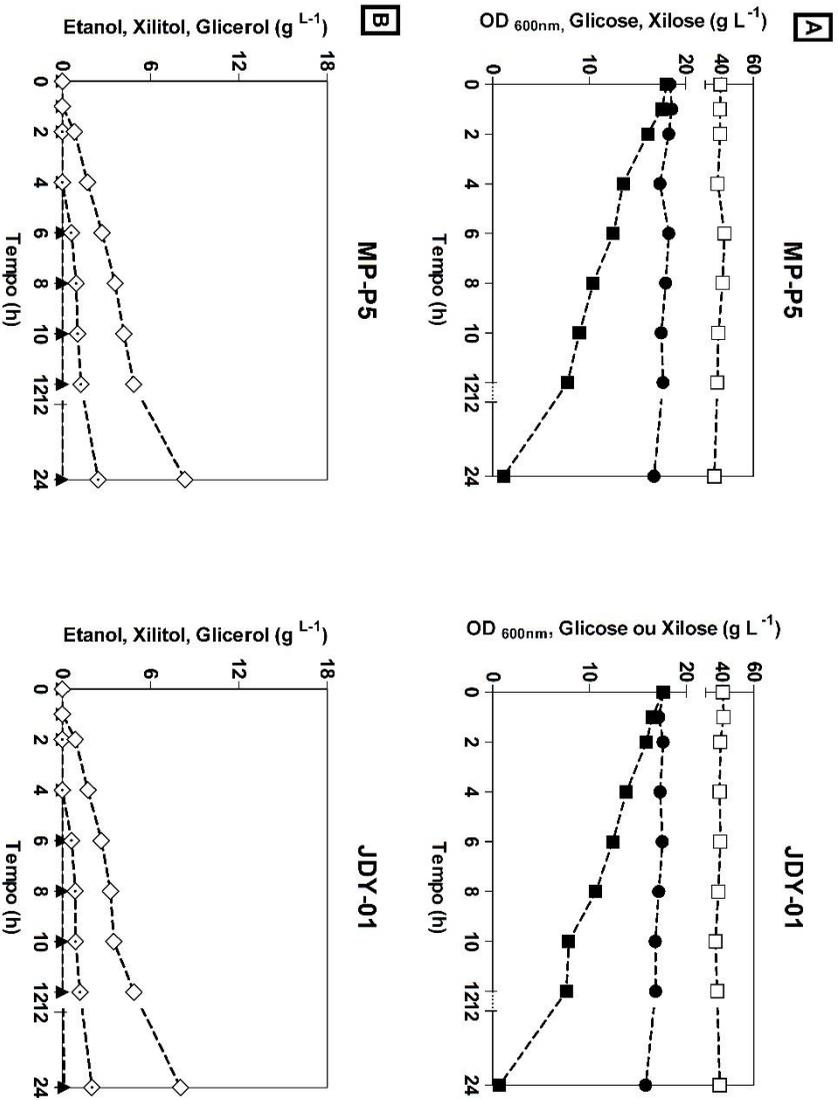


Figura 36 - Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose acrescido de 60 mM de ácido acético. Concentração celular (quadrado aberto), glicose (quadrado fechado), xilose (círculo), etanol (diamante), xilitol (triângulo) e glicerol (diamante pontuado).

