



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Engenharia genética de *Komagataella phaffii* para aumento da tolerância a inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico

Mariana Nogueira de Moura Freitas

Brasília

2023

MARIANA NOGUEIRA DE MOURA FREITAS

Engenharia genética de *Komagataella phaffii* para aumento da tolerância a inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília para a obtenção do título de mestre em Biologia Microbiana.

Orientador: Prof. Dr. João Ricardo Moreira de Almeida

Brasília

2023

Resumo

A biomassa lignocelulósica representa uma matéria-prima renovável de grande potencial para a produção de energia e compostos químicos industriais, a partir de sua utilização por microrganismos. Entre os desafios do uso da biomassa em bioprocessos, está a presença de compostos inibitórios ao metabolismo microbiano, produzidos durante as etapas de pré-tratamento da fração lignocelulósica. Os inibidores estão agrupados em ácidos orgânicos (ácidos acético, fórmico e levulínico), furaldeídos (2-furaldeído (furfural) e 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF)) e compostos fenólicos. A levedura *Komagataella phaffii*, cada vez mais empregada na produção de proteínas heterólogas e compostos químicos a partir de biomassa, foi escolhida neste trabalho para superexpressar genes potencialmente envolvidos no aumento da resposta de tolerância aos principais inibidores do hidrolisado lignocelulósico de bagaço de cana de açúcar. Duas linhagens recombinantes, X33-pKLD-YJR096W e X33-pKLD-YNL134C, além da levedura controle, foram construídas e cultivadas na presença de HMF. Em meio suplementado com HMF 2 g. L⁻¹, as linhagens superexpressando os genes YJR096W e YNL134C foram capazes de deixar a fase *lag* de crescimento 17 horas antes da levedura controle, além de apresentaram um maior consumo de glicose nas primeiras 48 horas de cultivo (33,9 e 44,04 g. L⁻¹, respectivamente), quando comparado ao controle (24,59 g. L⁻¹), assim como maior conversão de HMF em compostos menos tóxicos, como furano 2,5- dimetanol, nas primeiras 7 horas (1,29 e 1,87 g. L⁻¹, respectivamente), em comparação à levedura controle (1,01 g. L⁻¹). Em concentrações mais elevadas de HMF (3,5 g. L⁻¹), as linhagens X33-pKLD-YJR096W e X33-pKLD-YNL134C foram capazes de deixar a fase *lag* 12 horas antes da levedura controle, além de terem sido capazes de consumir mais glicose (23,68 e 29,34 g. L⁻¹, respectivamente), nas primeiras 48 horas, quando comparadas ao controle (21,55 g. L⁻¹) e terem convertido mais HMF (3,18 e 3,45 g. L⁻¹, respectivamente) em comparação à levedura controle (2,78 g. L⁻¹, respectivamente). Os resultados, portanto, revelaram que a superexpressão dos genes YJR096W e YNL134C conferiu à *K. phaffii* um fenótipo de tolerância à presença do HMF, presente no hidrolisado lignocelulósico, refletido nas maiores taxas de crescimento celular, consumo de glicose e conversão de HMF em espécies químicas menos tóxicas ao metabolismo celular.

Palavras chave: biomassa lignocelulósica, inibidores, furfural, HMF, hidrolisado lignocelulósico, *Komagataella phaffii*, tolerância.

Abstract

Lignocellulosic biomass represents a renewable raw material with great potential for the production of energy and industrial chemical compounds, based on its use by microorganisms. Among the challenges of using biomass in bioprocesses is the presence of compounds that inhibit microbial metabolism, produced during the pre-treatment stages of the lignocellulosic fraction. The inhibitors are grouped into organic acids (acetic, formic and levulinic acids), furaldehydes (2-furaldehyde (furfural) and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF)) and phenolic compounds. The yeast *Komagataella phaffii*, which is increasingly being used to produce heterologous proteins and chemical compounds from biomass, was chosen in this study to overexpress genes potentially involved in increasing the tolerance response to the main inhibitors in sugar cane bagasse lignocellulosic hydrolysate. Two recombinant strains, X33-pKLD-YJR096W and X33-pKLD-YNL134C, as well as the control yeast, were constructed and grown in the presence of HMF. In medium supplemented with HMF 2 g. L⁻¹, the strains overexpressing the YJR096W and YNL134C genes were able to leave the growth lag phase 17 hours earlier than the control yeast, as well as showing higher glucose consumption in the first 48 hours of cultivation (33.9 and 44.04 g. L⁻¹, respectively), when compared to the control (24.59 g. L⁻¹), as well as greater conversion of HMF into less toxic compounds, such as furan 2,5- dimethanol, in the first 7 hours (1.29 and 1.87 g. L⁻¹, respectively), compared to the control yeast (1.01 g. L⁻¹). At higher concentrations of HMF (3.5 g. L⁻¹), strains X33-pKLD-YJR096W and X33-pKLD-YNL134C were able to leave the lag phase 12 hours earlier than the control yeast, and were also able to consume more glucose (23.68 and 29.34 g. L⁻¹, respectively) in the first 48 hours compared to the control (21.55 g. L⁻¹) and were able to convert more HMF (3.18 and 3.45 g. L⁻¹, respectively) compared to the control yeast (2.78 g. L⁻¹, respectively). The results therefore revealed that overexpression of the YJR096W and YNL134C genes gave *K. phaffii* a phenotype of tolerance to the presence of HMF, present in lignocellulosic hydrolysate, reflected in higher rates of cell growth, glucose consumption and conversion of HMF into chemical species that are less toxic to cell metabolism.

Key words: lignocellulosic biomass, inhibitors, furfural, HMF, lignocellulosic hydrolysate, *Komagataella phaffii*, tolerance.

Lista de Abreviações

°C: Graus Celsius

ADH: Álcool desidrogenase

AKR: Aldo-ceto redutase

ALDH: Aldeído desidrogenase

AOX: Álcool oxidase

ATP: Adenosina trifosfato

AX: Ácido xilônico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FDM: Furano 2,5-dimetanol

FM: Furano 2-metanol

GDE: Genes diferencialmente expressos

HMF: 5-hidroximetil-2-furaldeído

LB: Luria-Bertani

MD: *Minimal Dextose*

NAD⁺/NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP⁺/NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

OD_{600nm}: Densidade óptica a 600nm

p/v: peso/volume

pb: Pares de bases

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PDH: Piruvato desidrogenase

PGK: 3-fosfoglicerato quinase

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SB: Ácido bórico e sódio

TE: Tris EDTA

v/v: Volume/volume

YNB: *Yeast Nitrogen Base*

YPD: *Yeast-Peptone-Dextrose*

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição de frações lignocelulósicas de diferentes fontes de biomassas..	15
Tabela 2: Concentração de inibidores presentes no hidrolisado após o pré-tratamento de diferentes biomassas..	18
Tabela 3: Estudos de engenharia genética e evolução adaptativa de microrganismos para aumento de tolerância aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico.	20
Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para reações de PCR..	37
Tabela 5: Tamanho dos genes e temperatura de anelamento utilizado na PCR.	44
Tabela 6: Reagentes e suas concentrações utilizadas nas reações de PCR.	44
Tabela 7: Taxa específica de crescimento celular, consumo de glicose em 48 horas e conversão de HMF em 7 horas de cultivo.	68
Tabela 8: Taxa específica de crescimento celular, consumo de glicose em 48 horas e conversão de HMF em 36 horas de cultivo	70

Lista de Figuras

Figura 1: Organização da fibra lignocelulósica e composição de cada fração constituinte ¹	14
Figura 2: Origem da biomassa e suas frações lignocelulósicas e os principais compostos liberados após as etapas de pré-tratamento, hidrólise e despolimerização ¹	17
Figura 3: Representação esquemática da redução de furfural e HMF e suas respectivas reduções nos álcoois FM e FDM.....	21
Figura 4: Representação esquemática da formação dos ácidos fórmico e levulínico a partir da hidrólise dos furaldeídos..	22
Figura 5: Exemplos de compostos fenólicos.	24
Figura 6: Visão esquemática dos mecanismos de inibição celular pelos inibidores do hidrolisado lignocelulósico.....	26
Figura 7: Expressão diferencial gênica na presença de ácido acético, furaldeídos e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar.....	31
Figura 8: Representação esquemática da estratégia de validação de genes potencialmente envolvidos no aumento de tolerância de <i>K. phaffii</i> aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico.....	34
Figura 9: Vetor pGEM®-T Easy (Promega).	35
Figura 10: Vetor pKLD-XD.	36
Figura 11: Análise eletroforética, em gel de agarose 0,8%, da PCR dos genes YJR096W, YDL124W, SAP30, FLR1, 2661 e YDL134C.....	54
Figura 12: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% dos genes clonados no vetor pGEM®-T Easy.....	56
Figura 13: Representação esquemática da estratégia de clonagem dos genes YJR096W e FLR1 no vetor de expressão pKLD-XD.....	57
Figura 14: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% da linearização do vetor pKLD-XD e digestão do pGEM®-T Easy clonado com os genes YJR096W e FLR1, com a enzima SpeI.....	58
Figura 15: Representação resumida do vetor pKLD-XD-YJR096W.....	59
Figura 16: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% que confirma a presença dos fragmentos de DNA nos tamanhos esperados após digestão do vetor pKLD-XD-YJR096W com as enzimas BamHI/SalI e SpeI.....	60

- Figura 17: Análise eletroforética em gel de agarose 0.8% da digestão do vetor pKLD-XD-YJR096W por NotI 61
- Figura 18: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% confirmando a presença de fragmentos de DNA nos tamanhos esperados para os genes YJR096W (1080 pb) e YNL134C (1389 pb), amplificado a partir do genoma das *K. phaffii* recombinantes.... 62
- Figura 19: Perfil de crescimento de *K. phaffii* X33 controle (rosa), X33 pKLD-YJR096W (azul) e pKLD-YNL134C (verde) cultivadas em microplaca de 48 poços em (A): meio MD-glicose 45 g. L⁻¹; (B) meio MD-glicose + hidrolisado de bagaço de cana de açúcar 30%; (C): MD-glicose + furfural 3 g.L⁻¹ e (D): MD-glicose + HMF 2 g.L⁻¹. 65
- Figura 20: Perfil de crescimento de *K. phaffii* X33 controle (rosa), X33 pKLD-YJR096W (azul) e X33 pKLD-YNL134C (verde) cultivadas em frasco Erlenmeyer em (A): meio MD-glicose 45 g. L⁻¹; (B): MD-glicose + HMF 2 g. L⁻¹; (C): Consumo de glicose no meio MD-glicose; (D): Consumo de glicose no meio MD-glicose + HMF 2 g. L⁻¹; (E) Conversão de HMF 2 g. L⁻¹. 67
- Figura 21: Perfil de crescimento de *K. phaffii* X33 controle (rosa), X33 pKLD-YJR096W (azul) e X33 pKLD-YNL134C (verde) cultivadas em frasco Erlenmeyer em (A): meio MD-glicose 45 g. L⁻¹; (B): MD-glicose + HMF 3,5 g. L⁻¹; (C): Consumo de glicose em meio MD-glicose; (D): Consumo de glicose em MD-glicose + HMF 3.5 g. L⁻¹; (E) Conversão de HMF 3,5 g. L⁻¹. 71
- Figura 22: Determinação de atividade enzimática de redução de HMF em extratos celulares brutos das leveduras controle (rosa), X33-pKLD-YJR096W (azul) e X33-pKLD-YNL134C (verde), na presença dos cofatores NADH (A) e NADPH (B). 73

Sumário

1. Introdução.....	13
1.1. Biomassa lignocelulósica e suas aplicações	13
1.2. Pré-tratamento e hidrólise da biomassa lignocelulósica	16
1.3. Inibidores lignocelulósicos	16
1.3.1. Furaldeídos	18
1.3.2. Ácidos orgânicos	21
1.3.3. Compostos fenólicos	23
1.4. <i>Komagataella phaffii</i>	27
1.5. Identificação de genes que aumentam a tolerância de <i>K. phaffii</i> aos inibidores lignocelulósicos	29
2. Objetivos	32
2.1. Objetivo Geral.....	32
2.1.1. Objetivo específicos:	32
3. Estratégia.....	33
4. Materiais e Métodos	35
4.1. Materiais	35
4.1.1. Linhagens	35
4.1.2. Plasmídeos.....	35
4.1.3. Oligonucleotídeos.....	36
4.1.4. Meios de cultura	38
4.1.5. Soluções e tampões.....	39
4.2. Métodos	42
4.2.1. Escolha dos genes para superexpressão em <i>K. phaffii</i>	42
4.2.2. Vetor de expressão.....	42
4.2.3. Extração de DNA genômico de levedura	42
4.2.4. Amplificação por PCR dos genes de interesse	43

4.2.5.	Purificação de fragmentos de DNA.....	45
4.2.6.	Construção do vetor de clonagem	45
4.2.7.	Construção do vetor de expressão	45
4.2.8.	Digestão de DNA com enzimas de restrição	45
4.2.9.	Ligação de fragmentos de DNA	46
4.2.10.	Transformação bacteriana por eletroporação	46
4.2.11.	Extração de DNA plasmidial.....	46
4.2.12.	Transformação de <i>K. phaffii</i> por eletroporação	46
4.2.13.	Análise eletroforética de amostras de DNA	47
4.2.14.	Cultivo de <i>E. coli</i>	47
4.2.15.	Preparo de células bacterianas eletrocompetentes.....	48
4.2.16.	Diálise do sistema de ligação de fragmentos de DNA	48
4.2.17.	Purificação de DNA plasmidial por precipitação	48
4.2.18.	PCR de colônia de <i>K. phaffii</i>	49
4.2.19.	Cultivo de <i>K. phaffii</i> em microplaca.....	49
4.2.20.	Cultivo de <i>K. phaffii</i> em frasco Erlenmeyer.....	50
4.2.21.	Quantificação de proteínas totais.....	50
4.2.22.	Determinação de atividade enzimática	51
4.2.23.	Análise e quantificação de metabólitos por HPLC.....	51
5.	Resultados e discussão	53
5.1.	Seleção de genes candidatos	53
5.2.	Amplificação dos genes candidatos por PCR	54
5.3.	Clonagem dos genes de interesse no vetor de expressão pKLD.....	54
5.4.	Transformação de <i>K. phaffii</i>	62
5.5.	Efeito da superexpressão dos genes YJR096W e YNL134C em <i>K. phaffii</i>	63
5.6.	Perfil de crescimento e conversão de HMF pelas linhagens de <i>K. phaffii</i> X33 pKLD-YJR096W e pKLD-YNL134C.....	66

5.7. Ensaio de redutase em <i>K. phaffii</i> superexpressando os genes YJR096W e YNL134C.....	72
6. Conclusões	74
7. Perspectivas.....	74
8. Referências bibliográficas	75

1. Introdução

1.1. Biomassa lignocelulósica e suas aplicações

As sucessivas crises energéticas, as questões ambientais e o rápido progresso econômico têm demonstrado a urgência da necessidade de modificação da matriz energética mundial, ainda fortemente dependente dos combustíveis fósseis. Na tentativa de reduzir os impactos das emissões de gases do efeito estufa e do aquecimento global, a procura e investimentos em fontes alternativas, renováveis e mais amigáveis ao meio ambiente para a produção de energia e compostos químicos tornou-se uma exigência por parte da sociedade do século XXI (Igbokwe et al., 2022).

Neste cenário, os resíduos agroindustriais destacam-se como uma das principais fontes alternativas para a produção de energia e compostos químicos renováveis. Segundo o Balanço Energético Nacional da Empresa de Pesquisa Energética (EPE), na repartição da oferta interna de energia de 2022 no Brasil, dos 47,4% ocupados pelo uso de fontes energéticas renováveis, 15,4% advieram apenas da biomassa de cana de açúcar (BEN – Relatório Síntese 2023), demonstrando o enorme potencial da biomassa lignocelulósica.

O termo biomassa pode ser compreendido como a matéria orgânica renovável de organismos vivos (da Silva et al., 2018). A biomassa vegetal é a matéria prima advinda, majoritariamente, de resíduos florestais, urbanos/domésticos e agrícolas e utilizada como fonte energética renovável, já que as ligações químicas contidas nas moléculas orgânicas, associadas aos átomos de carbono e hidrogênio, contêm energia e representam a fonte de reserva carbonífera mais abundante da Terra (Baruah et al., 2018).

Os principais constituintes da biomassa lignocelulósica são os polímeros de celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1). Além de essenciais para a sustentação e rigidez necessárias à vida vegetal, são componentes importantes para a produção de compostos químicos e energia renovável, por meio de bioprocessos industriais (Buchholz and Seibel, 2008).

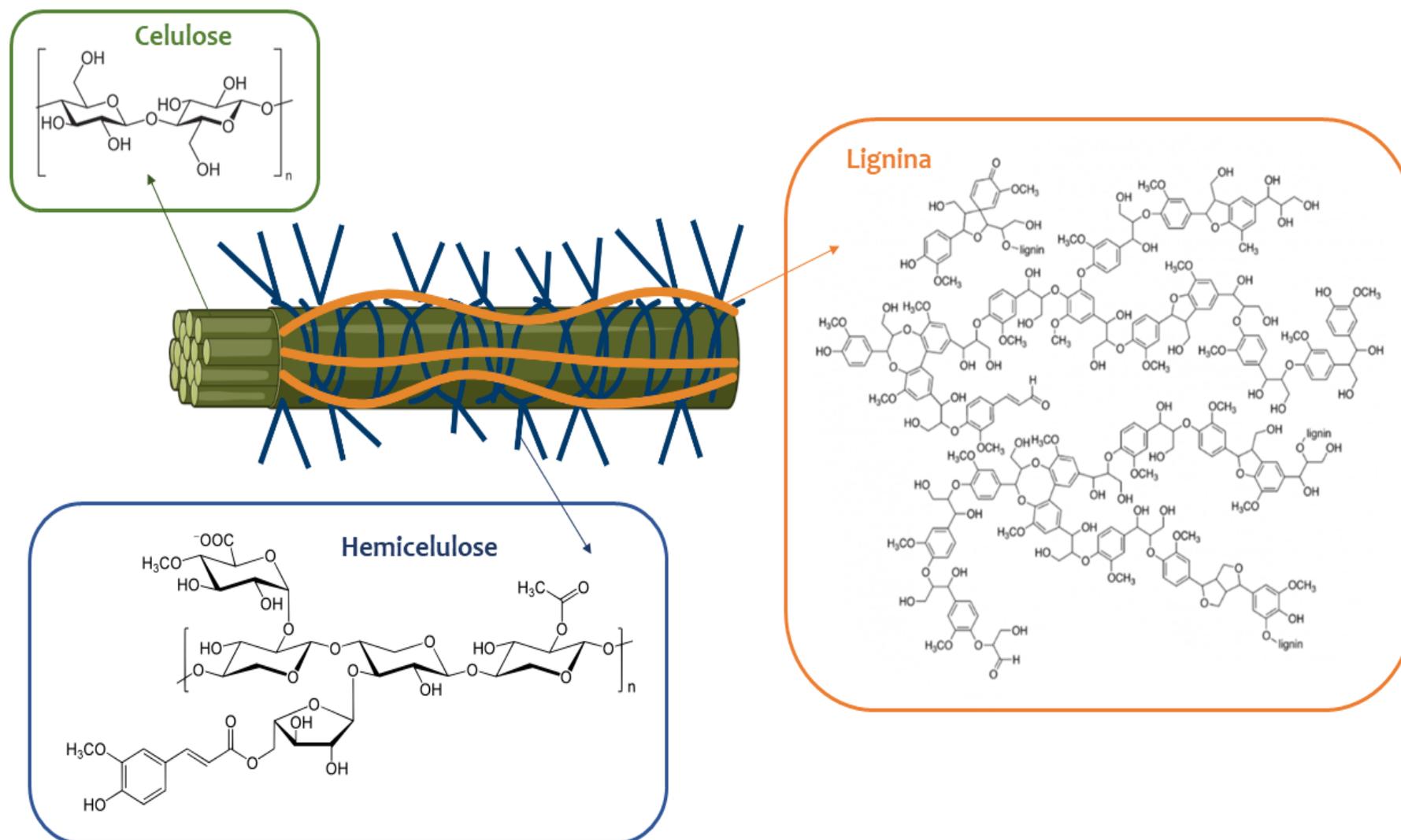


Figura 1: Organização da fibra lignocelulósica e composição de cada fração constituinte ¹.

¹: Ícones ilustrativos retirados do BioRender.

A celulose é um polissacarídeo linear homogêneo, composto por unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas do tipo β -1,4, sendo o principal componente da biomassa lignocelulósica (40 – 60%) e a fonte de carbono renovável mais abundante na natureza (Nwamba et al., 2021). A hemicelulose é o segundo polímero mais encontrado na estrutura da parede celular vegetal (10 – 35%), recobrando as fibras de celulose. Apresenta-se como um polímero heterogêneo composto por cadeias ramificadas contendo os açúcares glicose, galactose, manose, xilose e arabinose, e também ácidos urônicos (ácidos D-glicurônico e D-galacturônico) (Karimi and Taherzadeh, 2016). Por fim, a lignina é um polímero heterogêneo amorfo, resultado da interação de diferentes compostos fenólicos e pode compreender até 30% da biomassa (Ralph et al., 2019). A proporção de cada um desses componentes varia de acordo com a fonte e estrutura da biomassa lignocelulósica (Tabela 1).

Tabela 1: Composição de frações lignocelulósicas de diferentes fontes de biomassas. Adaptado de (Kim, 2018).