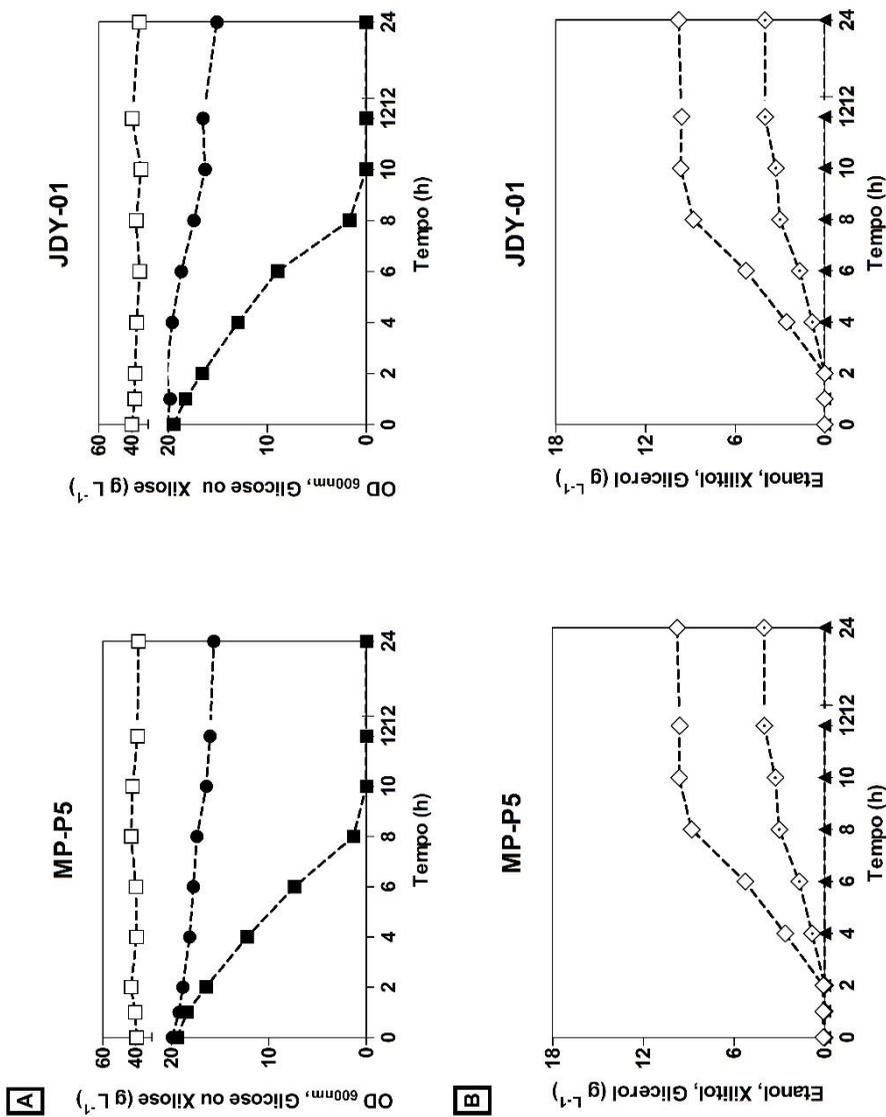


Figura 37- Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose acrescido de 6 mM de ácido fórmico. Concentração celular (quadrado aberto), glicose (quadrado fechado), xilose (círculo), etanol (triângulo), xilitol (diamante) e glicerol (diamante pontuado).