Biomassa	Fração lignocelulósica (% base seca)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Bagaço de cana de açúcar	43,1	31,1	11,4
Palha de milho	37,0	22,7	18,6
Palha de trigo	30,2	21,0	17,0
Bordo (<i>maple</i>)	41,0	15,0	29,1
Poda de oliveira	25,0	11,1	16,2

1.2. Pré-tratamento e hidrólise da biomassa lignocelulósica

Devido à complexação desses polímeros na parede celular, ela apresenta uma considerável resistência à ação hidrolítica e oxidativa dos catalisadores biológicos, dificultando a disponibilização dos açúcares fermentescíveis para os microrganismos. Por isso, a biomassa deve ser submetida a processos de pré-tratamento, que podem ser: físicos (térmico; micro-ondas), químicos (p. ex. ácidos, bases, oxidação úmida), mecânicos (moagem, extrusão e dispersão), biológicos (enzimas e microrganismos) e combinados (p.ex. termoquímico e explosão a vapor) (Baruah et al., 2018). Após essa etapa, as frações lignocelulósicas tornam-se disponíveis à hidrólise enzimática e despolimerização da lignina, resultando na liberação de hexoses, pentoses, compostos fenólicos e uma série de outros compostos presentes no hidrolisado lignocelulósico. Entretanto, além de proporcionar o acesso aos açúcares fermentescíveis, as etapas de pré-tratamento também são as responsáveis pela liberação de compostos tóxicos ao metabolismo dos microrganismos que consumirão os açúcares, sendo esse um dos gargalos dos bioprocessos que utilizam modelos microbianos na produção industrial (Bhutto et al., 2017; Igbokwe et al., 2022).

1.3. Inibidores lignocelulósicos

Os processos de pré-tratamento e hidrólise para desconstrução da biomassa lignocelulósica objetivam facilitar a liberação dos monômeros de açúcares fermentescíveis através da diminuição da recalcitrância da lignocelulose (Figura 2). Entretanto, tais processos também acabam levando à formação e liberação de compostos que inibem o metabolismo microbiano. Esses inibidores podem ser classificados em três grupos principais: furaldeídos (p. ex. 2-furaldeído (furfural) e 5-hidroxi-2-furaldeído (HMF)), ácidos fracos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico) e compostos fenólicos (p. ex. vanilina, siringaldeído, coniferil aldeído, ácido ferúlico e outros) (Larsson et al., 2000; Almeida et al., 2007; Brandt et al., 2019) (Figura 2). Os processos de pré-tratamento e hidrólise, assim como as fontes de biomassa, influenciam a liberação, formação e as concentrações dos referidos compostos inibitórios no hidrolisado lignocelulósico (Jönsson and Martín, 2016; Fletcher and Baetz, 2020) (Tabela 2).

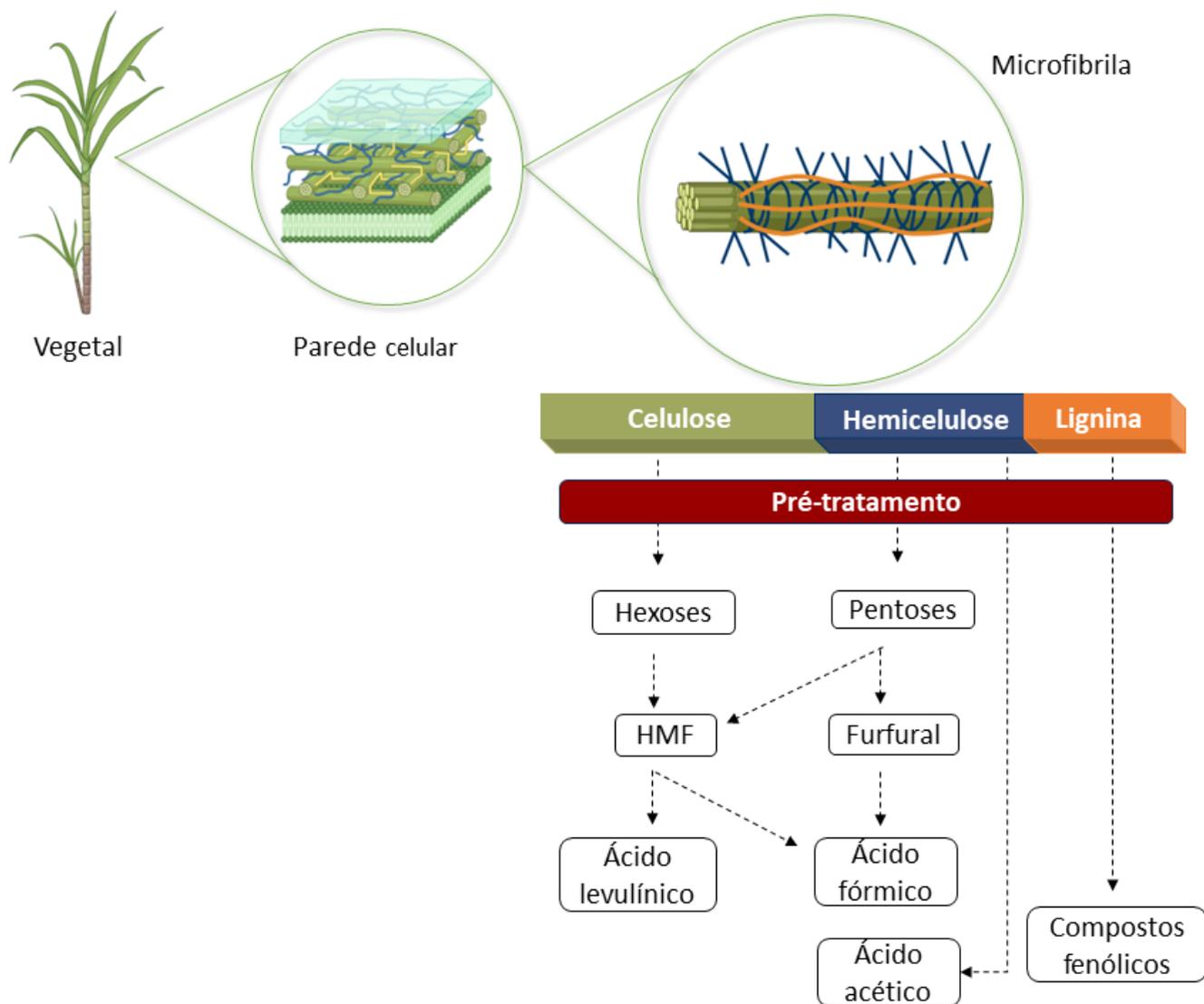


Figura 2: Origem da biomassa e suas frações lignocelulósicas e os principais compostos liberados após as etapas de pré-tratamento, hidrólise e despolimerização¹.

¹: Ícones ilustrativos retirados do BioRender.

Tabela 2: Concentração de inibidores presentes no hidrolisado após o pré-tratamento de diferentes biomassas. Adaptado de (Kim, 2018).

Biomassa	Pré-tratamento	Compostos inibitórios (g. L ⁻¹)		
		Ácido acético	Furaldeídos	Fenóis
Bagaço de cana de açúcar	Térmico	1,1 – 3,4	0,5 – 5,1	1,4 – 2,4
Palha de milho	Térmico	2,0 – 2,8	0,74 - 8,37	181 - 246 UA
Palha de trigo	Explosão a vapor	0,04 – 1,01	0,16 – 2,14	n.d
Bordo (<i>maple</i>)	Térmico	13,1	4,1	1,3
Oliveira	Explosão a vapor	0,4 – 4,2	0 – 3,2	n.d
Bagaço de cana de açúcar	Explosão a vapor e hidrólise ácida	19,62	2,56	n.d
Madeira de lei	Térmico	2,5	0,7	5,9

n.d: não determinado. UA: unidade de absorvância.

1.3.1. Furaldeídos

Os principais representantes do grupo dos furaldeídos, quando se tratando de biomassa lignocelulósica, são o furfural e o HMF. São espécies químicas formadas por um anel furano heteroaromático e um grupo funcional aldeído. São compostos resultantes da desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente, liberadas nas etapas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, aliado às altas temperaturas a que estão expostos (Almeida et al., 2007).

Ensaio *in vitro* de mensuração enzimática em *Saccharomyces cerevisiae* (Modig et al., 2002) foram capazes de provar que a presença do HMF e do furfural inibem diretamente enzimas álcool desidrogenase (ADH), responsáveis pela conversão de acetaldeído em etanol, aldeído desidrogenase (ALDH), envolvido na conversão de acetaldeído em acetato, e piruvato desidrogenase (PDH), última enzima da via

glicolítica, que atua na conversão do piruvato em Acetil-CoA. As medições para atividade de ADH, ALDH e PDH foram feitas na faixa de 0 a 4 g. L⁻¹ de cada um dos furaldeídos, o que representa de 0 a 41,6 mM de furfural e 0 a 31,7 mM HMF, respectivamente. As atividades enzimáticas diminuíram em aproximadamente 80% na presença de apenas 1,3 mM (0,12 g. L⁻¹) de furfural e em mais de 90% na presença de 10,4 mM (1,0 g. L⁻¹) de furfural. Valores muito próximos a esses foram encontrados para HMF (Modig et al., 2002). Apesar da concentração de cada inibidor variar de acordo com a fonte da biomassa e o tipo de pré-tratamento pela qual ela é submetida, as quantidades de HMF e furfural testadas por Modig (2002) podem ser encontrados em diversos hidrolisados lignocelulósicos (Tabela 2).

Além disso, hexoquinase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase são outras duas enzimas parcialmente inibidas pela presença do furfural e HMF. Isso demonstra que os furaldeídos são capazes de alterar os fluxos metabólicos e afetar o direcionamento de carbono para as vias envolvidas no metabolismo energético, como a glicólise e o ciclo do ácido cítrico, o que contribuiria no prolongamento da fase *lag* de crescimento microbiano e na redução do rendimento de biomassa celular (Almeida et al., 2007; Wang et al., 2018).

Além disso, os furaldeídos são capazes de provocar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) no espaço intracelular (Gorsich et al., 2006), o que resulta em danos à membrana celular, mutações e degradação do material genético, mal dobramento e fragmentação de proteínas e até apoptose (Perrone et al., 2008) (Figura 6). Aqui, estabelece-se uma relação entre a deficiência de NADPH e o estresse oxidativo, uma vez que o cofator preferencial das enzimas envolvidas na proteção oxidativa celular é justamente o NADPH (Carmel-Harel and Storz, 2000).

Uma das estratégias utilizadas pelas células para se sobreporem aos efeitos nocivos dos inibidores é a redução dos furaldeídos em metabólitos menos tóxicos (Figura 3): o HMF pode ser convertido em furano 2,5-dimetanol (FDM), enquanto o furfural, em 2-furanometanol (FM) (Liu, 2011), fazendo com que as células retomem a capacidade de reparar os danos causados pelos inibidores. Entretanto, apesar de diminuírem a toxicidade dos furaldeídos, essas reações resultam na diminuição da disponibilidade de NAD(P)H, já que utilizam esses cofatores na redução dos compostos. Assim, pode ocorrer um desbalanço oxidativo na célula, impedindo-a de utilizar o NAD(P)H em vias essenciais, como aquelas envolvidas na produção de ATP (Palmqvist et al., 1999).

Tabela 3: Estudos de engenharia genética e evolução adaptativa de microrganismos para aumento de tolerância aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico.

Inibidor	Estratégia	Abordagem	Microrganismo
Furfural	Redução de furfural a FM	Expressão de ADH1 (S. Wang et al., 2016)	<i>Candida tropicalis</i>
		Expressão de FucO (Wang et al., 2011)	<i>E. coli</i>
Furfural e HMF	Redução de furfural e HMF	Expressão de ALD6 (Park et al., 2011)	<i>S. cerevisiae</i>
	Transcrição de antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo	Expressão de YAP1 (Kim and Hahn, 2013)	
	Degradação de proteínas danificadas	Expressão de BAT2 (Liu and Ma, 2020)	
Ácido fórmico	Conversão de ácido fórmico em CO ₂	Expressão de FDH1 e FDH2 (Overkamp et al., 2002)	
Ácido acético	Regulação de vias metabólicas de estresse celular	Expressão de HAA1 (Swinnen et al., 2017) Expressão de KmTrxR (Gao et al., 2017)	
Ácido ferúlico	Conversão de ácido ferúlico em 4-vinil guaiacol	Expressão de padC (Forsberg et al., 2016)	<i>E. coli</i>
4- Hidroxi-benzaldeído e Vanilina	Redução de aldeídos fenólicos	Expressão de enzimas redutase (Yi et al., 2015)	<i>Zymomonas mobilis</i>
		Expressão de lacA (Ji et al., 2011)	<i>S. cerevisiae</i>

Em *S. cerevisiae*, oxidorreduções responsáveis pela conversão de furaldeídos já foram identificadas e usadas para a construção de linhagens mais tolerantes aos inibidores de hidrolisado lignocelulósico. Álcool desidrogenases 6 e 7 (ADH6 e ADH7) (Petersson et al., 2006), álcool desidrogenase 1 mutada (ADH1) (Laadan et al., 2008) e xilose redutase, em *Pichia stipitis* (Almeida et al., 2008), foram algumas das primeiras enzimas a serem superexpressas a fim de avaliar os seus papéis na tolerância dessas leveduras na presença dos furaldeídos.

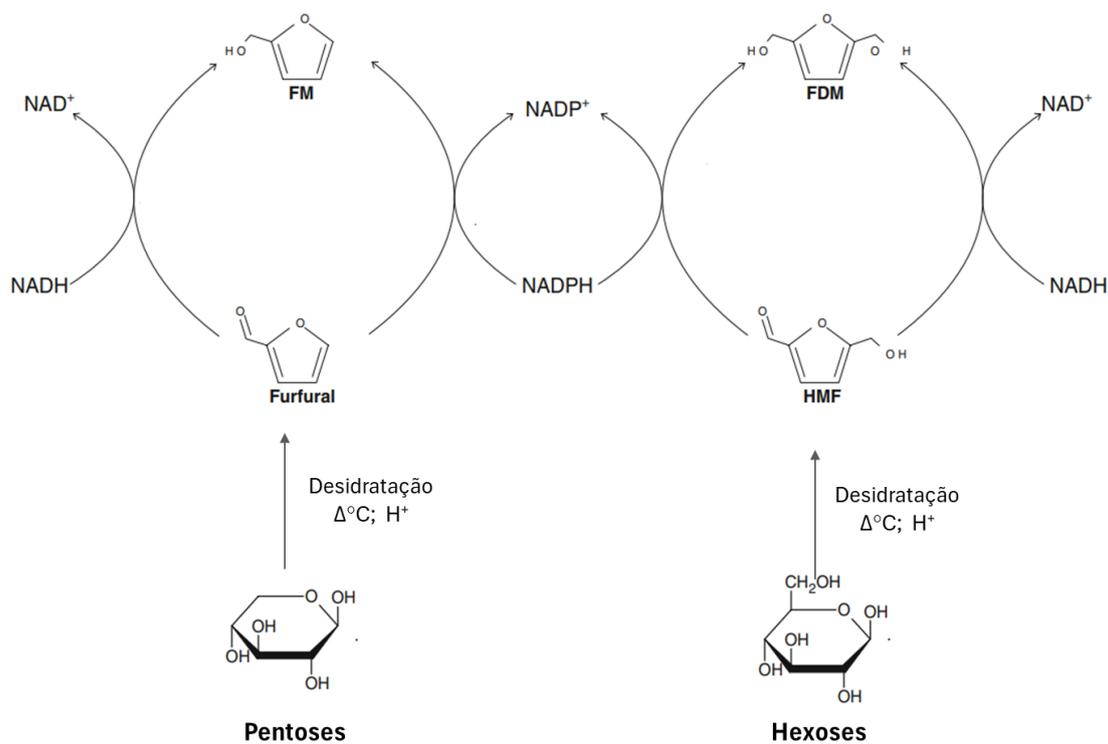


Figura 3: Representação esquemática da redução de furfural e HMF e suas respectivas reduções nos álcoois FM e FDM. Adaptado de (Almeida et al., 2009).

1.3.2. Ácidos orgânicos

Outro conjunto de inibidores presente no hidrolisado lignocelulósico é o dos ácidos orgânicos, sendo os mais comuns os ácidos acético, levulínico e fórmico. Também conhecidos como carboxílicos, os ácidos orgânicos são compostos que apresentam um grupo funcional carboxila, isto é, um carbono que realiza uma ligação dupla com oxigênio e uma ligação simples com um grupamento hidroxila. O ácido acético é formado a partir da desacetilação de hemicelulose, sendo o ácido orgânico

mais abundante na maioria dos hidrolisados de origem lignocelulósica (Vanmarcke et al., 2021). Já os ácidos fórmico e levulínico são produtos da degradação do HMF, sendo o ácido fórmico também produzido a partir do furfural sob condições ácidas e temperaturas elevadas (Almeida et al., 2007) (Figura 4).

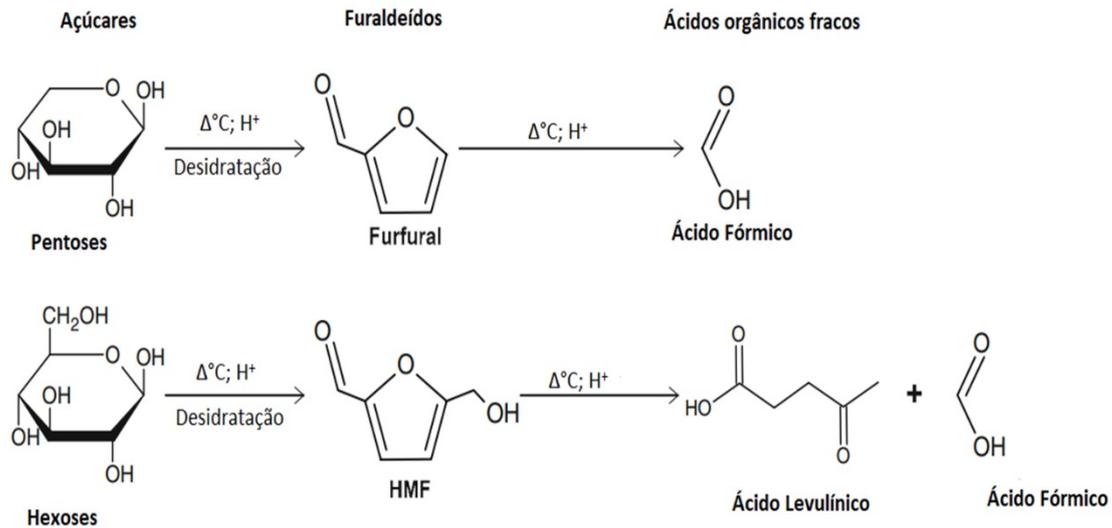


Figura 4: Representação esquemática da formação dos ácidos fórmico e levulínico a partir da hidrólise dos furaldeídos. Adaptado de (Almeida et al., 2009).

Os ácidos orgânicos, em sua forma não-dissociada, são capazes de atravessar a membrana plasmática celular através de difusão simples (Figura 6), processo facilitado pelo tamanho reduzido das moléculas dos ácidos acético e fórmico e pelo caráter mais hidrofóbico do ácido levulínico (Larsson et al., 1999).

Uma vez no ambiente intracelular, que apresenta um pH mais alto que o meio fermentativo, os ácidos se dissociam e liberam prótons H^+ . Esse processo acaba por acidificar e diminuir o pH citosólico e inibir o fluxo metabólico dentro das principais vias do metabolismo celular (Pampulha and Loureiro-Dias, 1989). Na tentativa de reestabelecer o pH e homeostase intracelulares, a bomba de prótons ATP-dependente Pma1, que bombeia o excesso de íons carregados positivamente para fora da célula, é ativada (Figura 6) (Verduyn et al., 1992).

Foi demonstrado que, em concentrações de até 100 mmol. L^{-1} , os ácidos fracos são benéficos ao metabolismo celular e estimulam a produção de ATP, em condições

anaeróbias, pela produção de etanol (Larsson et al., 1999). No entanto, em concentrações superiores àquela, a demanda de ATP excede a capacidade energética celular e a acidificação do citosol torna-se inevitável (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). Dessa forma, a organização lipídica, o gradiente eletroquímico e a disponibilidade de ATP são prejudicados, assim como a síntese do material genético e os fluxos metabólicos de vias essenciais à manutenção do microrganismo (Hasunuma and Kondo, 2012). Por fim, os ácidos orgânicos fracos também são responsáveis pela forte inibição dos transportadores de aminoácidos aromáticos, impedindo que esses possam ser internalizados e utilizados no metabolismo celular (Bauer et al., 2003).

Além do bombeamento de prótons para o exterior da célula, outros mecanismos intracelulares que possam conferir aumento de tolerância aos inibidores foram estudados. Uma vez que esse ácido fórmico pode ser utilizado na via de síntese do hidrogênio, linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* acumuladoras desse ácido foram produzidas (Kennedy et al., 2009). No entanto, um limite máximo da presença desse ácido é tolerado dentro da célula. Por isso, a levedura codifica dois genes de ácido fórmico desidrogenase (FDH 1 e 2) para a conversão de ácido fórmico em dióxido de carbono, comprovado por análises transcriptômicas que revelaram níveis de expressão aumentados de FDH1 e FDH2 após adição de ácido fórmico no meio de cultivo (Overkamp et al., 2002). Assim, foi demonstrada uma abordagem promissora para o desenvolvimento de outras linhagens de leveduras capazes de serem cultivadas em maiores concentrações de ácido fórmico.

1.3.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são quimicamente formados a partir da substituição de um ou mais átomos de hidrogênio por um grupo hidroxila na molécula de benzeno, sendo o composto fenólico mais simples o fenol. Representam o grupo mais diverso em estrutura química, gerados a partir da desconstrução da lignina, sendo a vanilina, siringaldeído, ácido ferúlico e o 4-hidroxibenzaldeído alguns exemplos (Jönsson et al., 2013) (Figura 5). Diferentes fontes de biomassa e pré-tratamentos irão liberar compostos aromáticos distintos, já que a estruturação e comportamento químico da lignina variam de acordo com sua origem (Qin et al., 2016).

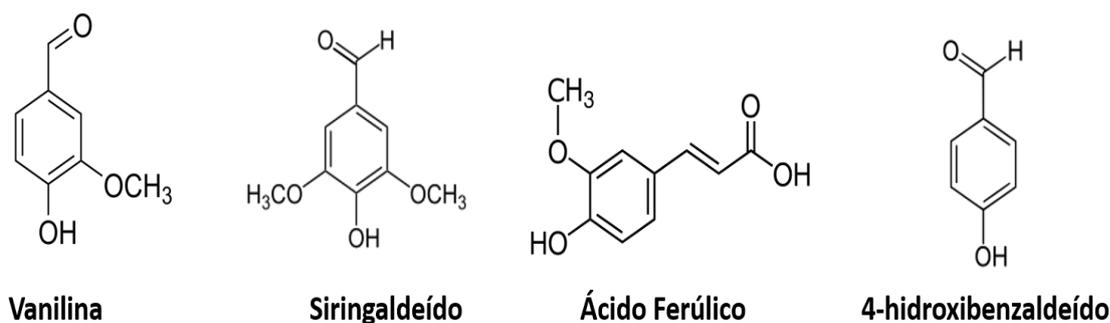


Figura 5: Exemplos de compostos fenólicos.

Os efeitos inibitórios dos compostos fenólicos sobre o metabolismo celular parecem se assemelhar aos de furaldeídos e ácidos orgânicos (Figura 6). Eles demonstraram atuação nas membranas biológicas, causando perda de integridade, afetando sua capacidade de atuar como barreiras seletivas, além de promover alterações no gradiente eletroquímico pelo transporte de prótons através da membrana plasmática para o ambiente extracelular (Lin et al., 2015; Qin et al., 2016; X. Wang et al., 2016).

As posições ocupadas pelos grupamentos substituintes, *para*, *orto* e *meta*, também são capazes de influenciar o nível de toxicidade dos compostos fenólicos, uma vez que a posição *orto* aumenta a toxicidade das vanilinas, enquanto os grupamentos hidroxila (-OH) e metoxilo (-OCH₃), nas posições *meta* e *para*, não parecem ter influência na toxicidade desses compostos (Larsson et al., 2000). A toxicidade dos compostos fenólicos também varia de acordo com o seu peso molecular: compostos menores são mais tóxicos do que aqueles de maior peso molecular, porque podem difundir-se na célula mais rapidamente e inibir a assimilação de glicose pela célula (Lin et al., 2015).

Adeboye e colaboradores (2014), em suas pesquisas sobre as implicações dos inibidores lignocelulósicos em *S. cerevisiae*, demonstraram que os diferentes compostos fenólicos presentes no hidrolisado, mesmo os que apresentam o mesmo grupo funcional, têm limites de toxicidade distintos, como o ácido ferúlico e o ácido p-cumárico, que apresentaram limites de toxicidade de 1,8 mM e 9,7 mM, respectivamente. Ainda mostraram que a concentração que induz efeitos inibitórios é altamente variável entre os compostos fenólicos e que nem todos eles são os responsáveis pelo alongamento da fase *lag* e diminuição da taxa específica máxima de crescimento, por exemplo, provando que cada composto tem um mecanismo de ação diferente no metabolismo da levedura.

Análises transcriptômicas da bactéria *Zymomonas mobilis* ZM4 revelaram mecanismos de tolerância aos inibidores fenólicos através da análise de genes que supostamente estariam relacionadas à redução dos aldeídos fenólicos em seus correspondentes álcoois fenólicos (Yi et al., 2015). A superexpressão dos genes ZMO1116, ZMO1696, e ZMO1885, que codificam para diferentes redutases, foram capazes de aumentar a taxa de conversão do 4-hidroxibenzaldeído e vanilina em seus álcoois menos tóxicos, assim como e a produtividade de etanol pela bactéria.

Apesar de os mecanismos de resposta e adaptação aos compostos fenólicos ainda não serem totalmente elucidados para a maioria dos organismos, estudos já foram capazes de apresentar resultados de conversão metabólica do aldeído coniferílico, ácido ferúlico, e ácido p-cumárico, em *S. cerevisiae* (Adeboye et al., 2015). Tal estudo demonstrou a conversão completa de aldeído coniferílico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico em outros compostos fenólicos, indicando uma possível estratégia de desintoxicação biológica pela levedura.

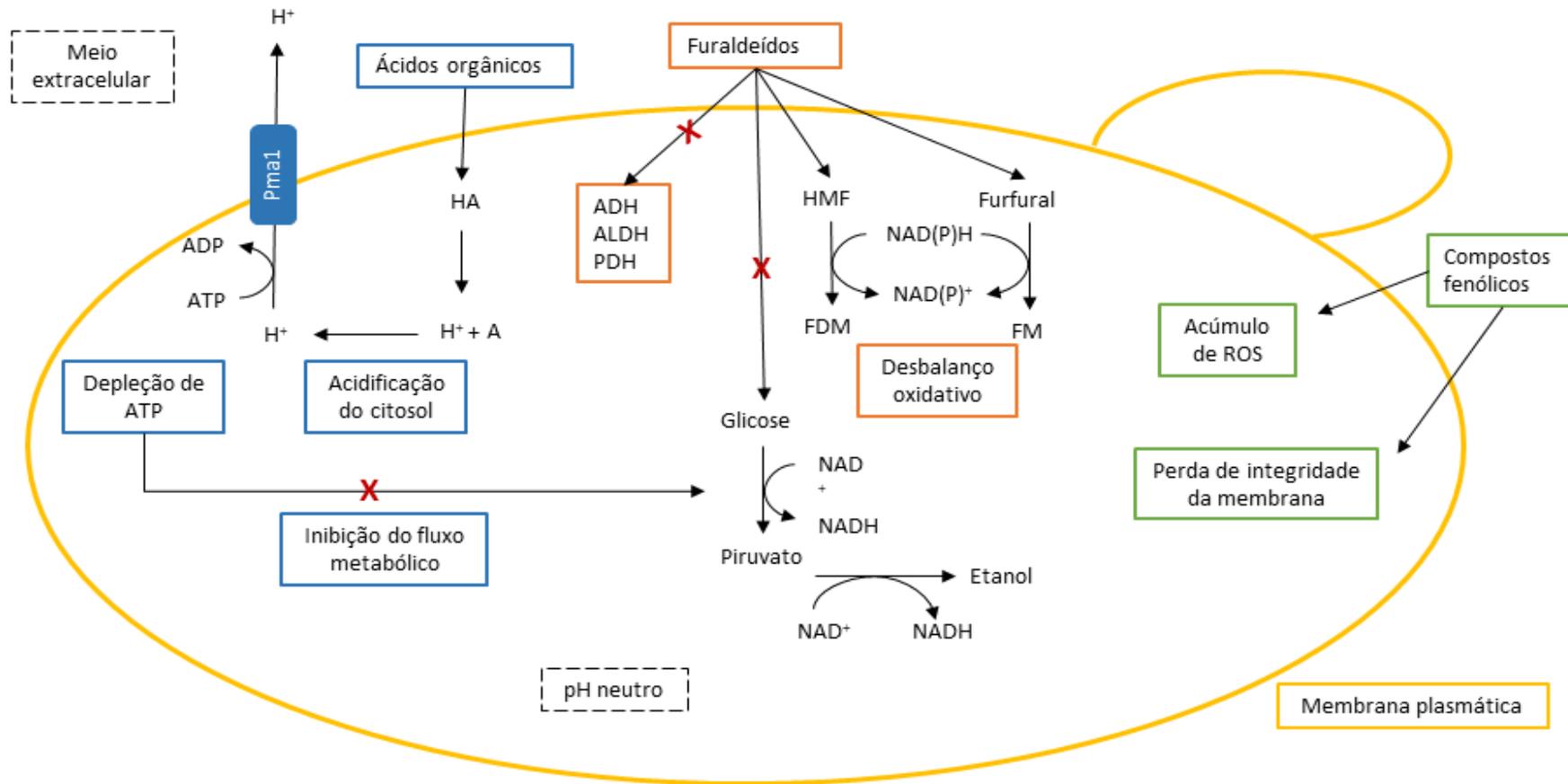


Figura 6: Visão esquemática dos mecanismos de inibição celular pelos inibidores do hidrolisado lignocelulósico: HMF e furfural (furaldeídos) reduzidos em suas espécies menos tóxicas (FDM e FM, respectivamente), provocando um desbalanço na oferta dos cofatores NAD(P)H, além de inibir a via da glicólise e ação das enzimas ADH, PDH e ALDH. Ácidos orgânicos sofrem dissociação no meio intracelular, acidificação do meio e depleção de ATP para que a bomba de prótons (Pma1) recupere a homeostase interna. Também provoca inibição da glicólise. Compostos fenólicos: desacoplamento, geração de ROS e danos à membrana celular. O “X” em vermelho representa inibição da respectiva via metabólica. Imagem de autoria própria.

1.4. *Komagataella phaffii*

A levedura *Komagataella phaffii* foi descrita pela primeira vez, em 1920, como *Zygosaccharomyces pastori* (Guilliermond, 1920) e renomeada como *Pichia pastoris* em 1950 (Phaff et al., 1956). Após 45 anos, foi reclassificada ao gênero *Komagataella* (Yamada et al., 1995), subdividido em sete espécies descritas: *K. phaffii*, *K. pastoris*, *K. ulmi*, *K. kurtzmanii*, *K. mondaviorum*, *K. populi* e *K. pseudopastoris* (Naumov et al., 2018). Trata-se de uma levedura metilotrófica, ou seja, que apresenta a capacidade inata de crescer em metanol como única fonte de carbono e energia pela superexpressão dos genes AOX 1 e 2, codificadores das enzimas das vias de assimilação e dissimilação do metanol (Wegner, 1990).

Além de metanol, a *K. phaffii* é capaz de utilizar glicose, glicerol e, de forma menos eficiente, xilose (Heisteringer et al., 2022) e CO₂ (Gassler et al., 2020) como fontes de carbono e energia. Diferente de *S. cerevisiae*, a *K. phaffii* não é suscetível ao fenótipo *Crabtree*, ou seja, não redireciona o metabolismo celular para as vias fermentativas mesmo em situações em que o alto fluxo de glicose excede a capacidade respiratória. Tal efeito não é visto em *K. phaffii* graças ao número reduzido de transportadores de hexose e uma regulação do fluxo de carbono mais controlada, em que a via das pentose-fosfato é favorecida, assim como seus cofatores (Ata et al., 2021; Bernauer et al., 2021).

K. phaffii apresenta características vantajosas para seu uso em bioprocessos como a capacidade de alcançar altas densidades de crescimento celular (200 g. L⁻¹) em peso seco durante cultivo em batelada alimentada com limitação de glicose (Heyland et al., 2010), crescer em meios acidificados (pH ~3), apresentar baixo requerimento nutricional, condições de cultivo simples e baratas, secreção proteica eficaz, capacidade de expressar altas concentrações de proteínas recombinantes através de promotores constitutivos e induzíveis fortes (Karbalaie et al., 2020), bem como realizar modificações pós-traducionais eucarióticas, como glicosilação (Peña et al., 2018; Carneiro et al., 2022).

A presença do promotor forte AOX1 (pAOX) fez com que a *K. phaffii* tenha se destacado como modelo de expressão de proteínas heterólogas, uma vez que a integração de genes recombinantes na região controlada pelo pAOX1, por meio de técnicas de engenharia genética, é uma das estratégias mais comuns para a expressão

gênica de proteínas heterólogas em processos biotecnológicos (Bernauer et al., 2021). Atualmente, não só proteínas heterólogas são produzidas em *K. phaffii*, mas uma variedade de bioprodutos químicos a partir de diferentes fontes de carbono como glicose, metanol, glicerol e xilose (Bernauer et al., 2021) sendo essa última, nos últimos anos, bastante empregada em bioprocessos.

Apesar de ser a pentose mais abundante na biomassa lignocelulósica (Trichez et al., 2022) e naturalmente consumida por fungos filamentosos, leveduras e bactérias, a xilose não se apresenta como um açúcar de metabolização eficiente, quando comparado à glicose. O metabolismo da xilose inicia-se com a sua conversão em xilitol, pela ação da xilose redutase (XR), numa reação dependente de NAD(P)H (Carneiro et al., 2022). O xilitol é um álcool de açúcar naturalmente encontrado em frutas, vegetais e cogumelos e pode ser aplicado em produtos de cuidado pessoal e farmacêuticos e na indústria alimentícia, em que é mais conhecido, como adoçante de metabolização independente de insulina. Por isso, já foram construídas linhagens de *K. phaffii* que superexpressam o gene *XYL1* de *P. stipitis*, que codifica para uma XR, para a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico (Louie et al., 2021).

Outro bioproduto de interesse comercial produzido a partir do metabolismo da xilose é o ácido xilônico (AX). Utilizado como aditivo de cimento, plastificante, agente de limpeza e na copolimerização de poliamida e poliéster, o AX é obtido através da conversão da xilose em xilonolactona por uma xilose desidrogenase (XDH), que é então convertida em ácido xilônico em uma reação de hidratação espontânea catalisada pela xilonolactonase (XLA). Essas reações não são naturalmente realizadas por leveduras e, por isso, muitas delas já foram engenheiradas para que expressassem a via heteróloga da XDH (Trichez et al., 2022). Em *K. phaffii*, a clonagem do gene *XDH-HL* garantiu a produção de até 37,1 g. L⁻¹ de ácido xilônico em meio mineral e 11,7 g. L⁻¹ em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar (Ramos et al., 2021).

O desenvolvimento de *chassis* biológicos mais robustos e tolerantes aos inibidores mostra-se fundamental para a valorização da biomassa lignocelulósica, assim como para a produção de proteínas e de diversos outros químicos de interesse industrial. Por isso, este trabalho propõe a construção de linhagens de *K. phaffii* mais tolerantes aos compostos inibitórios presente no hidrolisado lignocelulósico, através da expressão diferencial de genes envolvidos em atividades metabólicas de desintoxicação inatas (Pettersson et al., 2006; Almeida et al., 2009; Paes et al., 2021).

Diversas linhagens de *K. phaffii* encontram-se disponíveis para serem utilizadas como hospedeiras dos diferentes vetores de expressão disponíveis, o que permite a escolha mais adequada para cada finalidade. A linhagem X33, por exemplo, é prototrófica, enquanto a GS115 possui uma mutação no gene da histidina desidrogenase (HIS4) que gera o fenótipo His⁻ e permite a seleção de clones em meio sem histidina (Kurtzman, 2005). Neste trabalho, inicialmente, também foi testada cepa M12, auxotrófica para o metabolismo de leucina (LEU2) (Betancur et al., 2017).

Os plasmídeos escolhidos para atuarem como vetores de expressão do gene de interesse devem conter, obrigatoriamente, um promotor, uma sequência terminadora da transcrição e, entre eles, um ou mais sítios de restrição para a clonagem do gene heterólogo, sendo o método de integração genômica o mais estável e preferido para se alcançar uma transformação estável (Betancur et al., 2017). Outros elementos necessários à clonagem, seleção de clones, expressão e purificação do produto heterólogo são os genes que confirmam resistência a antibióticos e/ou marcas de seleção auxotróficas (HIS4, MET2, ADE1, ARG4, URA3, URA5). O vetor de expressão deve ser funcional tanto no modelo de clonagem e, por isso deve conter origem de replicação e marcas de seleção bacterianas, quanto no modelo eucariótico de expressão.

1.5. Identificação de genes que aumentam a tolerância de *K. phaffii* aos inibidores lignocelulósicos

Diversos genes envolvidos na resposta a inibidores já foram identificados e utilizados para a construção de linhagens leveduriformes mais tolerantes (Tabela 3). No entanto, a fisiologia e os mecanismos de resposta de leveduras metilotróficas a inibidores só foram recentemente relatados. Estudos iniciais demonstraram a resposta fisiológica e transcricional de *K. phaffii* a furaldeídos, ácido acético e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (Paes et al., 2021). Foi demonstrada pela primeira vez a resposta dose-dependente de *K. phaffii* ao ácido acético, furaldeídos (HMF e furfural) e hidrolisado de biomassa de cana de açúcar, tanto em nível fisiológico como transcricional. A levedura foi capaz de crescer em meios sintéticos com até 6 g. L⁻¹ de ácido acético, 1,75 g. L⁻¹ de furaldeídos ou hidrolisado lignocelulósico diluído a 10% (v/v). Ademais, a levedura provou-se capaz de consumir ácido acético e glicose concomitantemente. Visando identificar a resposta transcricional global de *K. phaffii* aos inibidores, a levedura foi cultivada na presença de ácido acético 2 e 6 g. L⁻¹, de

furaldeídos (furfural 0,9 g. L⁻¹ e HMF 0,15 g. L⁻¹) e (furfural 1,5 g. L⁻¹ e HMF 0,25 g. L⁻¹) e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar, nas diluições de 10% e 30%, composto de glicose (5,4 g. L⁻¹), xilose (90,3 g. L⁻¹), ácido acético (19.4 g.L⁻¹), furfural (2.9 g. L⁻¹) e HMF (0,55 g. L⁻¹) (Paes et al., 2021).

Do total de genes avaliados nas condições acima mencionadas, 3315 apresentaram expressão diferencial na presença de inibidores, demonstrando que a levedura passa por uma remodelação da expressão para responder aos inibidores. A maioria dos genes foi diferencialmente expressa na presença de mais de um inibidor, além de a resposta transcricional ter se mostrado dose dependente, ou seja, maiores concentrações dos inibidores levam a um maior número de genes diferencialmente expressos (GDEs). Dessa maneira, foi possível identificar potenciais alvos de modificação gênica, uma vez que, até o momento, nenhum gene que confira aumento de tolerância ao hidrolisado lignocelulósico foi identificado em *K. phaffii* (Paes et al., 2021).

Dentre os grupos de genes com expressão diferencial destacam-se aqueles de categorias genéticas ontológicas relacionados a reações de oxirredução, transportadores de membrana, processamento de RNA, metal-íon e regulação de processos metabólicos. Visando a construção de linhagens de *K. phaffii* mais tolerantes aos efeitos inibitórios dos compostos presentes no hidrolisado lignocelulósico, GDEs identificados por Paes et al. (2021) foram selecionados para serem superexpressos em *K. phaffii*.

Seis genes putativos – YJR096W, YDL124W, SAP30, FLR1, AT249_GQ6702661, referido como 2661, e YNL134C – foram selecionados para terem suas atividades avaliadas quando superexpressos em *K. phaffii* na presença de inibidores. Todos eles foram positivamente regulados na presença de ácido acético, furfural, HMF e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar, em pelo menos uma concentração, com exceção do FLR1 e YNL134C na presença de ácido acético, que foi negativamente regulado (Figura 7). Por isso, e pelas funções potencialmente desempenhadas, descritas na anotação dos genes, acredita-se que eles estejam diretamente relacionados à resposta da levedura frente aos inibidores.

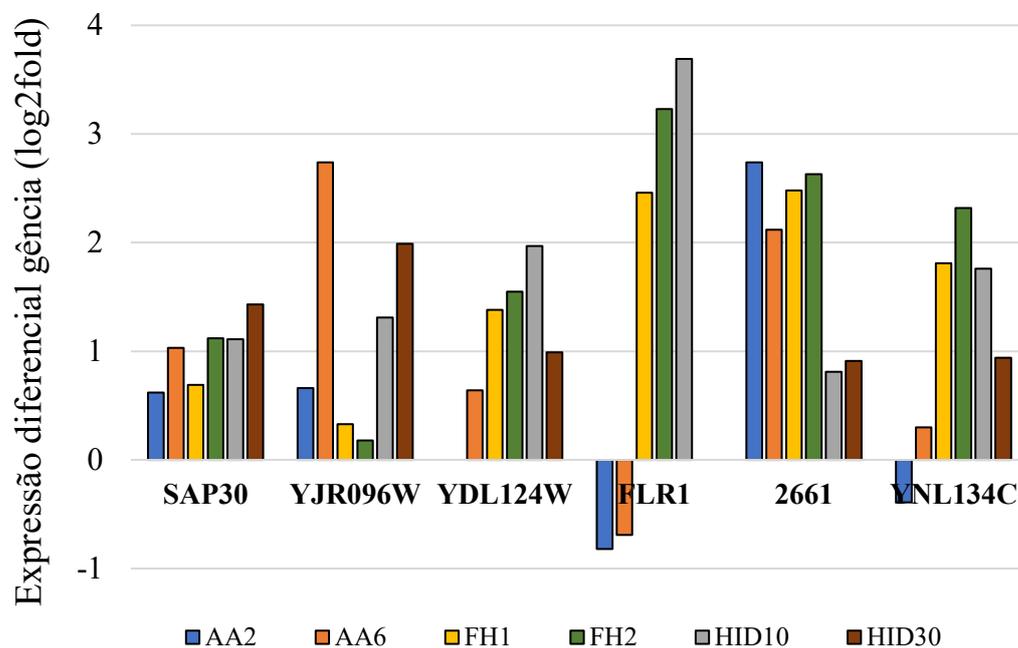


Figura 7: Expressão diferencial gênica de SAP30, YJR096W, YDL124W, FLR1, 2661 e YNL134C em meios de cultivo suplementados com ácido acético 2 g. L⁻¹ (AA2) e 6 g. L⁻¹ (AA6), furaldeídos, (sendo FH1 = furfural 0,9 g. L⁻¹ e HMF 0,15 g. L⁻¹ e FH 2 = furfural 1,5 g. L⁻¹ e HMF 0,25 g. L⁻¹) e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar nas diluições 10% (HID10) e 30% (HID30). Informações anotadas manualmente por (Paes et al.; 2021).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Melhorar geneticamente a levedura *Komagataella phaffii* para aumento da tolerância a inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico.

2.1.1. Objetivo específicos:

- Selecionar e clonar pelo menos 6 genes candidatos para superexpressão em *K. phaffii*.
- Obter linhagens recombinantes de *K. phaffii* com os genes candidatos superexpressos.
- Avaliar a tolerância de linhagens recombinantes de *K. phaffii* expressando os genes candidatos em meio sintético suplementado com furfural, HMF, ácido acético e hidrolisado lignocelulósico.
- Avaliar a tolerância de linhagens recombinantes de *K. phaffii* expressando genes candidatos em hidrolisado lignocelulósico.