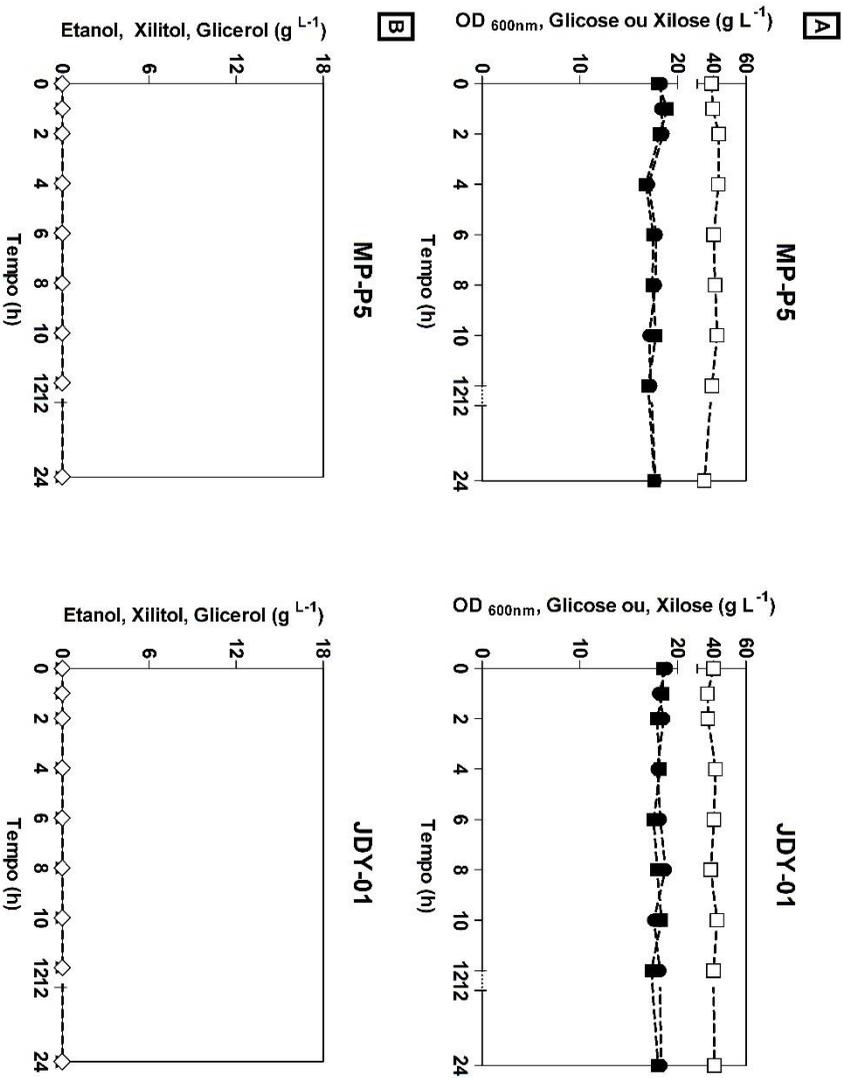


Figura 38- Perfil fermentativo das linhagens MP-P5 e JDY-01 em meio mínimo contendo 20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose acrescido de 10 mM de ácido fórmico. Concentração celular (quadrado aberto), glicose (quadrado fechado), xilose (círculo), etanol (diamante), xilitol (triângulo) e glicerol (diamante

5 CONCLUSÕES

S. passalidarum UFMG-HMD 2.1:

- Apesar de ser uma excelente fermentadora de xilose tanto em condições aeróbias quanto microaeróbias, a utilização da levedura na produção de etanol 2G é limitada pela sua alta sensibilidade aos ácidos carboxílicos fracos e pela repressão que o seu consumo de xilose sofre na presença de glicose;

S. cerevisiae MP-P5:

- Apesar de ser uma excelente fermentadora de xilose quando em altas concentrações celulares e em condições microaeróbias, a linhagem também é inibida pela presença de concentrações tão baixas quanto 30 mM de ácido acético ou 6 mM de ácido fórmico, e dificilmente seria utilizada na produção de etanol 2G;

S. cerevisiae JDY-01:

- Em condições aeróbias, a linhagem cresceu melhor e consumiu mais xilose do que a sua linhagem parental, tanto na ausência quanto na presença de até 60 mM de ácido acético, revelando que a sobre expressão do gene *TALI* é uma alternativa para melhorar o crescimento e o consumo de xilose de linhagens *S. cerevisiae*, mesmo na presença do inibidor;
- Em condições microaeróbias e na presença de 30 mM de ácido acético, a co-fermentação de xilose e glicose pela linhagem foi menos afetada, revelando que a sobre expressão do gene *TALI* é uma alternativa para melhorar, principalmente, o consumo da xilose nestas condições;
- Outras etapas da via de metabolização da xilose como as que envolvem as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, aparentemente, constituem uma etapa mais importante para a metabolização da xilose à etanol do que a sobre expressão do gene *TALI*;

6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. M., MODIG, T., PETERSSON, A., HÄHN-HÄGERDAL, B., LIDÉN, G., GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 340-349, 2007

ALMEIDA, J. R. M.; RUNQUIST, D.; NOGUÉ, V. S.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Journal**, v. 6, p. 286- 299, 2011

BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL. Disponível em: https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2016.pdf. Acesso: 31 de janeiro de 2017