3. Estratégia

A estratégia para melhorar a tolerância de *K. phaffii* aos inibidores lignocelulósicos é esquematicamente resumida na figura 8: inicialmente, foram selecionados seis genes previamente identificados nos estudos fisiológicos e transcriptômicos de *K. phaffii* sob o efeito de inibidores presentes no hidrolisado de biomassa, possivelmente relacionados às respostas de tolerância a furaldeídos, (HMF e furfural), ácido acético e compostos fenólicos. Os genes selecionados, YJR096W, YDL124W, SAP30, FLR1, 2661 e YNL134C, tiveram suas sequências gênicas amplificadas por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos. Posteriormente, os produtos de PCR dos genes foram subclonados no vetor pGEM®-T Easy (Promega). Os fragmentos gênicos foram obtidos por digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição específicas para posterior clonagem no vetor de expressão, pKLD, previamente digerido com os mesmos pares de enzima de restrição utilizados para cada um dos genes. As linhagens de *K. phaffii* M12 (Betancur et al., 2017) e X33 foram transformada com o vetor pKLD contendo os genes de interesse. Os clones transformantes de M12 foram selecionados por marca auxotrófica (Leu⁻) e os clones de X33, por resistência ao antibiótico G418. As linhagens controle e recombinantes de *K. phaffii* foram cultivadas em microplacas de 48 poços e, posteriormente, em frascos Erlenmeyer, em meio de cultura controle, contendo apenas glicose, e naqueles suplementados com os inibidores ácido acético, furfural, HMF e hidrolisado de biomassa de cana de açúcar para analisar o perfil de crescimento microbiano, consumo, produção e conversão de metabólitos. Ao final do projeto, a superexpressão dos genes em *K. phaffii* cultivada na presença dos inibidores foi avaliada quanto ao seu impacto na resposta do fenótipo de tolerância.

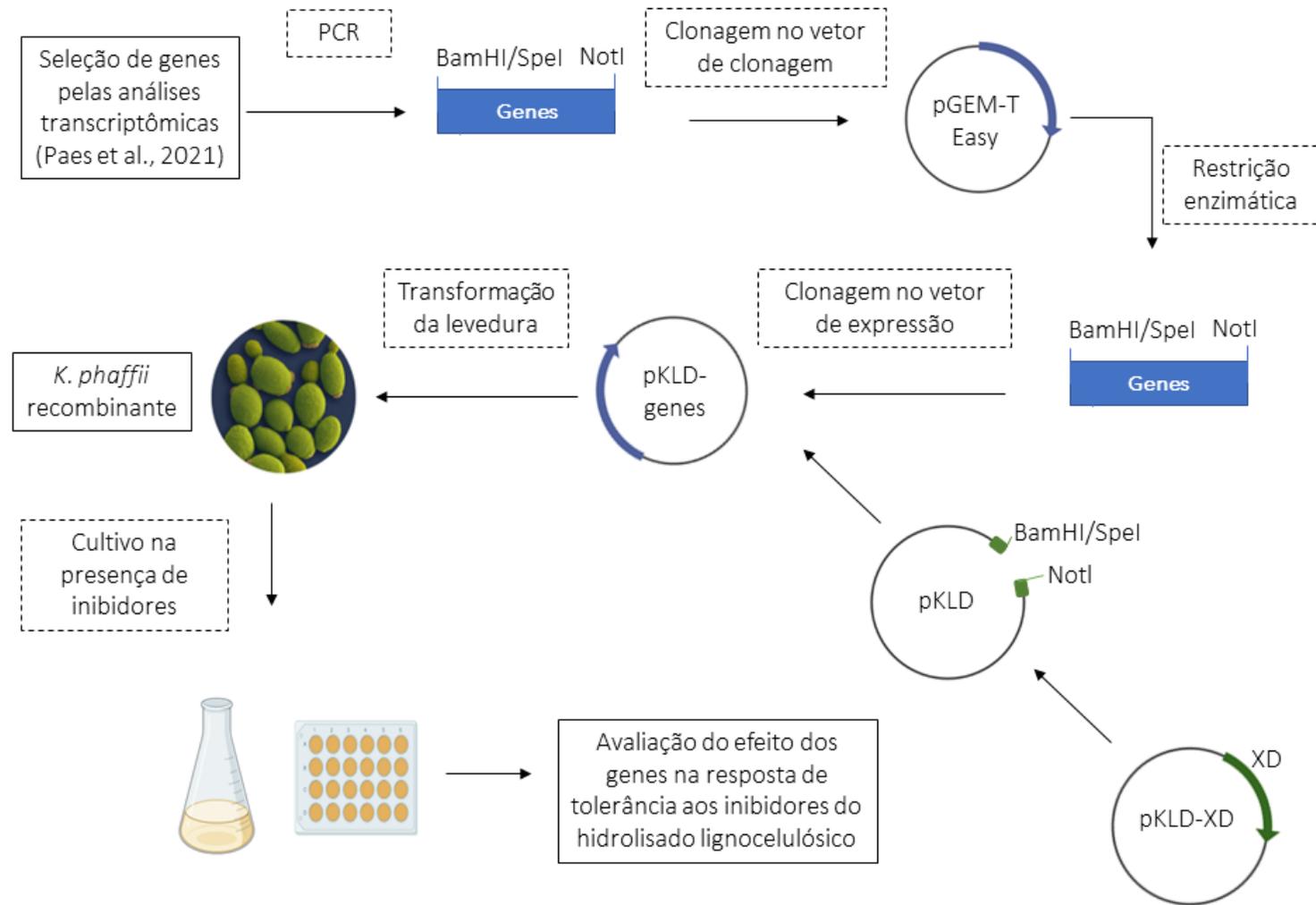


Figura 8: Representação esquemática da estratégia de validação de genes potencialmente envolvidos no aumento de tolerância de *K. phaffii* aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico. Os genes foram amplificados por PCR e clonados no vetor de clonagem pGEM-T Easy, multiplicado em *E. coli*. Após, os genes YDL124W, SAP30, 2661 e YNL134C foram digeridos com BamHI e NotI, enquanto os genes YJR096W e FLR1, com SpeI e NotI. O vetor de expressão pKLD-XD foi digerido com os mesmos pares de enzima, liberando o fragmento de XD. Os genes foram então clonados no vetor pKLD e os plasmídeos gerados foram multiplicados em *E. coli* e utilizados para transformar a levedura *K. phaffii*. As leveduras recombinantes foram cultivadas na presença dos inibidores e foram avaliados os efeitos da superexpressão dos genes na resposta de tolerância.

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Linhagens

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens de levedura *Komagataella phaffii* X33 (Invitrogen) e M12 (Betancur et al., 2017). Para clonagem e amplificação de DNA plasmidial foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen).

4.1.2. Plasmídeos

O plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega) (Figura 9) foi utilizado como vetor de clonagem dos produtos de PCR e permitiu a seleção de clones transformantes por coloração azul/branca e resistência ao antibiótico ampicilina. O plasmídeo pKLD-XD (Figura 10) foi utilizado como vetor de expressão e permitiu a seleção de clones transformantes por resistência aos antibióticos Canamicina/G418 e marca auxotrófica para leucina.

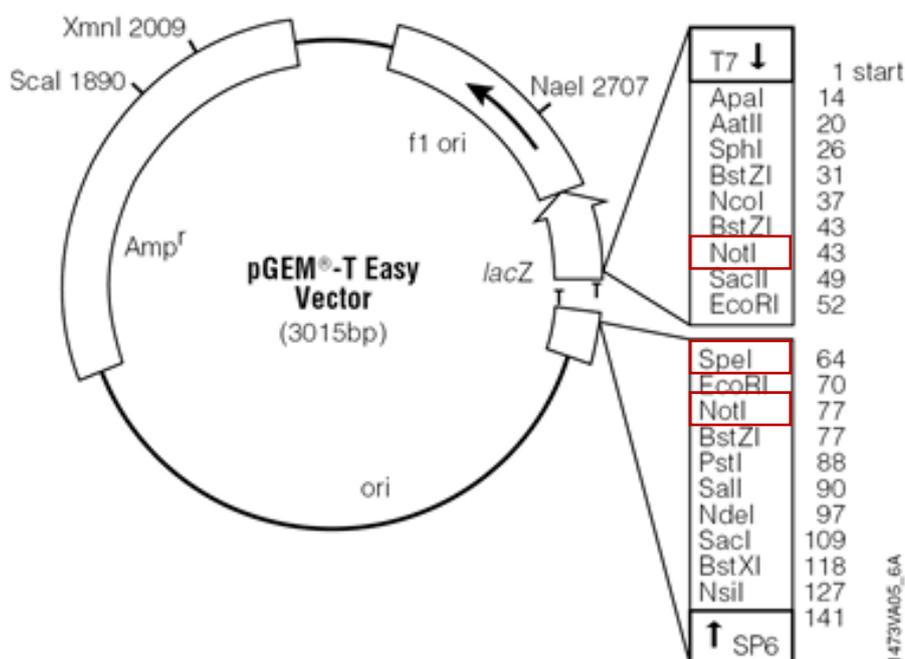


Figura 9: Vetor pGEM®-T Easy (Promega). As enzimas de restrição destacadas por retângulos vermelhos, no sítio múltiplo de clonagem, foram utilizadas para digestão dos insertos.

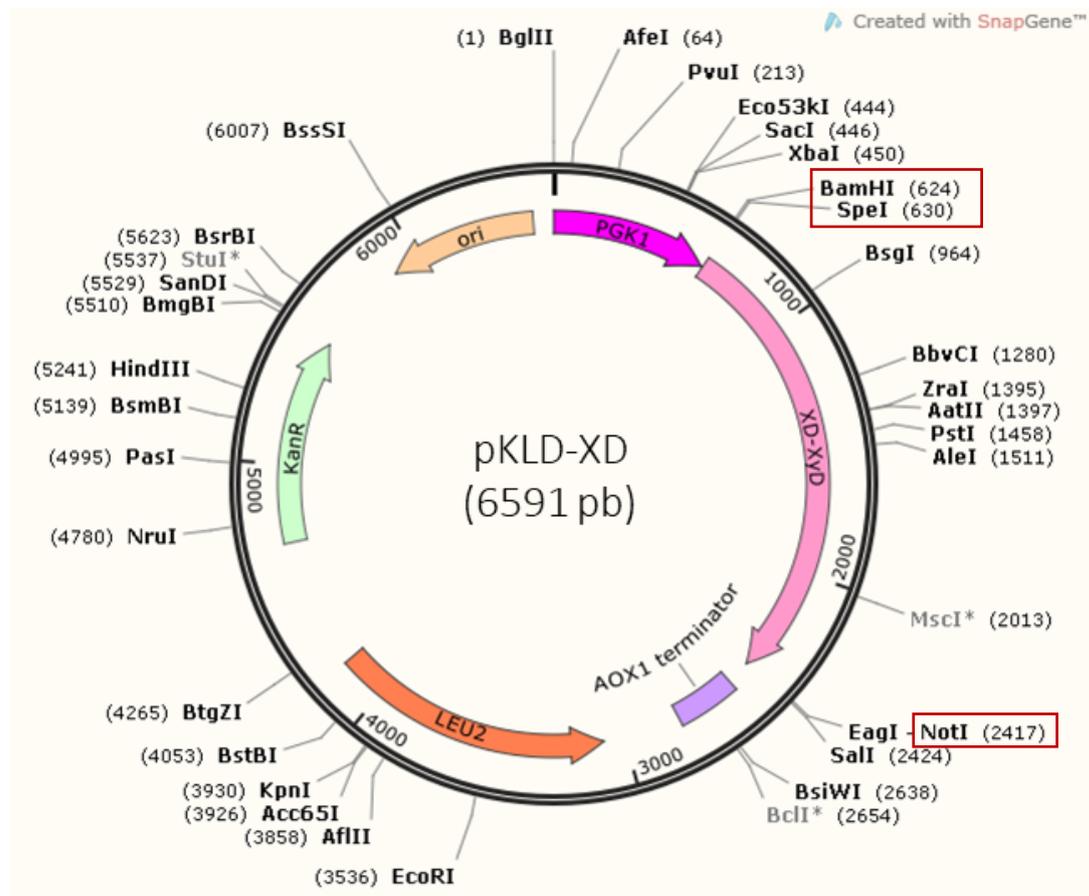


Figura 10: Vetor pKLD-XD, construído e descrito pela colaboradora Clara Vida Galvão Correa Carneiro, em sua tese de doutorado, aguardando publicação. As enzimas de restrição destacadas por retângulos vermelhos foram utilizadas na digestão do vetor.

4.1.3. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar os genes de interesse do DNA genômico de *K. phaffii* X33 foram sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT), identificados com os nomes dos respectivos genes que serão amplificados (Tabela 4).

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para reações de PCR. As regiões sublinhadas representam as sequências de DNA para adição de sítios de restrição nas extremidades dos genes.

Nome da sequência	Sequência (5' - 3')
<i>YJR096W reverse</i>	TAAG <u>GCGGCC</u> GCTTAAGGAACATTGACGACA
<i>YJR096W forward</i>	GCG <u>ACTAGT</u> ATGTCAAGGTATCTTCAATTG
<i>YDL124W reverse</i>	ATAG <u>GCGGCC</u> GCCTAATCAAACCTTGCTGTA
<i>YDL124W forward</i>	TAG <u>GGATCC</u> ATGGCATTGGCAATTCCTC
<i>SAP30 reverse</i>	TAAG <u>GCGGCC</u> GCTCATGTAATGTTTCAGTTTGAACG
<i>SAP30 forward</i>	TAG <u>GGATCC</u> ATGCCCCAAGAAGAGACGC
<i>FLR1 reverse</i>	TAAG <u>GCGGCC</u> GCTCATGGCCCGGCATATCTA
<i>FLR1 forward</i>	GCG <u>ACTAGT</u> ATGTCTCATCTATTACTGCGTG
<i>2661 reverse</i>	TAAG <u>GCGGCC</u> GCTCATAACAATGTTGTTGGTTG
<i>2661 forward</i>	TAG <u>GGATCC</u> ATGATCTCCGTTTTTACTCC
<i>YNL134C reverse</i>	TAAG <u>GCGGCC</u> GCTTATGGGCGGAAAACCAAC
<i>YNL134C forward</i>	TAG <u>GGATCC</u> ATGACTTCAATCCCTTCCACC
3'AOX1 reverse (Invitrogen)	GCAAATGGCATTCTGACATCC
pPGK-pKLD forward	CCATCACTGTCACCCGTCAT

4.1.4. Meios de cultura

Meio LB - low salt

Cloreto de sódio 0,5% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

Peptona bacteriológica 1% (p/v)

pH ajustado para 7,5 com NaOH

Ágar Bacteriológico 2% (p/v), se meio sólido

Suplementação com antibiótico, quando necessário

Meio YPD

Extrato de Levedura 1% (p/v)

Peptona bacteriológica 2% (p/v)

D-glicose 2% (p/v)

Ágar bacteriológico 2% (p/v), se meio sólido

Suplementação com antibiótico, quando necessário

Meio MD

YNB suplementado de sulfato de amônio e aminoácidos 6,7% (p/v)

Biotina 0,02% (p/v)

Ágar bacteriológico 2% (p/v), se meio sólido

Suplementação com antibiótico, quando necessário

Meio MD-glicose

Meio MD

D-glicose 4% (p/v)

Ágar bacteriológico 2% (p/v), se meio sólido

Suplementação com antibiótico, quando necessário

Meio MD-xilose

Meio MD

D-xilose 4% (p/v)

Ágar bacteriológico 2% (p/v), se meio sólido

4.1.5. Soluções e tampões*Solução YNB 10X (estoque)*

YNB suplementado de sulfato de amônio 6,7% (p/v)

Foram utilizadas soluções de YNB 10X com e sem a suplementação de aminoácidos

Solução de sorbitol/EDTA

Sorbitol 0,9 M

EDTA 0,1 M

Solução de sorbitol 1 M

187,12 g de Sorbitol ($C_6H_{14}O_6$)

Completado com água ultrapura para volume final de 1 L

Solução Acetato de Sódio 3 M

12,305 g de Acetato de Sódio (NaO_2CCH_3)

Completado com água ultrapura para volume final de 50 mL

Solução de cofatores – NAD(P)H 10 mM

Para preparar 1 mL de solução de NADH 10 mM são necessários 7 mg de NADH. Para 1 mL de solução de NADPH 10 mM, são necessários 8,31 g de NADPH. Volumes completados com água ultrapura.

Solução de 5-HMF 0,1 M (estoque)

Para preparar 2 mL de solução de 5-HMF 0,1 M são necessários 25,22 g de 5-HMF diluídos em água ultrapura.

Solução de furfural 0,1 M (estoque)

Para preparar 2 mL de solução de furfural 0,1 M são necessários 16,67 uL de furfural 99%. Volumes completados com água ultrapura.

Tampão Tris/EDTA

Tris HCl (pH 8,0) 25 mM

EDTA (pH 8,0) 10 mM

Tampão SB

Ácido bórico 5,1% (p/v)

Hidróxido de sódio 0,8% (p/v)

Tampão fosfato de potássio 1M (pH 7,0)

Para o preparo de 1 L de tampão fosfato de potássio 1 M (pH 7,0) são necessários 132 mL de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) 1 M e 868 mL de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) a 1 M. Volume completado com água ultrapura.

pH ajustado com ácido fosfórico ou hidróxido de potássio.

Tampão trietanolamina (pH 7,0)

Para o preparo de 50 mL de tampão trietanolamina (pH 7,0) são necessários 6,77 mL de solução de trietanolamina 98%. Volume completado com água ultrapura.

4.2. Métodos

4.2.1. Escolha dos genes para superexpressão em *K. phaffii*

A partir da avaliação dos mais de três mil GDEs identificados por Paes et al., 2021, os genes putativos – YJR096W, YDL124W, SAP30, FLR1, 2661 e YNL134C – foram selecionados para terem suas atividades avaliadas quando superexpressos em *K. phaffii* na presença de HMF, furfural e hidrolisado de cana de açúcar. Os critérios de seleção incluíram a expressão diferencial do gene nos diferentes tipos e concentrações de inibidores testados e a ontologia genética, que diz sobre a função molecular, o processo biológico e o componente celular relacionado ao gene em questão.

4.2.2. Vetor de expressão

O plasmídeo escolhido para superexpressão dos genes citados anteriormente foi o pKLD-XD (Figura 10), originado do vetor pKLD-EGFP (Betancur et al., 2017). O gene XD encontra-se sob a regulação do promotor constitutivo do gene PGK1 e do terminador do gene AOX1. O vetor também apresenta o gene que confere resistência aos antibióticos Canamicina/geneticina, além da marca de seleção para o aminoácido leucina (LEU2). O gene XD foi removido por restrição enzimática – foram feitas digestões com os pares de enzimas BamHI/NotI e SpeI/NotI – para que os genes de interesse desse trabalho, previamente digeridos com os mesmos pares de enzimas, pudessem ser inseridos no vetor pKLD.

4.2.3. Extração de DNA genômico de levedura

O DNA total da levedura X33 foi extraído segundo o protocolo de extração de DNA de leveduras descrito no Capítulo IV – (Andréa Queiroz Maranhão e Lídia Maria Pepe de Moraes – 2016) Extração e purificação de DNA, do livro “Técnicas básicas em Biologia Molecular” – 2ª Edição, editora UnB. As células de X33 cresceram até atingir a fase estacionária de crescimento (OD_{600nm} saturada) em 20 mL de meio YPD. As células foram centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 2 mL de sorbitol 1 M e adicionadas de 9 uL de liticase (5000 U. mL⁻¹) e incubadas a 37 °C por 1 hora. As células foram centrifugadas a 5000 x g por

5 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 2,5 mL de solução Tris-EDTA e posteriormente adicionadas de 250 µL de solução SDS 10%, seguida de incubação a 65 °C por 30 minutos. Foram adicionados 750 µL de solução acetato de potássio 5 M e incubação no gelo por 30 minutos. O conteúdo foi centrifugado a 10000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubo Falcon de 15 mL. Foram adicionados dois volumes de etanol 95% à temperatura ambiente. O conteúdo foi centrifugado a 5000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, depois de seco, foi ressuspensado em 1,5 mL de tampão TE (pH 8,0) e centrifugado a 10000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos estéreis de 2 µL, adicionados 15 µL de RNase (10 mg. mL⁻¹) e incubado a 37 °C por 30 minutos. Adicionou-se um volume de isopropanol 100% à temperatura ambiente e misturou-se lentamente. O precipitado foi separado com pipeta estéril e colocado para secar em microtubos estéreis de 1,5 mL à temperatura ambiente. Após 24 horas de secagem, o material precipitado foi ressuspensado em 250 µL de água ultrapura estéril e armazenado a -20 °C.

4.2.4. Amplificação por PCR dos genes de interesse

Os genes SAP30, YDL124W, YJR096W, FLR1, 2661 e YNL134C foram amplificados por PCR em termociclador (*Applied Biosystems*) com um ciclo inicial de desnaturação de 95 °C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos na temperatura indicada para cada gene (Tabela 5) por 30 segundos, extensão da sequência a 72 °C por 90 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Foi utilizado o kit GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega) para a realização de todas as reações de PCR deste trabalho, conforme as orientações do fabricante e concentrações dos reagentes listadas na Tabela 6.

Tabela 5: Tamanho dos genes e temperatura de anelamento utilizado na PCR.

Gene	Tamanho (pb)	Temperatura (°C)
SAP 30	477	59,5
FLR1	1641	54,4
YJR096W	846	52,1
YDL124W	900	57,3
2661	1815	56,0
YNL134C	1134	57,5

Tabela 6: Reagentes e suas concentrações utilizadas nas reações de PCR.

Reagente	Concentração
5X <i>GoTaq</i> PCR Buffer	-
MgCl ₂	25 mM
dNTP	10 mM
Primer <i>forward</i>	10 µM
Primer <i>Reverse</i>	10 µM
<i>GoTaq</i> DNA Polimerase	5 U. µL ⁻¹
DNA Molde	50 ng
Nuclease-Free Water	-

4.2.5. Purificação de fragmentos de DNA

Os produtos de PCR e/ou excisados de gel de agarose foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguindo as orientações do fabricante.

4.2.6. Construção do vetor de clonagem

Os produtos de PCR dos seis genes - YJR096W, YDL124W, SAP30, FLR1, 2661, YNL134C - foram clonados no vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega) por ação da enzima T4 DNA ligase. A reação foi utilizada para transformar *E. coli*.