BELLISSIMI, E.; DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T.; Van MARIS, A. J. A. Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 358-364, 2009

BENJAMIN, Y.; GARCÍA-APARICIO, M. P.; GÖRGENS, J. F. Impact of cultivar selection and process optimization on ethanol yield from different varieties of sugarcane. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, p. 60, 2014

CADETE, R. M.; SANTOS, R. O; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONCALVES, D. L.; STAMBUK, B. U.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a Dxylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1338–1342, 2009

CADETE, R. M; MELO, M. A.; DUSSA, K. J.; RODRIGUES, R. C. L. B.; SILVA, S. S.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. Diversity and physiological characterization of d-xylose fermenting yeast isolated from the brazilian amazonian forest. **Plos One**, v. 7, e43135, 2012

CADETE, R. M.; HERAS, A. M.; SANDSTRÖM, A. G.; FERREIRA, C.; GÍRIO, F.; GORWA-GRAUSLUND, M.; ROSA, C.; FONSECA, C. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 167, 2016

CARDONA, C.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 10, p. 4754, 4766, 2010

COSTA, A. C. B. Estudo da fermentação de hidrolisado lignocelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela linhagem *Spathaspora passalidarum* UFMG-HMD 14.1. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2016

COSTA, T. H. F. Avaliação da recalcitrância de diferentes regiões oriundas de entrenós de cana-de-açúcar em híbridos com teores variados de lignina. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2012

DE BARROS, R. R. O.; PAREDES, B. S.; ENDO, T.; BON, E. P. S.; LEE, S. Association of wet disk milling and ozonolysis as pretreatment for enzymatic saccharification of sugarcane bagasse and straw. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 288-294, 2013

DIAS, M. O. S., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., ROCHA, G. J. M., PRADELLA, J. G. C., ROSSELL, C. E. V., FILHO, R. M., BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8964-8971, 2011

DIAS, M. O. S., JUNQUEIRA, T. L., CVALETT, O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., ROSSELL, C. E. V., FILHO, R. M., BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 152-161, 2012

FUJOMITO, K., SANDA, T., HASUNUMA, T., KONDO, A. Deletion of the PHO13 gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and

formic acids and furfural. **Bioresource Technology**, v. 11, p. 161-166, 2012

GENOME MANAGEMENT INFORMATIO SYSTEM. Disponível em: <http://akrcorp.kr/en/cellulosic-technology/cellulosic-technology-overview/>. Acesso: 31 jan. 2017

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C., CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LIKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010

GOLDEMBERG, J. The brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, p. 1-7, 2008

GOLDEMBERG, J. & GUARDABASSI, P. The potential for first-generation ethanol production from sugarcane. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, p. 17-24, 2010

GONÇALVES, D. L. Influência dos transportadores de açúcares na fermentação de xilose por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2014

HÄHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 937-953, 2007

HASUNUMA, T., SANDA, T., YAMADA, R., YOSHIMURA, K., ISHII, J., KONDO, A. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 1-13, 2011

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeast. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 300-372, 2002

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

IVERSEN, J. A.; AHRING, B. K. Comparison between the pentose fermenting yeasts *Scheffersomyces stipitis* and *Spathaspora passalidarum* grown in hydrolysates of tropical biomasses. In: Optimization of lignocellulosic bioethanol production using pentose fermenting yeasts and raman spectroscopy. **Copenhagen: Aalborg University Press**, 2014, p. 96-114

JEFFRIES, T. W.; WILLIS, L. B.; LONG, T. M.; MADISON, Y. S. Co-fermentation of glucose, xylose and/or cellobiose by yeast. US Pat. 8,530,211B2 10 sep. 2013

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

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 223-253, 2010

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-10, 2011

LI, Y.; GOU, Z.; LIU, Z. Synergistic effects of *TAL1* over-expression and PHO13 deletion on the weak inhibition of xylose fermentation by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 2011-2021, 2014

LINCK, A.; VU, X.; ESSL, C.; HIESL, C.; BOLES, E.; OREB, M. On the role of GAPDH isoenzymes during pentose fermentation in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, p. 389-398, 2014