4.2.7. Construção do vetor de expressão

Os genes YDL124W, SAP30, 2661 e YNL134C, clonados anteriormente no vetor pGEM®-T Easy (Promega), foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e NotI, enquanto YJR096W e FRL1, somente com a enzima SpeI, depois de diversas tentativas utilizando-se a digestão dupla SpeI e NotI. O plasmídeo pKLD-XD foi escolhido como vetor de expressão, tendo sido previamente digerido com essas mesmas enzimas. A dupla digestão BamHI/NotI resultou na liberação do gene XD para que os genes YDL124W, SAP30, 2661 e YNL134C pudessem ser clonados. Já para os genes YJR096W e FLR1, o sítio de restrição utilizado para clonagem foi o SpeI. O vetor pKLD-XD foi linearizado por essa enzima e, só após a clonagem dos genes de interesse, XD foi retirado por restrição enzimática nos sítios de NotI que flanqueavam o gene.

4.2.8. Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões foram realizadas com enzimas de restrição *Fast Digest* (ThermoFisher Scientific) seguindo as instruções de uso do fabricante. Os produtos de PCR dos genes SAP30, YDL124W e 2661 foram digeridos com as enzimas BamHI e NotI, enquanto os amplicons dos genes FLR1 e YJR096W foram digeridos com a enzima SpeI. O vetor de expressão pKLD-XD também foi digerido com esses dois pares de enzimas. As digestões foram confirmadas por gel de eletroforese.

4.2.9. Ligação de fragmentos de DNA

Os sistemas de ligação foram feitos em um volume total de 10 μL com as razões molares entre vetor e inserto, respectivamente, de 1:3 e 1:5. As ligações foram realizadas entre o vetor pKLD e os genes de interesses, ambos obtidos por digestão com os mesmos pares de enzimas de restrição, utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, com incubação a 4 °C durante à noite.

4.2.10. Transformação bacteriana por eletroporação

Para realizar a transformação foi utilizada uma alíquota (50 μL) de células eletrocompetentes DH10BT1 armazenadas à -80 °C, para cada sistema de ligação. As cubetas de eletroporação (0,1 cm) foram incubadas no gelo. As células foram descongeladas no gelo e foram adicionadas de 1 μL do sistema de ligação. Em seguida as células foram transferidas para a cubeta e submetidas a choque elétrico com uma voltagem de 1800 V, capacitância 25 μF e resistência de 200 Ω . Foi adicionado 1 mL de meio LB gelado ao sistema e incubado a 37 °C por 1 h. As células foram plaqueadas em meio LB *low salt* sólido contendo o antibiótico Canamicina 50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas.

4.2.11. Extração de DNA plasmidial

Colônias de *E. coli* transformadas foram transferidas para 10 mL de meio LB *low salt* com 50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de canamicina em tubos tipo Falcon estéreis de 50 mL e incubadas a 37 °C por 16 horas e 180 rpm. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) e seguindo as recomendações de uso do fabricante.

4.2.12. Transformação de *K. phaffii* por eletroporação

O vetor pKLD contendo o gene de interesse extraído de *E. coli* foi linearizado com a enzima SacI *FastDigest* (Thermo Fisher Scientific). Um volume de 5 μg de DNA plasmidial foi incubada juntamente com o tampão 10X *Fast Digest Buffer* e a enzima de restrição. Após 4 horas de reação a 37 °C, a enzima foi inativada a 80 °C por 5 minutos.

A linearização do vetor pKLD com os genes de interesse a ser expressos em *K. phaffii* foi confirmada por gel de eletroforese. A levedura foi transformada segundo o protocolo descrito em *EasySelect Pichia Expression Kit* (Invitrogen, EUA). Uma colônia de *K. phaffii* foi inoculada em 15 mL de YPD, incubada a 30 °C por 24 horas e sob agitação de 200 rpm. Foi inoculado o volume do pré-inóculo necessário que a OD_{600nm} de 1,3 fosse atingida em 100 mL de meio YDP. A cultura foi coletada e centrifugada a 1500 x g por 5 minutos à 4 °C. O *pellet* foi ressuscitado em 100 mL de água ultrapura gelada. As células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições e o *pellet* foi ressuscitado em 50 mL de água ultrapura gelada. Novamente as células foram centrifugadas e ressuscitadas em 2 mL de Sorbitol 1 M gelado. A seguir as células foram centrifugadas e ressuscitadas em 100 µL de Sorbitol 1 M gelado. 80 µL de células foram separados e adicionados do DNA linearizado, transferidos para uma cubeta de eletroporação (0,2 cm) e incubadas por 5 minutos no gelo. Posteriormente, as células foram transferidas para a cubeta e submetidas a choque elétrico com uma voltagem de 2000 V, capacitância 25 µF e resistência de 200 Ω. Foi adicionado 1 mL de Sorbitol 1 M gelado ao sistema, incubado a 30°C por 2 horas, sem agitação. As células foram plaqueadas em meio MD-glicose sólido sem aminoácidos para marca auxotrófica, no caso da linhagem de *K. phaffii* M12, e YPD sólido para a marca dominante, para X33. As placas foram incubadas a 30 °C por 72 horas.

4.2.13. Análise eletroforética de amostras de DNA

As amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose, preparados na concentração de 0,8% de agarose, em tampão SB 1X e com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg. mL⁻¹. Após serem aplicadas, as amostras foram submetidas a uma corrente elétrica de 60 V, em cubas de tamanho de 15 x 22 x 9,5 cm, e visualizadas através da exposição do gel à radiação ultravioleta.

4.2.14. Cultivo de *E. coli*

As bactérias foram cultivadas em meio LB *low salt* em placas de Petri, quando cultivadas em meio sólido, e em tubo tipo Falcon ou frascos Erlenmeyer, quando crescidas em meio LB *low salt* líquido, a 37 °C e 180 rpm, por 16 horas de incubação.

No caso de seleção de colônias transformantes, os antibióticos ampicilina 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ou canamicina 50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ eram adicionados ao meio de cultura.

4.2.15. Preparo de células bacterianas eletrocompetentes

Células de *E. coli* DH10BT1 (Thermo Fisher Scientific) foram inoculadas em placa contendo meio LB *low salt*, a partir de um estoque armazenado a -80°C , e incubadas a 37°C por 16 h. Uma colônia isolada foi inoculada em um tubo tipo Falcon de 50 mL, contendo 10 mL de meio LB, posteriormente incubada a 37°C , sob uma agitação de 180 rpm, durante à noite. Após, 5 mL do pré-inóculo foram inoculados em 200 mL de meio LB, em um frasco Erlenmeyer de 1 L e incubado a 37°C , sob uma agitação de 180 rpm até atingir uma $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de 0,6. Posteriormente, a cultura foi resfriada por 30 minutos no gelo e as células foram centrifugadas a $2000 \times g$ por 15 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 100 mL de água ultrapura gelada. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições e ressuscitadas em 100 mL de glicerol 10% gelado. Posteriormente, as células foram centrifugadas nas mesmas condições e ressuscitadas em 10 mL de glicerol 10% gelado. Novamente, as células foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores e ressuscitadas em 1 mL de glicerol 10% gelado. Finalmente, foram preparadas alíquotas de 50 μL em tubos de 0,2 mL, com uma concentração de $\sim 2 \times 10^8$ células. mL^{-1} e armazenadas a -80°C .

4.2.16. Diálise do sistema de ligação de fragmentos de DNA

O conteúdo do resultado da reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) foi dialisado em água ultrapura, durante 20 minutos, através de membrana Millipore tipo VSWP, com poro de 0,025 μm .

4.2.17. Purificação de DNA plasmidial por precipitação

O DNA plasmidial linearizado foi purificado pelo protocolo de precipitação por etanol e acetato de sódio (Zeugin., 1985). Foram adicionados 2,5 x o volume de amostra de DNA de etanol 100% gelado e 1/10 do novo volume da reação de acetato de sódio 3 M. O conteúdo foi homogeneizado e incubado a -80°C por 1 h. Posteriormente, as

amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e repetiu-se a centrifugação e o descarte do sobrenadante. Os *pellets* foram secos no concentrador à vácuo, em temperatura ambiente e ressuspensos em 10 µL de água ultrapura estéril e armazenado a -20 °C.

4.2.18. PCR de colônia de *K. phaffii*

As colônias resultantes da transformação de *K. phaffii* foram transferidas para outra placa contendo meio sólido YPD fresco e incubadas a 30 °C por 48 horas. As colônias foram transferidas para microtubos de 0,5 mL e ressuspensas em 10 µL de NaOH 0,02 M e incubadas a 100 °C por 10 minutos. Após isso, o conteúdo foi centrifugado a 10000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente e 5 µL do sobrenadante foram utilizados como DNA molde para a reação de PCR. Foram utilizados os mesmos parâmetros de reação indicados na Tabela 6.

4.2.19. Cultivo de *K. phaffii* em microplaca

A fim de avaliar o perfil cinético de crescimento microbiano em microescala, as linhagens de *K. phaffii* controle e superexpressando os genes de interesse, foram cultivadas, inicialmente, em meio MD-glicose sólido, na presença do antibiótico G418, durante 96 horas a 30 °C. As colônias transformantes foram, inicialmente, cultivadas em tubo tipo Falcon contendo 5 mL de meio MD-glicose líquido e incubadas a 30 °C, a 200 rpm, por 40 horas, para obtenção do pré-inóculo. Posteriormente, as linhagens foram inoculadas em 300 µL de meio de cultura, em microplaca de 48 poços, para OD_{600nm} inicial de 0,1. As linhagens foram inoculadas nos seguintes meios de cultivo distintos: MD-glicose (45 g. L⁻¹), MD-glicose suplementado com furfural (3 g. L⁻¹), HMF (2 g. L⁻¹) e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar (30%). Após o inóculo, as placas foram incubadas a 30 °C, durante 96 horas, no espectrofotômetro de microplacas *BioTek Epoch 2 (Agilent)*. As leituras de OD_{600nm} foram feitas, de hora em hora, através do *software BioTek Gen5* para leitores de microplacas. Os ensaios testaram três clones de cada levedura transformante, em triplicata técnica.

O hidrolisado lignocelulósico utilizado neste experimento foi obtido através de explosão a vapor de bagaço-de-cana, cuja fração líquida foi posteriormente submetida a

hidrólise ácida com 0,5% H₂SO₄ a 130 °C, cedido à Embrapa Agroenergia pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). O conteúdo foi filtrado em membrana de celulose 0,45 µM e teve o pH ajustado para 5,5 por adição de KOH. O hidrolisado sem diluição era composto de glicose (12 g. L⁻¹), xilose (82 g. L⁻¹), ácido acético (19 g. L⁻¹), furfural (1,63 g. L⁻¹) e HMF (0,51 g. L⁻¹).

4.2.20. Cultivo de *K. phaffii* em frasco Erlenmeyer

A fim de avaliar o perfil de crescimento microbiano, consumo de glicose e conversão de HMF pelas linhagens controle e superexpressando os genes de interesse, essas foram cultivadas, inicialmente, em meio MD-glicose sólido, na presença do antibiótico G418, durante 72 horas a 30 °C. As colônias transformantes foram, inicialmente, cultivadas em tubo tipo Falcon contendo 20 mL de meio MD-glicose líquido e incubadas a 30 °C, a 200 rpm, por 40 h, para obtenção do pré-inóculo, em triplicata biológica. Posteriormente, as linhagens foram inoculadas em 40 mL de meio de cultura, em frascos aletados de 250 mL do tipo Erlenmeyer, com OD_{600nm} inicial de 0,5. As linhagens foram inoculadas nos seguintes meios de cultivo distintos: MD-glicose (45 g. L⁻¹) e MD-glicose suplementado com HMF (2 e 3,5 g. L⁻¹). Os cultivos realizados em meio contendo xilose (45 g. L⁻¹) como fonte de carbono, assim como os meios MD-glicose suplementados com furfural (3 g. L⁻¹) e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar (30%) não foram apresentados por não terem demonstrado resultados positivos para o objetivo proposto por este trabalho.

4.2.21. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais do extrato celular resultante de cultivos fermentativos foi feita por método colorimétrico com o kit comercial *BCA protein assay* (Thermo Fisher Scientific). Conforme instruções do fabricante, as amostras para construção da curva padrão foram preparadas com albumina sérica bovina (BSA) em concentrações variando de 0,05 a 2 mg da proteína (estoque 2 mg. mL⁻¹). O volume de 25 µL de amostra previamente diluída e os pontos da curva padrão foram transferidos para a microplaca e adicionados de 200 µL do reagente de trabalho (50 partes do reagente A e 1 parte do reagente B). Posteriormente, as amostras foram incubadas a durante 30 minutos a 37 °C e, após o período de incubação, foi feita a leitura de absorvância a 562 nm.

4.2.22. Determinação de atividade enzimática

Uma unidade de atividade enzimática (1 U) é a quantidade de enzima que catalisa a conversão de um μmol do substrato por minuto, nas condições de um determinado ensaio. Então, para se determinar a atividade de uma enzima, deve-se normalizar a velocidade da reação catalisada (em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) pela quantidade de enzima utilizada na reação catalítica (p. ex. mg, mL, mol). Para determinar a atividade enzimática das enzimas redutases, potencialmente codificada pelos genes YJR096W e YNL134C, as linhagens de *K. phaffii* controle e superexpressando os genes supracitados cresceram durante 48 horas a 30 °C e 200 rpm em tubo tipo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio YPD. Posteriormente, as células foram centrifugadas por 20 minutos, a 4 °C e 10000 rpm, foi descartado o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado com o reagente Y-PER (Pierce, Rockford, IL, EUA), segundo as instruções do fabricante. A este protocolo, foi adicionada mais uma etapa de lise celular utilizando microesferas (*beads*). Após a ressuspensão com o Y-PER, foram adicionadas *beads* 1 mm, na proporção de 1/3 do volume líquido, seguido de agitação em velocidade, por 4 minutos, em disruptor de células. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 5000 rpm, o *pellet* e as *beads* foram descartados e o lisado celular, armazenado a 4 °C até a realização do ensaio enzimático. Os experimentos para determinação de atividade enzimática de redutase foram realizados pela monitorização da redução dos cofatores, NADH e NADPH, fotometricamente a 340 nm, em cubetas de 1,0 cm³, a 30 °C (Almeida et al., 2008). Os ensaios foram performados com 10,0 mM de cofator, sendo iniciado pela adição de HMF 0,1 M em tampão fosfato de potássio 250 mM, pH 7,0. As atividades enzimáticas foram medidas após adição de 50, 100 e 200 μL de extrato celular. Através do software *Softmax Pro 7*, as curvas de parâmetros cinéticos foram construídas e os valores de atividade enzimática específica (mU/mg) foram calculados. O coeficiente de absorção molar, ϵ_{340} , foi de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ para NADH e NADPH.

4.2.23. Análise e quantificação de metabólitos por HPLC

Amostras retiradas dos cultivos fermentativos foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) para quantificação dos compostos glicose, furfural e HMF. Foi empregado O sistema HPLC *Infinity* (*Agilent Technologies*), equipado com detector de Índice de Refração (RID) e coluna HPX 87H (*Bio-Rad Laboratories*). As corridas

foram realizadas em fase móvel de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 5 mM, fluxo de 0,6 mL min^{-1} e temperatura de 45 °C. Os compostos HMF e furfural também foram analisados do detector *Photodiode Array* (PDA), na mesma coluna. As concentrações foram determinadas por comparação com o espectro obtido pela curva padrão gerada pelo software do equipamento.

5. Resultados e discussão

5.1. Seleção de genes candidatos

K. phaffii demonstrou a capacidade de remodelação da expressão gênica quando cultivada na presença de concentrações diferentes de ácido acético, furaldeídos e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar (Paes et al., 2021). Centenas de genes tiveram a sua expressão aumentada e puderam ser agrupados em diferentes categorias ontológicas (*Gene Ontology Categories* – GO). Nesse trabalho, seis genes previamente identificados com expressão diferencial na presença de inibidores foram escolhidos para serem superexpressos em *K. phaffii*.

O gene SAP30 codifica uma subunidade do complexo de desacetilação de histona, responsável pela retirada de grupamentos acetil das histonas ao longo de regiões codantes, tendo envolvimento na regulação da transcrição e silenciamento de cromatina (Zhang et al., 1998), tendo sido superexpresso em todas as seis condições de cultivo testadas em Paes et al., 2021. Como a resposta de *K. phaffii* aos inibidores envolve uma modulação poligenética, já tendo sido demonstrado que fatores de transcrição são alvos para a melhoria de desempenho da levedura *S. cerevisiae* a inibidores, decidiu-se por superexpressar o gene SAP30 em *K. phaffii*.

As sequências proteicas codificadas pelos genes YJR096W e YDL124W apresentam domínios conservados de membros da família de aldo-ceto redutases, tendo sido reportada, em *S. cerevisiae*, função de xilose/arabinose redutase (Träff et al., 2002; Chang et al., 2007). Além disso, em *Pichia stipitis*, foi demonstrada a atuação de uma xilose redutase na detoxificação de HMF através da sua redução em FDM. Por isso, acredita-se que as enzimas potencialmente codificadas pelos genes YJR096W e YDL124W possam desempenhar esse mesmo papel em *K. phaffii*.

O gene YNL134C, em *S. cerevisiae* codifica uma proteína com atividade de aldeído redutase dependente de NADH, envolvido na desintoxicação de furfural derivado dos processos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (Zhao et al., 2015).

Também em *S. cerevisiae*, o gene FLR1 codifica um transportador de membrana plasmática da superfamília de facilitadores principais. Por estar envolvido no efluxo de fluconazol, diazaborina, benomil, metotrexato e outras drogas (Alarco et al.,

1997), acredita-se que o FLR1 possa estar envolvido nos eventos celulares de expulsão de inibidores celulares. Por fim, o gene 2661, em *K. phaffii*, estaria envolvido com as categorias ontológicas de transporte de íons, transporte de cátions, transporte transmembrana, transporte de íons metálicos e localização (De Schutter et al., 2009), hipoteticamente envolvido no efluxo de cargas positivas.

5.2. Amplificação dos genes candidatos por PCR

Os genes YJR096W, YDL124W, SAP30, FLR1, 2661 e YNL134C foram amplificados a partir do DNA genômico de *K. phaffii* X33, por PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos (Tabela 4). A confirmação dos amplicons foi demonstrada pelo aparecimento, em gel de agarose, de bandas de DNA nos tamanhos de fragmentos esperados para cada um dos genes: 846 pb (YJR096W), 900 pb (YDL124W), 477 pb (SAP30), 1641pb (FLR1), 1815 pb (2661) e 1134 pb (YNL134C) (Figura 11).

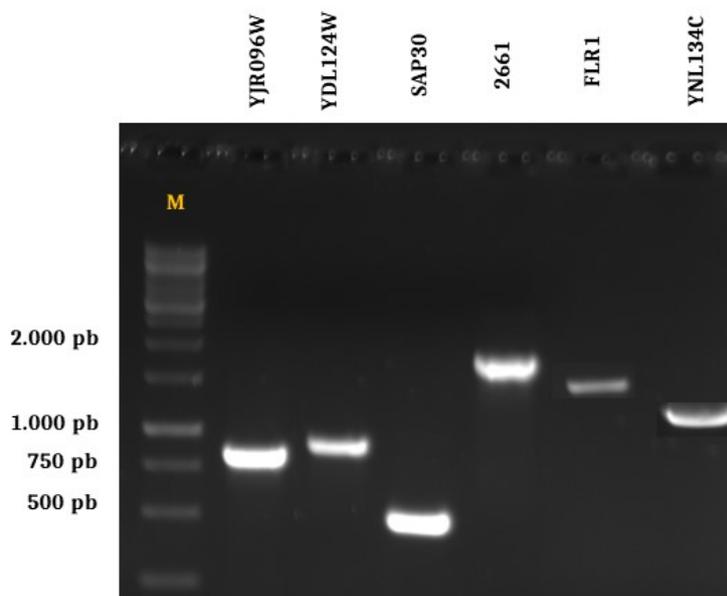


Figura 11: Análise eletroforética, em gel de agarose 0,8%, da PCR dos genes YJR096W, YDL124W, SAP30, FLR1, 2661 e YNL134C. M: marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

5.3. Clonagem dos genes de interesse no vetor de expressão pKLD

A etapa de clonagem foi iniciada com a subclonagem dos genes de interesse no vetor pGEM®-T Easy. Os plasmídeos resultantes foram digeridos com enzimas BamHI/NotI e SpeI/NotI, a depender do gene, a fim de confirmar a inserção, sendo esperados fragmentos de tamanhos iguais aos que foram clonados (Tabela 5). Apesar de

o pGEM®-T Easy apresentar sítios de restrição para as enzimas utilizadas para digestão dos insertos, esses sítios encontram-se muito próximos às extremidades dos genes que também os contêm, não sendo capazes de liberar fragmentos que podem ser visualizados. Análise eletroforética em gel de agarose demonstrou a presença de bandas de DNA nos tamanhos esperados (Figura 12).

Após a confirmação da clonagem no vetor pGEM®-T Easy, iniciaram-se as tentativas de clonagem dos genes no vetor de expressão pKLD. Para tanto, os plasmídeos clonados com os genes YDL124W, SAP30, 2661 e YNL134C foram digeridos com as enzimas BamHI e NotI, e com SpeI/NotI para YJR096W e FLR1. Os fragmentos liberados foram excisados do gel, purificados e ligados ao vetor pKLD previamente digerido com as mesmas enzimas BamHI/NotI ou SpeI/NotI.

Como não houve crescimento de colônias após transformação bacteriana com o sistema de ligação, novas tentativas de clonagem foram realizadas empregando-se diferentes parâmetros da metodologia do sistema de ligação. Foram testados variação de razão molar entre vetor e inserto, temperatura e tempo de incubação, preparo de reagentes novos, mas nenhum deles resultou no crescimento de colônias bacterianas. Portanto, buscou-se o desenho de uma nova estratégia para a clonagem dos genes no vetor de expressão.

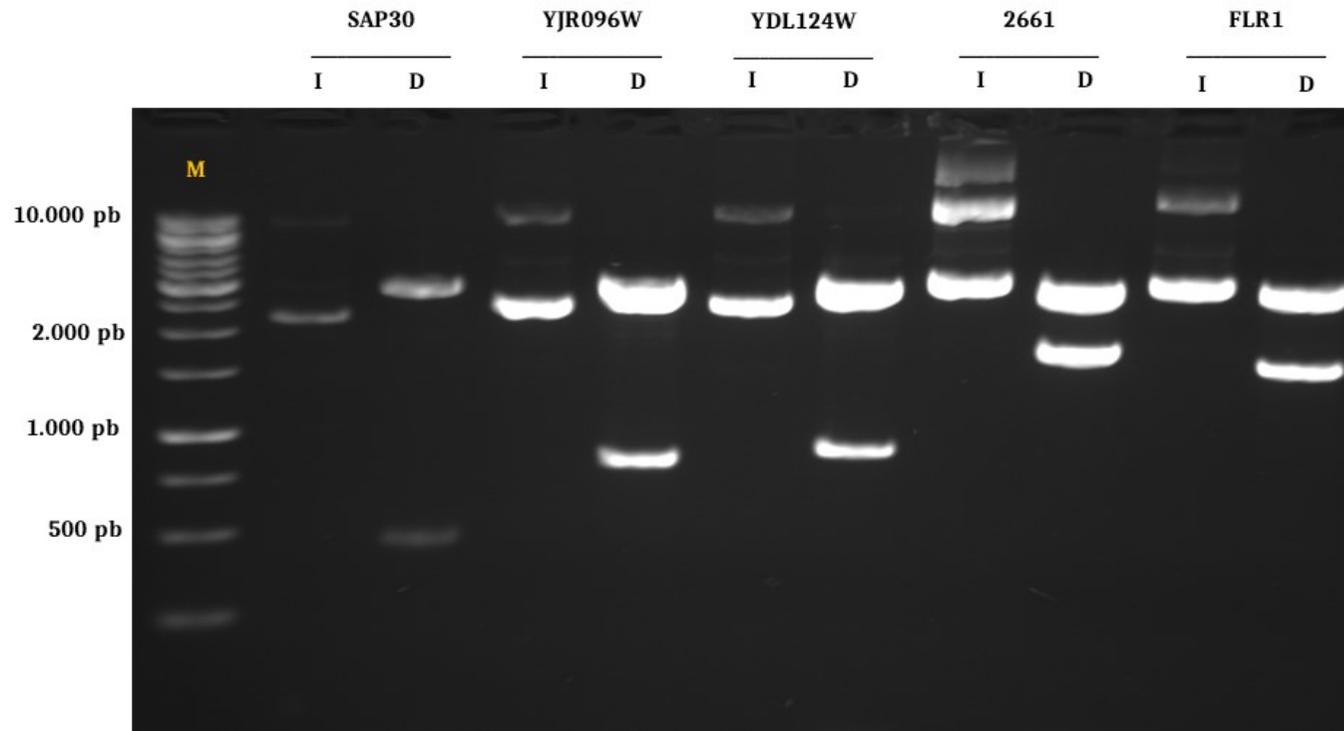


Figura 12: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% que confirma a liberação de insertos nos tamanhos esperados para cada um dos genes clonados no vetor pGEM®-T Easy. O DNA plasmidial foi digerido com as enzimas BamHI e NotI para os genes YDL124W, SAP30 e 2661 e SpeI e NotI para YJR096W e FLR1. I: plasmídeo intacto. D: plasmídeo digerido. M: marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Como as alterações de metodologia não resultaram em clonagens bem sucedidas, foi levantada a hipótese de que o obstáculo para as clonagens estaria nos sítios de restrição utilizados, mais especificamente no sítio de NotI, presente na extremidade 3' de todos os genes. Dessa forma, a nova estratégia contava com a digestão do vetor pKLD-XD apenas com a enzima SpeI, que o tornaria linear, assim como a dos genes YJR096W e FLR1, os únicos que poderiam ser digeridos do vetor pGEM®-T Easy utilizando apenas SpeI, já que apresentariam sítio de restrição para essa enzima nas duas extremidades (Figura 13). O da região 5' teria sido adicionado pelos oligonucleotídeos utilizados na PCR (Tabela 4), enquanto o sítio de restrição da extremidade 3' já se encontrava no vetor pGEM®-T Easy.

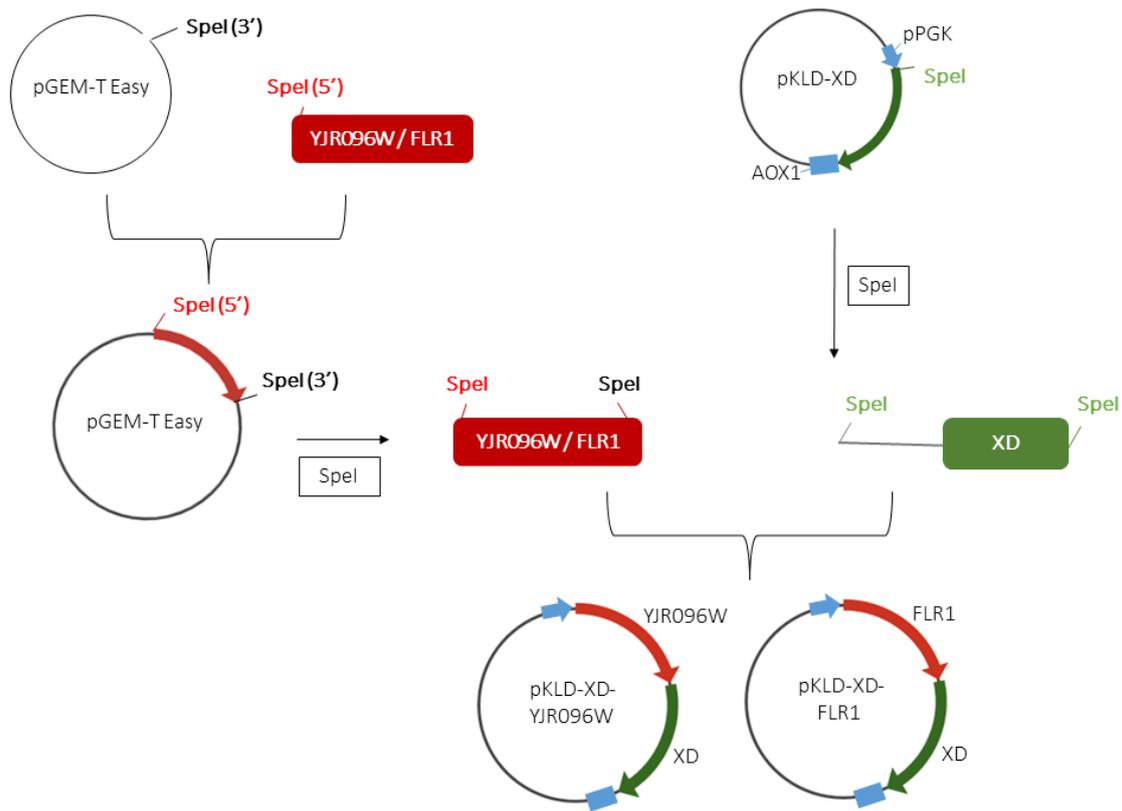


Figura 13: Representação esquemática da estratégia de clonagem dos genes YJR096W e FLR1, inicialmente inseridos no vetor pGEM®-T Easy, seguida de restrição enzimática por SpeI e clonagem no vetor de expressão pKLD-XD, resultando na construção dos vetores pKLD-XD-YJR096W e pKLD-XD-FLR1.

Assim, o pKLD-XD foi linearizado com SpeI, sendo o fragmento de DNA esperado de 6563 pb (Figura 14). Os insertos referentes aos genes YJR096W e FLR1 deveriam ser obtidos pela digestão do vetor pGEM®-T Easy com SpeI, caso os mesmos tivessem sido clonados na orientação correta, sendo esperados os fragmentos de 900 pb e 1640 pb, para os genes YJR096W e FLR1, respectivamente. Isso aconteceu para o gene YJR096W, enquanto o vetor pGEM-T-FLR1 foi apenas linearizado, indicando que o sítio de restrição SpeI contido no plasmídeo e o inserido no gene estavam na mesma orientação (Figura 14).

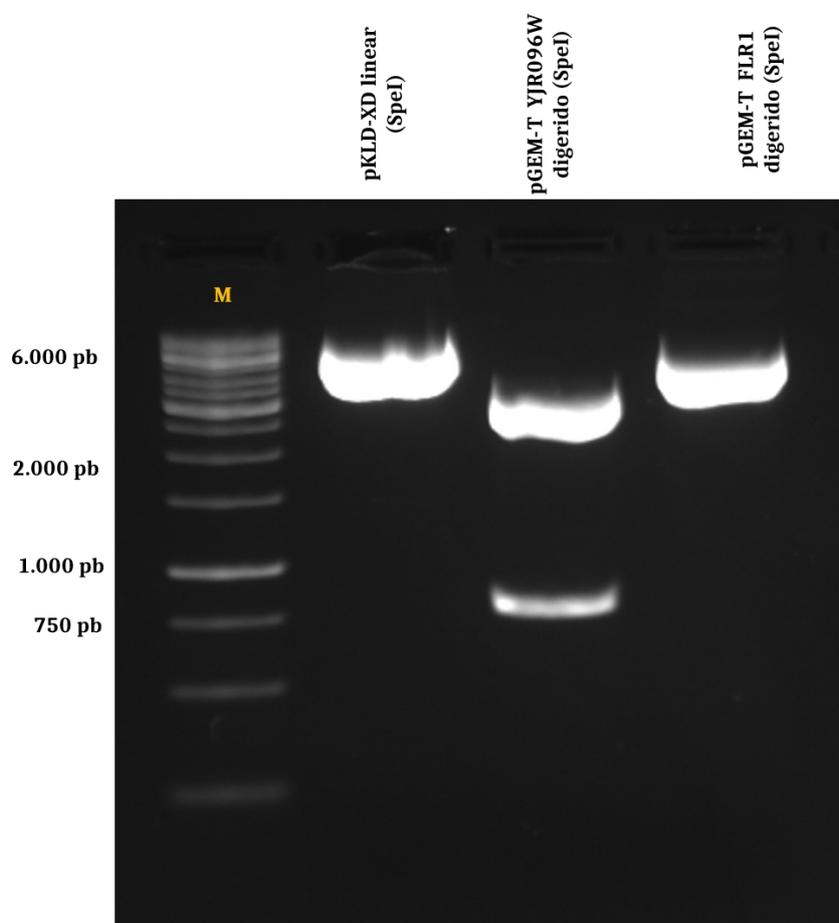


Figura 14: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% da linearização do vetor pKLD-XD e digestão do pGEM®-T Easy clonado com os genes YJR096W e FLR1, com a enzima SpeI.

M: marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Após a confirmação das digestões com SpeI, o vetor pKLD-XD linear e o fragmento de YJR096W foram excisados do gel e purificados. Um novo sistema de ligação foi preparado, originando o vetor pKLD-XD-YJR096W (Figura 13). Após eletroporação de *E. coli* com esse vetor, colônias transformantes foram obtidas em meio LB *low salt* e tiveram seu DNA plasmidial extraído. O pKLD-XD-YJR096W foi digerido com as enzimas BamHI/Sall e com SpeI a fim de confirmar a inserção do gene YJR096W. A dupla digestão deveria liberar 3 fragmentos caso o gene tivesse sido clonado na orientação correta: i) 200 pb (entre os sítios de BamHI); ii) 2478 pb (entre o sítio interno de BamHI e o de Sall) e iii) 4759 pb (o restante do vetor) (Figura 15). Enquanto isso, a digestão apenas com SpeI deveria liberar um fragmento de 846 pb, correspondente ao YJR096W clonado, e outro equivalente ao restante do vetor, com 6591 pb. (Figura 15). Todos esses fragmentos de DNA com os tamanhos esperados foram observados em gel de agarose, indicando que o gene YJR096W foi clonado corretamente (Figura 16).

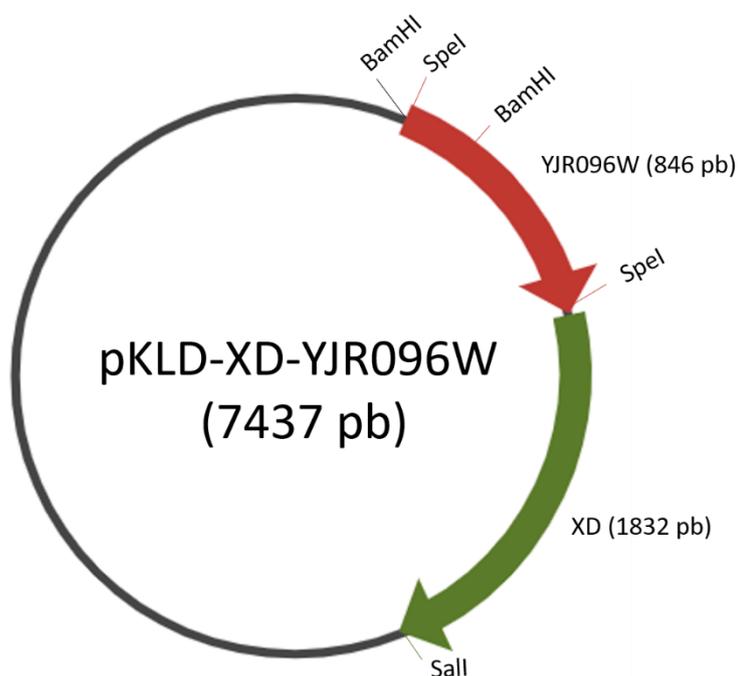


Figura 15: Representação resumida do vetor pKLD-XD-YJR096W. Na dupla digestão BamHI/Sall, o primeiro fragmento de DNA liberado é o entre os sítios de BamHI, de 200 pb. Os 1832 pb do gene XD somado aos 646 pb restantes do gene YJR096W, somam os 2478 pb do segundo fragmento. O último deles é o restante do vetor, com 4759 pb. Na digestão com SpeI, espera-se o tamanho do gene YJR096W íntegro, de 846 pb, e o restante do vetor digerido, com 6591 pb.

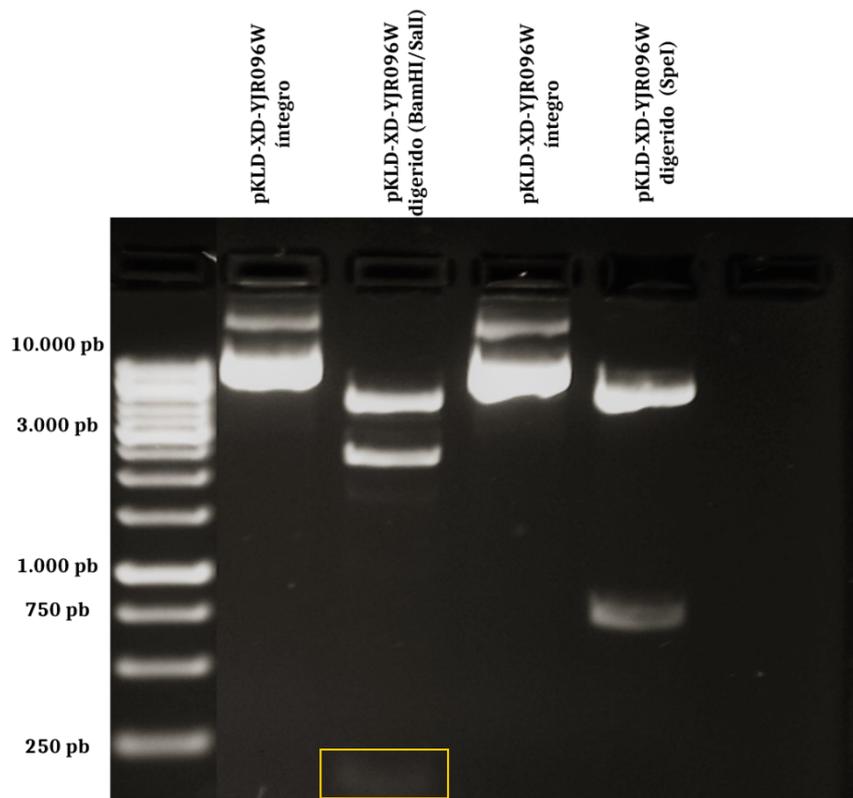


Figura 16: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% que confirma a presença dos fragmentos de DNA nos tamanhos esperados após digestão do vetor pKLD-XD-YJR096W com as enzimas BamHI/SalI e SpeI. Da dupla digestão, eram esperadas bandas nos tamanhos 4759, 2478 e 200 pb (retângulo amarelo). Para a digestão com SpeI, eram esperadas bandas de DNA de 6591 e 846 pb. M: marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Como o plasmídeo obtido ainda continha o gene XD clonado, procedeu-se com a sua retirada. Foi realizada digestão com a enzima NotI, uma vez que o gene XD é flanqueado por sítios de restrição para essa enzima, diferente do gene YJR096W, que permaneceria ligado ao vetor pKLD. Era esperado a liberação de um fragmento de 1832 pb, que foi confirmado em análise eletroforética (Figura 17).

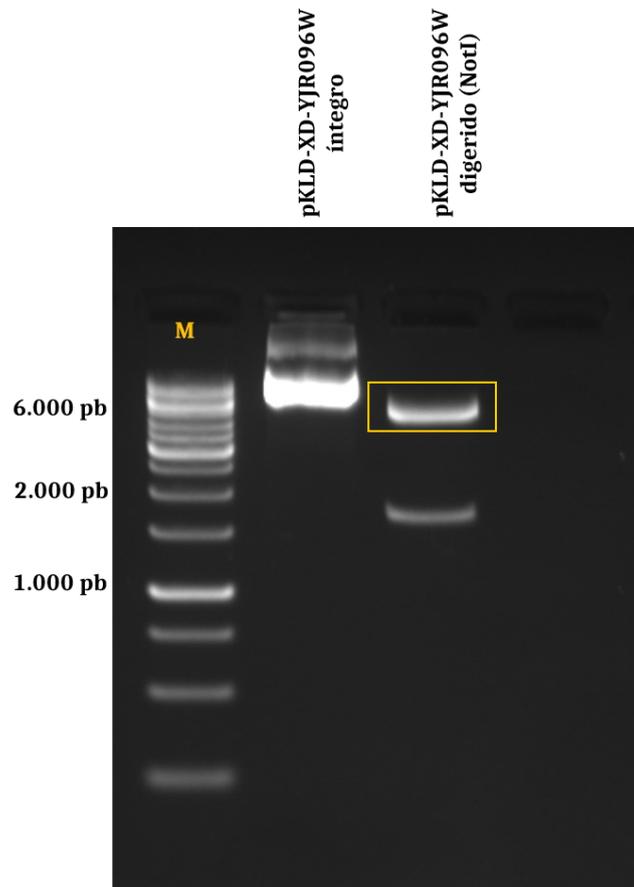


Figura 17: Análise eletroforética em gel de agarose 0.8% da digestão do vetor pKLD-XD-YJR096W por NotI, com a liberação do fragmento do gene XD (1832 pb) e do vetor pKLD-YJR096W, de 5605 pb (retângulo amarelo). M: marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Após a retirada de XD, o vetor pKLD-YJR096W foi excisado do gel, purificado, e recircularizado para que pudesse transformar *E. coli* por eletroporação. Novamente, colônias transformantes foram crescidas em meio LB *low salt* e tiveram seu DNA plasmidial extraído. O DNA plasmidial foi concentrado, precipitado e purificado para as etapas de transformação da levedura.

Após diversas tentativas, e com as alterações metodológicas supracitadas, apenas os vetores pKLD-YJ096W e pKLD-YNL134C foram construídos, esse último por outra colaboradora do grupo, envolvida no mesmo projeto, Livia Teixeira Brandão Duarte, e sequenciados pela empresa Clinilab – Laboratório de Diagnóstico Veterinário – que confirmaram a clonagem dos genes YJR096W e YNL134C.

5.4. Transformação de *K. phaffii*

Após o protocolo de purificação de DNA plasmidial por precipitação, linhagens de *K. phaffii* foram transformadas, por eletroporação, com os vetores pKLD vazio (controle negativo), pKLD-YJR096W e pKLD-YNL134C. As colônias transformantes da linhagem M12 foram selecionadas em meio MD-glicose sem aminoácidos. Porém, por tratar-se de uma linhagem auxotrófica, um maior tempo de crescimento das colônias era requerido e, por isso, optou-se por prosseguir os experimentos com a linhagem prototrófica X33, selecionadas em meio contendo o antibiótico G418. Buscou-se, então, confirmar a integração do cassete de expressão no genoma da levedura. Para tanto, uma pequena parte das colônias recombinantes foi utilizada para realizar a PCR de colônia a fim de confirmar a integração dos genes plasmidiais no genoma da levedura. Por isso, foram utilizados os oligonucleotídeos pPGK-pKLD *forward* e o 3'AOX1 *reverse* (Tabela 4). A escolha desse par de *primers* para ser usado nas reações de PCR de colônia permitem a confirmação de que os genes YJR096W e YNL134C amplificados advinham dos vetores pKLD-YJR096W e pKLD-YNL134C, respectivamente, e não dos genes inatos do genoma da levedura. A análise eletroforética por gel de agarose confirmou a presença de bandas próximas aos 1080 pb para YJR096W e 1389 pb para YNL134C (Figura 18), indicando que as transformações foram bem sucedidas.