LU, C.; JEFFRIES, T. Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6072-6077. 2007

LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F.; ALMEIDA, A.; SILVA, M. T.; BARRIENTOS, A.; CORTE-REAL, M. Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic

acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 2598-2606, 2002

MARTÍN, C., KLINKE, H. B., THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 426-432, 2007

MATSUSHIKA, A., INOUE, H., KODAKI, T., SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 37-53, 2009

MATSUSHIKA, A., GOSHIMA, T., FUJII, T., INOUE, H., SAWAYAMA, S., YANO, S. Characterization of non-oxidative transaldolase and transketolase enzymes in the pentose phosphate pathway with regard to xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 16-25, 2012

MIRA, N. P.; TEIXEIRA, M. C., CORREIA, I. S. Adaptative response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. **Omics a journal of Integrative Biology**, v. 14, p. 525-540, 2010

MOURO, A. Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2012

NANCY, W. Y. H.; CHEN, Z.; BRAINA, P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 1852-1859, 1998

NI, H.; LAPLAZA, J. M.; JEFFRIES, T. W. Transposon mutagenesis to improve the growth of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on D-xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2061-2066, 2007

NGUYEN, N. H.; SUH, S.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora*

passalidarum gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. Nov. **Mycological Research**, v. 110, p. 1232-1241, 2006

NOVA CANA. Disponível em:
<https://www.novacana.com/etanol/fabricacao/>. Acesso em: 31 janeiro de 2017

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

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 184, p. 69-72, 2000

PEREIRA-Jr, N., COUTO, M. A. P. G., ANNA, L. M. M. S. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. Rio de Janeiro: **Escola de Química/UFRJ**, 2008

PEREIRA, S. C., MAEHARA, L., MACHADO, C. M. M., FARINAS, C. S. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 1-16, 2015

QUINTERO, J. A.; MONCADA, J.; CARDONA, C. A. Techno-economic analysis of bioethanol production from lignocellulosic residues in Colombia: A process simulation approach. **Biosource Technology**, v. 139, p. 300-307, 2013

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, Industry Statistics. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>>. Acesso em: 31 de janeiro de 2017

ROSILLO-CALLE, F.; CORTEZ, L. A. B. Towards proalcohol II —a review of the Brazilian bioethanol programme. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, p. 115-124, 1998

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**, v. 22, p. 327-330, 2000

SÁNCHEZ, O. J. & CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource technology**, v. 99, p. 5270-95, 2008

SANDA, T., HASUNUMA, T., MATSUDA, F., KONDO, A. Repeated-batch fermentatin of lignocellulosi hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7917-7924, 2011

SENAC, T.; HAHN-HAGERDAL, B. Intermediary metabolite concentrations in xylulose and glucose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 120-126, 1990

SOCCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. S., COSTA, B., WOICIECHOWSKI, A. L., CARVALHO, J. C., MEDEIROS, A. B. P., FRANCISCO, A. M., BONOMI, L. J. Brazilian biofuel program: an overview. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, p. 897-904, 2005

SUN, Y. & CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002

SWINNEN, S.; FERNANDEZ-NINÓ, M.; GONZALEZ-RAMOS, D.; Van MARIS, A. J. A.; NEVOIGT, E. The fraction of cells that resume growth after acetic acid addition is a strain-dependent parameter of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, p. 642-653, 2014

TOIVARI, M. H.; ARISTIDOU, A.; RUOHONEN, L.; PENTTILA, M. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: importance of xylulokinase (xks1) and oxygen availability. **Metabolic Engineering**, v. 3, p. 236-249, 2001

Van MARIS, A. J. A.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; van den BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A. H.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; van DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by

Scaccharomyces cerevisiae: Current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 90, p. 391-418, 2006

WALFRIDSSON, M.; HALLBORN, J.; PENTTILA, M.; NEN, S. K.; HAHN-HAGERDAL, B. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4184-4190, 1995

WARTH, A. D. Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2091-209, 1988