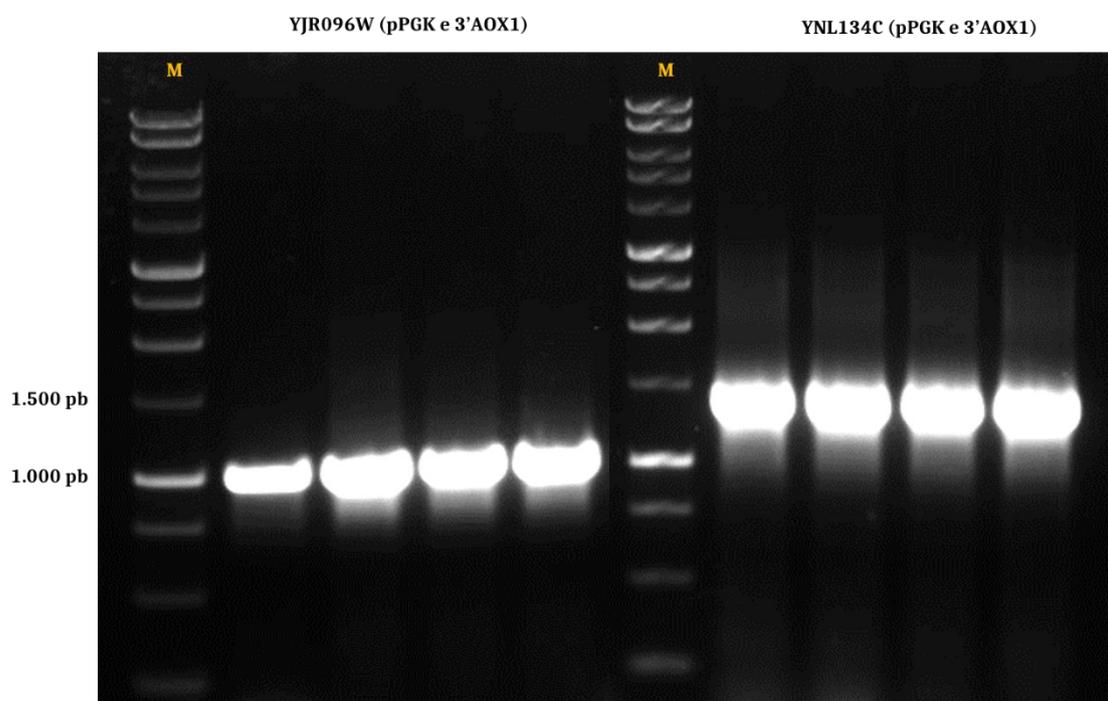


Figura 18: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% confirmando a presença de fragmentos de DNA nos tamanhos esperados para os genes YJR096W (1080 pb) e YNL134C (1389 pb), amplificado a partir do genoma das *K. phaffii* recombinantes. As bandas representam quadriplicatas biológicas. M: marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

5.5. Efeito da superexpressão dos genes YJR096W e YNL134C em *K. phaffii*

A fim de avaliar a cinética de crescimento das leveduras quando cultivadas na presença de inibidores, as linhagens controle (transformada com o vetor pKLD vazio), X33 pKLD-YJR096W e X33 pKLD-YNL134C foram cultivadas em microplaca de 48 poços. Nas duas últimas linhagens citadas, foram testados três clones distintos, em triplicata técnica. As leveduras foram cultivadas nos seguintes meios de cultura distintos: MD-glicose, MD-glicose suplementado de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar 30%, furfural 3 g. L⁻¹ e HMF 2 g. L⁻¹.

Os dados de crescimento celular foram avaliados através da leitura de OD_{600nm} durante 96 horas (Figura 19). Na figura 19A, é mostrado o perfil idêntico de crescimento das leveduras em meio contendo apenas glicose, alcançando a fase estacionária após 24 horas de cultivo, com OD_{600nm} máxima de ~2,5.

Nos meios de cultivo adicionados de hidrolisado lignocelulósico 30% (Figura 19B), nenhuma das três linhagens apresentou crescimento, indicando que o metabolismo celular foi completamente inibido pelos inibidores ali presentes. Como a concentração de HMF presente no hidrolisado lignocelulósico (0, 51 g. L⁻¹) é menor do que as testadas nesse estudo (2 e 3,5 g. L⁻¹), acredita-se que a inibição do crescimento das leveduras tenha sido causada pelos efeitos tóxicos de outros inibidores do hidrolisado, como o ácido acético (19 g. L⁻¹), por exemplo. E uma vez que os genes YJR096W e YNL134C potencialmente codificam enzimas do tipo redutase, essas não teriam ação detoxificante eficiente sobre o ácido acético, mas sim sobre os furaldeídos.

Na presença do furfural (Figura 19C), as três linhagens de *K. phaffii* apresentaram perfis de crescimento muito similares, com fase *lag* prolongada até ~ 40 horas de cultivo e atingindo a fase estacionária após 70 horas. Esses resultados indicam que a expressão gênica positivamente regulada nem sempre está diretamente relacionada a um fenótipo de tolerância, já que a levedura controle demonstrou capacidade inata de crescer na presença do furfural.

Já no meio adicionado de HMF (Figura 19D), apesar de alcançarem OD_{600nm} máximas muito similares ao final das 96 horas totais de cultivo, a linhagem recombinante superexpressando YNL134C apresentou um tempo de fase *lag* 18 horas menor do que o da levedura controle, enquanto a superexpressando YJR096W, tempo de 8 horas menor. Por esses resultados, foi possível confirmar que a expressão

diferencial dos genes YDL134C e YJR096W tem, de fato, alguma implicação positiva no metabolismo da levedura e que resulta em uma melhor resposta à presença do HMF. Já havia sido demonstrado, em outras leveduras, que genes codificadores de enzimas que atuam na redução do HMF em seus componentes menos tóxicos permitem que a fase *lag* seja reduzida (Soares et al., 2021).

Esse experimento em microescala foi conduzido para que se pudesse observar o perfil de crescimento, nos diferentes meios de cultura, dos clones testados para cada uma das linhagens construídas e escolher os que apresentaram menor tempo de fase *lag* e que foram capazes de alcançar maiores densidades óticas, quando comparadas ao controle, para serem testados em maior volume de meio de cultura adicionado de HMF.

Conforme mencionado, os experimentos foram realizados em microplaca de 48 poços, num volume final de 300 μ L, a 30 °C por 96 horas. O método de leitura de absorbância por microplaca, naturalmente, apresenta algumas limitações, como a má distribuição das leveduras no poço, pelo fato de a agitação da placa não ser suficiente para homogeneizar as amostras. Pelos altos valores do desvio padrão calculados para as triplicatas biológicas das linhagens de *K. phaffii* em estudo, acredita-se que, ao longo do tempo total de cultivo, tenha havido variação do volume de reação por razão do fenômeno de condensação, em que parte do volume do meio de cultura teria evaporado e se condensado na tampa da microplaca. Tais alterações momentâneas de volume justificariam as oscilações abruptas de OD_{600nm} entre as replicatas.

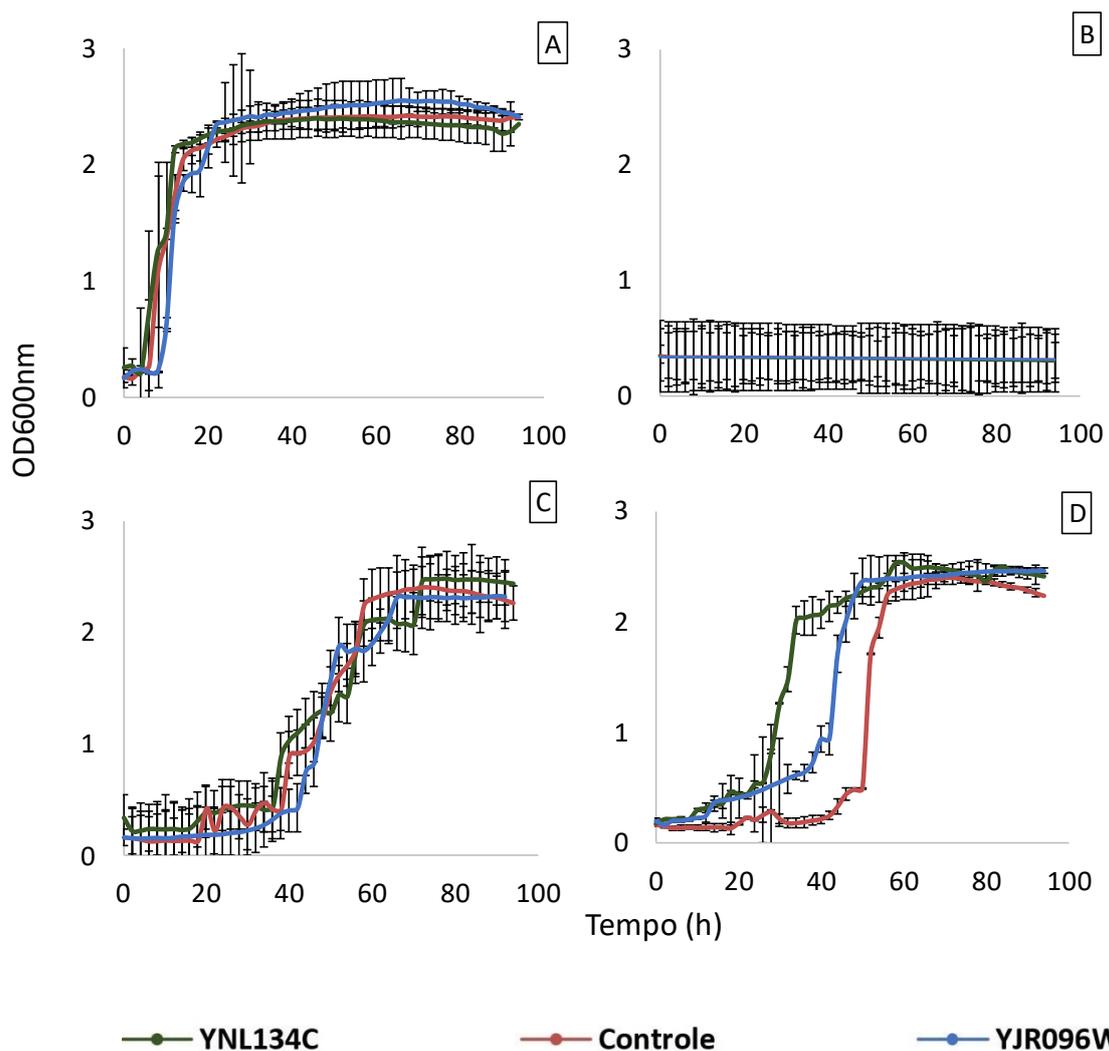


Figura 19: Perfil de crescimento de *K. phaffii* X33 controle (rosa), X33 pKLD-YJR096W (azul) e pKLD-YNL134C (verde) cultivadas em microplaca de 48 poços em (A): meio MD-glicose 45 g.L⁻¹; (B) meio MD-glicose + hidrolisado de bagaço de cana de açúcar 30%; (C): MD-glicose + furfural 3 g.L⁻¹ e (D): MD-glicose + HMF 2 g.L⁻¹.

5.6. Perfil de crescimento e conversão de HMF pelas linhagens de *K. phaffii* X33 pKLD-YJR096W e pKLD-YNL134C

A fim de avaliar o perfil de crescimento celular e metabolismo de HMF, as leveduras controle e superexpressando os genes YJR096W e YNL134C, foram cultivadas, em triplicata biológica, em frascos Erlenmeyer aletados, nos seguintes meios de cultura distintos: MD-glicose (45 g. L⁻¹), MD-glicose suplementado de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar 30%, furfural 3 g. L⁻¹ e HMF 2 g. L⁻¹. Pelos resultados obtidos nos experimentos em microplaca em que, na presença de hidrolisado lignocelulósico 30%, as leveduras não apresentaram qualquer crescimento celular e, na presença de furfural, não houve diferença significativa entre os perfis de crescimento das linhagens controle e superexpressando os genes YJR096W e YNL134C, serão apresentados nesse experimento apenas os dados referentes aos cultivos em MD-glicose e MD-glicose suplementado com HMF.

As leveduras foram inoculadas nos respectivos meios de cultura com OD_{600nm} inicial de 0,5 e cultivadas durante 72 horas. Em meio contendo apenas glicose, foi observado o perfil de crescimento celular idêntico das três linhagens, que atingem a fase estacionária após 48 horas e OD_{600nm} máxima de ~25 (Figura 20A). Entretanto, na presença de HMF, foi possível observar o seu efeito retardatório no crescimento celular da levedura (Figura 20B). Enquanto as leveduras X33-pKLD-YJR096W e pKLD-YNL134C deixaram a fase *lag* por volta das 7 horas de cultivo, a levedura controle só alcançou o mesmo patamar após 17 horas, próximo as 24 horas de cultivo. Além disso, ao final do experimento, as OD_{600nm} das leveduras X33 pKLD-YJ096W (17,78) e X33 pKLD-YNL134C (20,07) foram maiores do que a da levedura controle (15,24). As taxas específicas de crescimento celular (h⁻¹) foram calculadas para cada uma das três linhagens, considerando 48 horas de cultivo. (Tabela 7).

Como resultado, na presença de HMF, a superexpressão dos genes YJR096W e YNL134C em *K. phaffii*, que potencialmente codificam para enzimas do tipo redutase, possibilitou que as leveduras saíssem da fase *lag* mais brevemente e alcançassem maiores densidades óticas ao final do cultivo, quando comparadas ao controle.

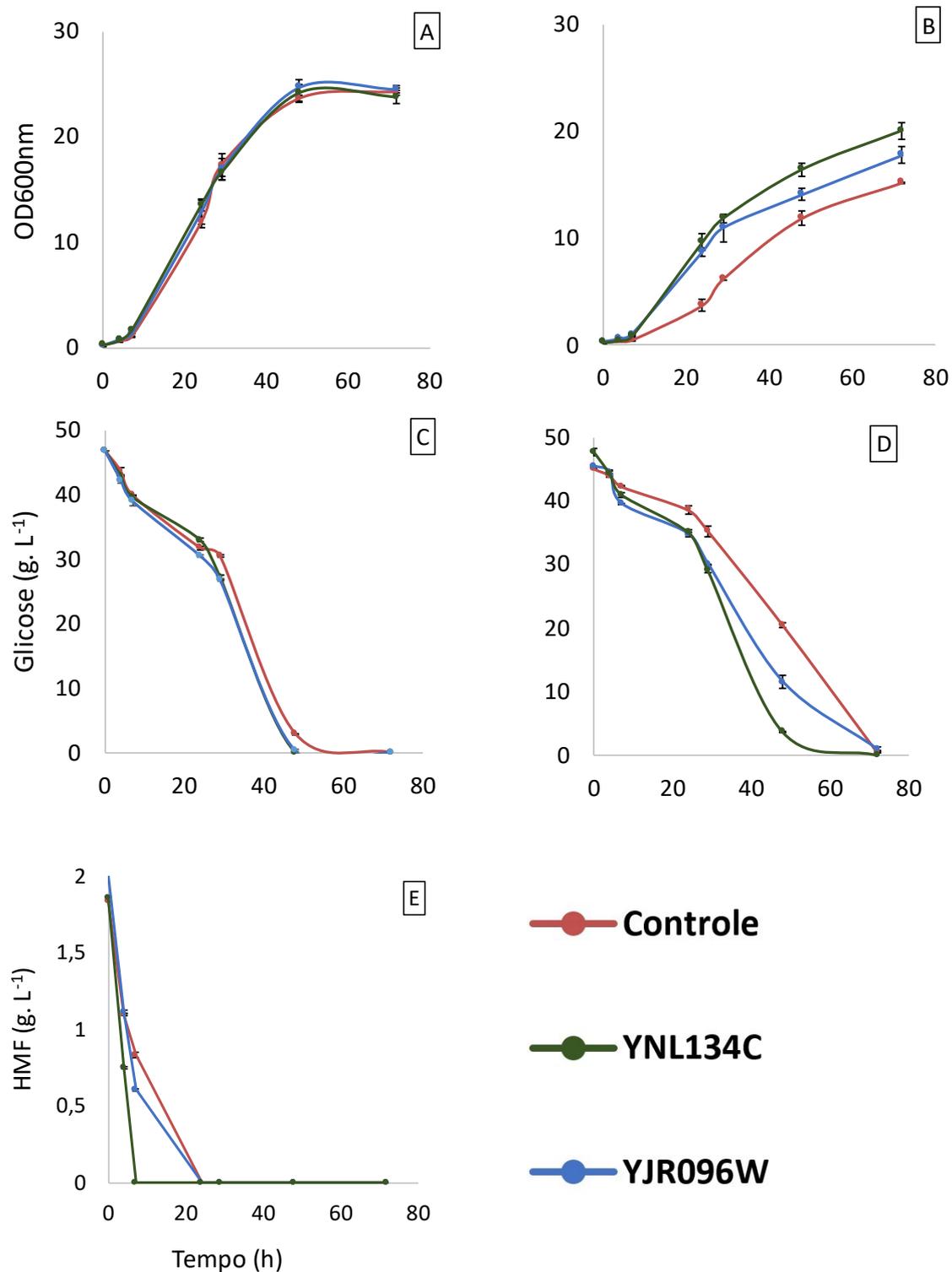


Figura 20: Perfil de crescimento de *K. phaffii* X33 controle (rosa), X33 pKLD-YJR096W (azul) e X33 pKLD-YNL134C (verde) cultivadas em frasco Erlenmeyer em (A): meio MD-glicose 45 g L⁻¹; (B): MD-glicose + HMF 2 g L⁻¹; (C): Consumo de glicose no meio MD-glicose; (D): Consumo de glicose no meio MD-glicose + HMF 2 g L⁻¹; (E) Conversão de HMF 2 g L⁻¹.

Tabela 7: Taxa específica de crescimento celular, consumo de glicose em 48 horas e conversão de HMF em 7 horas de cultivo, em frasco Erlenmeyer, pelas leveduras *K. phaffii* recombinantes na presença inicial de 45 g. L⁻¹ de glicose e 2 g. L⁻¹ de HMF.

Linhagem	Consumo de glicose (g. L⁻¹)	Conversão de HMF (g. L⁻¹)	Taxa específica de crescimento (h⁻¹)
X33 pKLD	24.59 ± 0.43	1.01 ± 0.02	0.12 ± 0.004
X33 pKLD-YNL134C	44.04 ± 0.58	1.87 ± 0.01	0.15 ± 0.001
X33 pKLD- YJR096W	33.9 ± 0.23	1.29 ± 0.02	0.13 ± 0.002

As concentrações de glicose e HMF dos cultivos realizados na presença desse inibidor, para as leveduras controle e superexpressando os genes YJR096W e YNL134C, foram medidas em HPLC. A Figura 20C mostra o perfil de consumo de glicose muito similar pelas três linhagens de *K. phaffii* ao longo de 72 horas de cultivo, completamente consumido por volta de 48 horas. Já na presença do HMF, nesse mesmo tempo de cultivo, o consumo de glicose pela levedura X33 pKLD-YJR096W foi 1,38 vezes maior que na da levedura controle e 1,8 vezes maior em X33 pKLD-YNL134C (Figura 20D), demonstrando, novamente, que a superexpressão de tais genes atuam no aumento da tolerância da levedura à presença do HMF.

Na presença desse inibidor, enquanto a levedura controle levou 24 horas para converter todo o HMF em seu álcool menos tóxico (FDM), a superexpressão do gene YNL134C fez com que essa conversão fosse 3,43 vezes mais rápida, em apenas 7 horas de cultivo (Figura 20E). Na levedura superexpressando YJR096W, a conversão de HMF também foi maior do que na controle, nas primeiras 7 horas de cultivo (Tabela 7). Os resultados apresentados revelam, portanto, que *K. phaffii* superexpressando os genes YNL134C e YJR096W apresentam maior perfil fenotípico de tolerância à presença do inibidor HMF, quando comparado ao controle. Na presença de vanilina (1 g. L⁻¹), outro inibidor do metabolismo microbiano, liberado na desconstrução da lignina, a superexpressão dos genes YJR096W e YNL134C, em *S. cerevisiae*, também foi capaz de aumentar, em até 18%, a taxa específica de crescimento, acelerar o consumo de

glicose e aumentar em 11% a produção de etanol, comparada ao controle (X. Wang et al., 2016). Na presença de furfural 20 mM, a levedura *S. cerevisiae* superexpressando o gene YNL134C, foi capaz de reduzir o furfural do meio de cultura 12 horas antes da levedura controle, o que não foi observado na presença de HMF (Zhao et al., 2015), demonstrando que *S. cerevisiae* e *K. phaffii*, mesmo superexpressando o mesmo gene, atuam preferencialmente sobre substratos distintos.

A fim de revalidar os resultados prévios que confirmaram o fenótipo de tolerância ao HMF nas leveduras superexpressando YJR096W e YNL134C, novos experimentos de cultivo foram realizados, mas agora testando-se uma maior concentração de HMF (3,5 g. L⁻¹). Seguindo a mesma metodologia do primeiro ensaio, as linhagens controle e as superexpressando os genes acima foram cultivadas, em triplicata biológica, em frascos aletados tipo Erlenmeyer de 250 mL, nos meios MD-glicose e MD-glicose adicionado de HMF (Figura 21). As leveduras foram inoculadas nos respectivos meios de cultura com OD_{600nm} inicial de 0,2 e cultivadas por 72 horas.

Novamente, em meio contendo apenas glicose, as três leveduras apresentaram perfil de crescimento idêntico, alcançando a fase estacionária após 48 horas e OD_{600nm} máxima de ~22 (Figura 21A). Na presença do HMF na concentração de 3,5 g. L⁻¹ (Figura 22B), o tempo de fase *lag* da levedura controle, prolongada por 24 horas, foi reduzido pela metade em X33 pKLD-YJR096W e pKLD-YNL134C (12 horas), confirmando os resultados anteriores de que a expressão diferencial desses genes tem impacto positivo no aumento da tolerância ao HMF. Apesar de, ao final das 72 horas de cultivo, as leveduras terem alcançado praticamente a mesma OD_{600nm}, as taxas específicas de crescimento celular de *K. phaffii* expressando os genes YNL134C e YJR096W ainda são maiores do que a taxa de crescimento da levedura controle (Tabela 8). Tais valores são menores dos que os encontrados para os ensaios na presença de HMF em menor concentração no meio de cultivo (2 g. L⁻¹), comprovando que os efeitos inibitórios do HMF são dose-dependentes, em que, quanto maior a concentração do inibidor, maior será o seu efeito sobre o crescimento microbiano.

O consumo de glicose pelas três leveduras permanece bastante similar na ausência do inibidor, tendo sido completamente consumida por volta das 48 horas de cultivo (Figura 21C). Já na presença de HMF, é possível observar que as linhagens de X33 pKLD-YJR096W e pKLD-YNL134C começam a depletar o açúcar por volta das

24 horas de cultivo, enquanto a levedura controle demora mais 12 horas para alcançar esse feito, após 36 horas de cultivo (Figura 21D), o que explica a sua menor taxa específica de crescimento (Tabela 8). Enquanto, por volta das 36 horas de cultivo, as leveduras X33 pKLD-YJR096W e YNL134C já haviam convertido praticamente todo o HMF em FDM, a linhagem controle só alcançou esse feito 12 horas depois, após 48 horas de cultivo (Figura 21E). Esses resultados confirmam que a expressão dos genes supracitados, na presença de HMF, permite que as leveduras saiam da fase *lag*, iniciem o consumo e depleção de glicose e catalisem a reação de redução do HMF em compostos menos tóxicos, como o FDM, mais rapidamente do que a levedura que não superexpressa tais genes. Além disso, mais uma vez foi possível observar o efeito dose-dependente dos inibidores lignocelulósicos, em que maiores concentrações do inibidor foram capazes de diminuir as respostas de consumo de glicose e conversão do HMF pelas leveduras recombinantes quando comparadas ao experimento anterior.

Tabela 8: Taxa específica de crescimento celular, consumo de glicose em 48 horas e conversão de HMF em 36 horas de cultivo, em frasco Erlenmeyer, pelas leveduras *K. phaffii* recombinantes na presença inicial de 45 g. L⁻¹ de glicose e 3,5 g. L⁻¹ de HMF.

Linhagem	Consumo glicose (g. L⁻¹)	Conversão de HMF (g. L⁻¹)	Taxa específica de crescimento (h⁻¹)
X33 pKLD	21.55 ± 0.34	2.78 ± 0.012	0.09 ± 0.003
X33 pKLD- YJR096W	23.68 ± 0.27	3.18 ± 0.011	0.10 ± 0.001
X33 pKLD-YNL134C	29.34 ± 0.23	3.45 ± 0.004	0.11 ± 0.003

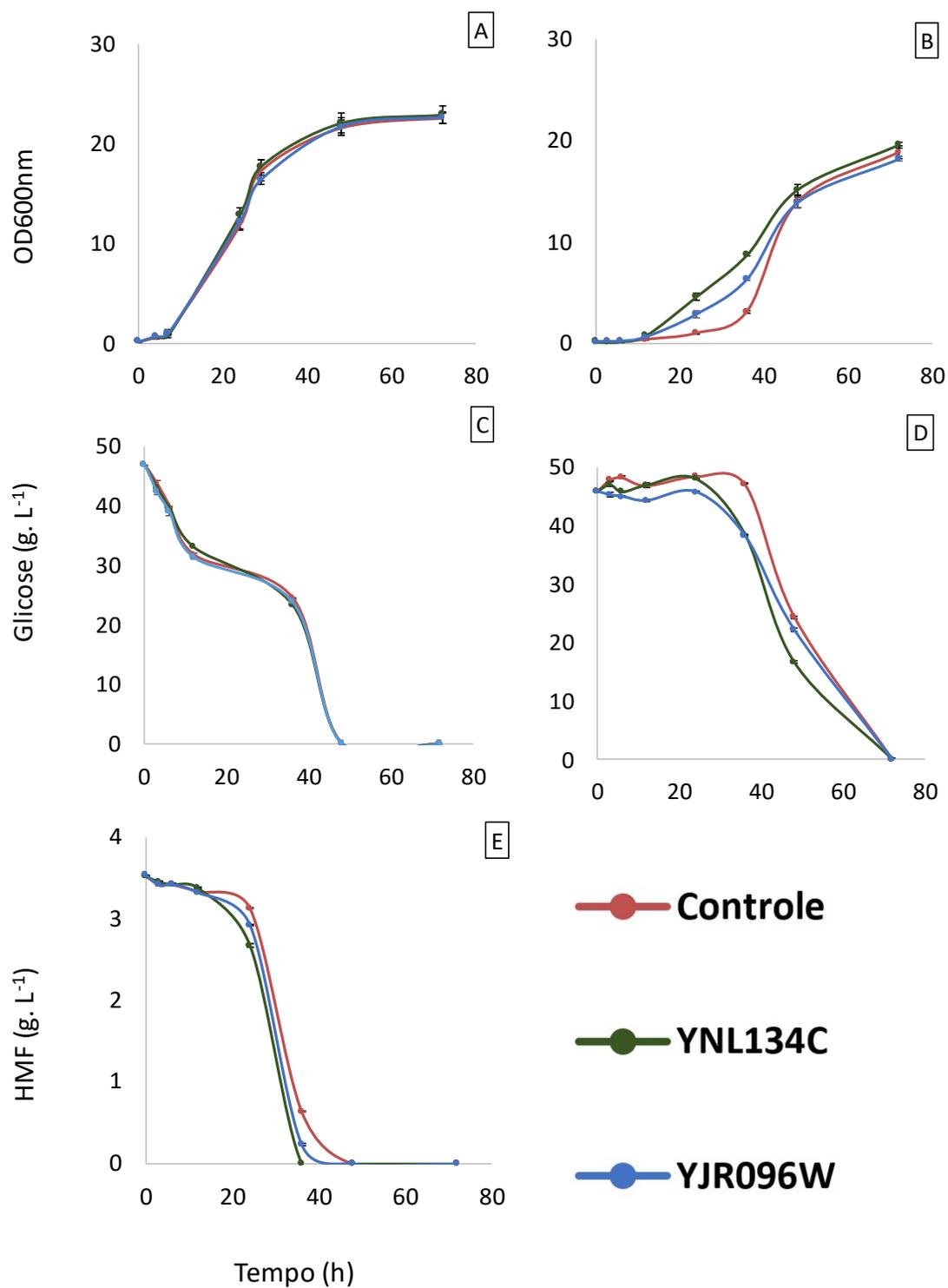


Figura 21: Perfil de crescimento de *K. phaffii* X33 controle (rosa), X33 pKLD-YJR096W (azul) e X33 pKLD-YNL134C (verde) cultivadas em frasco Erlenmeyer em (A): meio MD-glicose 45 g. L⁻¹; (B): MD-glicose + HMF 3,5 g. L⁻¹; (C): Consumo de glicose em meio MD-glicose; (D): Consumo de glicose em MD-glicose + HMF 3.5 g. L⁻¹; (E) Conversão de HMF 3,5 g. L⁻¹.

5.7. Ensaio de redutase em *K. phaffii* superexpressando os genes YJR096W e YNL134C

A fim de avaliar se a superexpressão dos genes YJR096W e YNL134C em maiores níveis de redução do HMF, foram realizados, *in vitro*, microensaios para determinação de atividade enzimática de redutase com o extrato celular bruto das leveduras controle, X33 pKLD-YJR096W e X33pKLD-YNL134C, cultivadas em meio YPD. Os ensaios foram realizados, pelo menos, em triplicata técnica, as atividades enzimáticas foram avaliadas na presença de NADH e NADPH como cofatores da reação e foram calculados os valores de atividade enzimática específica (um. mg⁻¹).

Tanto nos ensaios conduzidos na presença do NADH como cofator, quanto aqueles realizados com NADPH, a levedura controle demonstrou uma capacidade inata de reduzir o HMF em FDM (72,32 e 67,5 mU. mg⁻¹, respectivamente) (Figura 22).

A linhagem X33 pKLD-YNL134C apresentou atividades enzimáticas superiores às do controle nas reações de redução do HMF, tanto na presença do NADH (93,35 mU. mg⁻¹), quanto nos ensaios com NADPH (90, 21 mU. mg⁻¹) (Figura 22), o que não era esperado, considerando que, em *S. cerevisiae*, a aldeído redutase codificada pelo gene YNL134C não apresentou atividade enzimática de redutase quando o substrato testado foi HMF (Zhao et al., 2015). Apesar de revelarem uma tendência para o aumento da atividade de redutases que catalisam a conversão do HMF em FDM quando o gene YNL134C é superexpresso em *K. phaffii*, os resultados apresentados não são capazes de confirmar o aumento da tolerância da levedura ao HMF pela sua conversão em espécies menos tóxicas em virtude de o erro padrão calculado entre as triplicatas ser maior do que o aceitável, sendo necessário nova padronização para a realização do ensaio enzimático.

Já a superexpressão do gene YJR096W em *K. phaffii* não demonstrou atividade enzimática sobre o HMF, uma vez que, nos ensaios com NADH, o valor de atividade enzimática específica calculada foi de apenas 21,14 mU. mg⁻¹ e em NADPH, de 31, 70 mU. mg⁻¹, valores inferiores aos encontrados para a levedura controle (Figura 22). Tais resultados podem indicar que o gene YJR096W ou não codifica para uma enzima redutase, como em *S. cerevisiae* (Chang et al., 2007), ou que a sua atividade de xilose redutase esperada não atua sobre o substrato HMF, como demonstrado em Almeida et al.; (2008). Ainda, os resultados podem refletir uma limitação do método escolhido,

com a lise incompleta da parede celular, já que as três leveduras apresentaram baixíssimas concentrações de proteínas, quantificadas por método de proteína BCA (dados não mostrados). Por isso, é necessária a realização de novos ensaios enzimáticos, testando-se outros protocolos de lise celular e/ou concentrações de extrato celular para confirmar se o produto proteico do gene YJR096W atua enzimaticamente na redução do HMF.

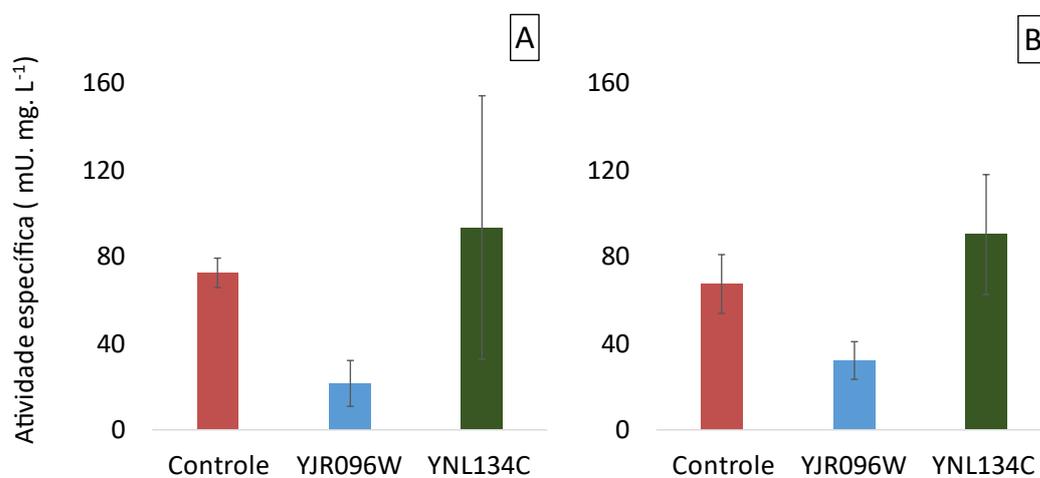


Figura 22: Determinação de atividade enzimática de redução de HMF em extratos celulares brutos das leveduras controle (rosa), X33-pKLD-YJR096W (azul) e X33-pKLD-YNL134C (verde), na presença dos cofatores NADH (A) e NADPH (B).

6. Conclusões

O presente trabalho foi o primeiro a avaliar e demonstrar os efeitos e respostas celulares de *K. phaffii* quando superexpressando os genes YJR096W e YNL134C, construídas nesse projeto, na presença de HMF, furfural e hidrolisado de bagaço de cana. As linhagens recombinantes expressando os genes de interesse foram capazes de alcançar maiores densidades celulares, apresentaram menor tempo de fase *lag*, maior consumo de glicose e conversão de HMF, quando comparadas à linhagem controle. Portanto, pode-se concluir que, nas condições de cultivo avaliadas nesse projeto, a superexpressão dos genes YJR096W e YNL134C conferiram à *K. phaffii* um fenótipo de tolerância à presença de inibidores lignocelulósicos, refletido nas maiores taxas específicas de crescimento celular, consumo de glicose e conversão de HMF em espécies químicas menos tóxicas para o metabolismo de *K. phaffii*.

7. Perspectivas

Uma vez que a superexpressão dos genes YJR096W e YNL134C em *K. phaffii* demonstrou resultados positivos para o aumento de tolerância da levedura ao HMF quando performados ensaios de cultivo em frascos Erlenmeyer, é necessária, inicialmente, a repetição dos ensaios de determinação enzimática para avaliação de atividade de redutase nos extratos brutos de *K. phaffii* superexpressando os genes YJR096W e YNL134C. Além disso, é necessário determinar os níveis de expressão dos genes supracitados, que também devem ter suas atividades avaliadas em outros inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico. Ademais, os genes YDL124W, SAP30, FLR1 e 2661, selecionados neste trabalho e potencialmente envolvidos nas respostas de tolerância de *K. phaffii* aos inibidores, também devem ser testados, assim como a avaliação das interações gênicas no aumento da expressão do fenótipo de tolerância, uma vez que os genes atuam de forma sinérgica.

8. Referências bibliográficas

- Adeboye, P. T., M. Bettiga, F. Aldaeus, P. T. Larsson, and L. Olsson, 2015, Catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid by *Saccharomyces cerevisiae* yields less toxic products: *Microbial Cell Factories*, v. 14, no. 1, p. 149, doi:10.1186/s12934-015-0338-x.
- Alarco, A.-M., I. Balan, D. Talibi, N. Mainville, and M. Raymond, 1997, AP1-mediated Multidrug Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* Requires FLR1 Encoding a Transporter of the Major Facilitator Superfamily: *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, no. 31, p. 19304–19313, doi:10.1074/jbc.272.31.19304.
- Almeida, J. R. M., M. Bertilsson, M. F. Gorwa-Grauslund, S. Gorsich, and G. Lidén, 2009, Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes: *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, no. 4, p. 625–638, doi:10.1007/s00253-009-1875-1.
- Almeida, J. R., T. Modig, A. Petersson, B. Hähn-Hägerdal, G. Lidén, and M. F. Gorwa-Grauslund, 2007, Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 82, no. 4, p. 340–349, doi:10.1002/jctb.1676.
- Almeida, J. R., T. Modig, A. Röder, G. Lidén, and M.-F. Gorwa-Grauslund, 2008, *Pichia stipitis* xylose reductase helps detoxifying lignocellulosic hydrolysate by reducing 5-hydroxymethyl-furfural (HMF): *Biotechnology for Biofuels*, v. 1, no. 1, p. 12, doi:10.1186/1754-6834-1-12.
- Ata, Ö., B. G. Ergün, P. Fickers, L. Heistering, D. Mattanovich, C. Rebnegger, and B. Gasser, 2021, What makes *Komagataella phaffii* non-conventional? *FEMS Yeast Research*, v. 21, no. 8, p. foab059, doi:10.1093/femsyr/foab059.
- Baruah, J., B. K. Nath, R. Sharma, S. Kumar, R. C. Deka, D. C. Baruah, and E. Kalita, 2018, Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products: *Frontiers in Energy Research*, v. 6.

- Bauer, B. E., D. Rossington, M. Mollapour, Y. Mamnun, K. Kuchler, and P. W. Piper, 2003, Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants: *European Journal of Biochemistry*, v. 270, no. 15, p. 3189–3195, doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03701.x.
- Bernauer, L., A. Radkohl, L. G. K. Lehmayr, and A. Emmerstorfer-Augustin, 2021, *Komagataella phaffii* as Emerging Model Organism in Fundamental Research: *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 607028, doi:10.3389/fmicb.2020.607028.
- Betancur, M. O., V. C. B. Reis, A. M. Nicola, J. L. De Marco, L. M. P. de Moraes, and F. A. G. Torres, 2017, Multicopy plasmid integration in *Komagataella phaffii* mediated by a defective auxotrophic marker: *Microbial Cell Factories*, v. 16, no. 1, p. 99, doi:10.1186/s12934-017-0715-8.
- Bhutto, A. W., K. Qureshi, K. Harijan, R. Abro, T. Abbas, A. A. Bazmi, S. Karim, and G. Yu, 2017, Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass: *Energy*, v. 122, p. 724–745, doi:10.1016/j.energy.2017.01.005.
- Brandt, B. A., T. Jansen, J. F. Görgens, and W. H. Zyl, 2019, Overcoming lignocellulose-derived microbial inhibitors: advancing the *Saccharomyces cerevisiae* resistance toolbox: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 13, no. 6, p. 1520–1536, doi:10.1002/bbb.2042.
- Buchholz, K., and J. Seibel, 2008, Industrial carbohydrate biotransformations: *Carbohydrate Research*, v. 343, no. 12, p. 1966–1979, doi:10.1016/j.carres.2008.02.007.
- Carmel-Harel, O., and G. Storz, 2000, Roles of the Glutathione- and Thioredoxin-Dependent Reduction Systems in the *Escherichia Coli* and *Saccharomyces Cerevisiae* Responses to Oxidative Stress: *Annual Review of Microbiology*, v. 54, no. 1, p. 439–461, doi:10.1146/annurev.micro.54.1.439.
- Carneiro, C. V. G. C., L. A. Serra, T. F. Pacheco, L. M. M. Ferreira, L. T. D. Brandão, M. N. de M. Freitas, D. Trichez, and J. R. M. de Almeida, 2022, Advances in *Komagataella phaffii* Engineering for the Production of Renewable Chemicals

and Proteins: Fermentation, v. 8, no. 11, p. 575, doi:10.3390/fermentation8110575.

Chang, Q., T. A. Griest, T. M. Harter, and J. Mark Petrash, 2007, Functional studies of aldo-keto reductases in *Saccharomyces cerevisiae*: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1773, no. 3, p. 321–329, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.009.

De Schutter, K., Y.-C. Lin, P. Tiels, A. Van Hecke, S. Glinka, J. Weber-Lehmann, P. Rouzé, Y. Van de Peer, and N. Callewaert, 2009, Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*: *Nature Biotechnology*, v. 27, no. 6, p. 561–566, doi:10.1038/nbt.1544.

Fletcher, E., and K. Baetz, 2020, Multi-Faceted Systems Biology Approaches Present a Cellular Landscape of Phenolic Compound Inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, p. 539902, doi:10.3389/fbioe.2020.539902.

Forsberg, K. J., S. Patel, E. Witt, B. Wang, T. D. Ellison, and G. Dantas, 2016, Identification of Genes Conferring Tolerance to Lignocellulose-Derived Inhibitors by Functional Selections in Soil Metagenomes: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 82, no. 2, p. 528–537, doi:10.1128/AEM.02838-15.

Gao, J., W. Yuan, Y. Li, F. Bai, and Y. Jiang, 2017, Synergistic effect of thioredoxin and its reductase from *Kluyveromyces marxianus* on enhanced tolerance to multiple lignocellulose-derived inhibitors: *Microbial Cell Factories*, v. 16, no. 1, p. 181, doi:10.1186/s12934-017-0795-5.

Gassler, T., M. Sauer, B. Gasser, M. Egermeier, C. Troyer, T. Causon, S. Hann, D. Mattanovich, and M. G. Steiger, 2020, The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO₂: *Nature Biotechnology*, v. 38, no. 2, p. 210–216, doi:10.1038/s41587-019-0363-0.

- Gorsich, S. W., B. S. Dien, N. N. Nichols, P. J. Slininger, Z. L. Liu, and C. D. Skory, 2006, Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*: *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 71, no. 3, p. 339–349, doi:10.1007/s00253-005-0142-3.
- Hasunuma, T., and A. Kondo, 2012, Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering: *Biotechnology Advances*, v. 30, no. 6, p. 1207–1218, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.10.011.
- Heistingering, L., J. C. Dohm, B. G. Paes, D. Koizar, C. Troyer, Ö. Ata, T. Steininger-Mairinger, and D. Mattanovich, 2022, Genotypic and phenotypic diversity among *Komagataella* species reveals a hidden pathway for xylose utilization: *Microbial Cell Factories*, v. 21, no. 1, p. 70, doi:10.1186/s12934-022-01796-3.
- Heyland, J., J. Fu, L. M. Blank, and A. Schmid, 2010, Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production: *Biotechnology and Bioengineering*, v. 107, no. 2, p. 357–368, doi:10.1002/bit.22836.
- Igbokwe, V. C., F. N. Ezugworie, C. O. Onwosi, G. O. Aliyu, and C. J. Obi, 2022, Biochemical biorefinery: A low-cost and non-waste concept for promoting sustainable circular bioeconomy: *Journal of Environmental Management*, v. 305, p. 114333, doi:10.1016/j.jenvman.2021.114333.
- Ji, L., Y. Shen, L. Xu, B. Peng, Y. Xiao, and X. Bao, 2011, Enhanced resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to vanillin by expression of lacA from *Trametes* sp. AH28-2: *Bioresource Technology*, v. 102, no. 17, p. 8105–8109, doi:10.1016/j.biortech.2011.06.057.
- Jönsson, L. J., B. Alriksson, and N.-O. Nilvebrant, 2013, Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification: p. 10.

- Jönsson, L. J., and C. Martín, 2016, Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects: *Bioresource Technology*, v. 199, p. 103–112, doi:10.1016/j.biortech.2015.10.009.
- Karbalaei, M., S. A. Rezaee, and H. Farsiani, 2020, *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins: *Journal of Cellular Physiology*, v. 235, no. 9, p. 5867–5881, doi:10.1002/jcp.29583.
- Karimi, K., and M. J. Taherzadeh, 2016, A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility: *Bioresource Technology*, v. 203, p. 348–356, doi:10.1016/j.biortech.2015.12.035.
- Kennedy, C. J., P. M. Boyle, Z. Waks, and P. A. Silver, 2009, Systems-Level Engineering of Nonfermentative Metabolism in Yeast: *Genetics*, v. 183, no. 1, p. 385–397, doi:10.1534/genetics.109.105254.
- Kim, D., and J.-S. Hahn, 2013, Roles of the Yap1 Transcription Factor and Antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*'s Tolerance to Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural, Which Function as Thiol-Reactive Electrophiles Generating Oxidative Stress: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, no. 16, p. 5069–5077, doi:10.1128/AEM.00643-13.
- Kurtzman, C. P., 2005, Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, no. 2, p. 973–976, doi:10.1099/ijs.0.63491-0.
- Laadan, B., J. R. M. Almeida, P. Rådström, B. Hahn-Hägerdal, and M. Gorwa-Grauslund, 2008, Identification of an NADH-dependent 5-hydroxymethylfurfural-reducing alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*: *Yeast*, v. 25, no. 3, p. 191–198, doi:10.1002/yea.1578.
- Larsson, S., E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi, and N.-O. Nilvebrant, 1999, The generation of fermentation inhibitors during dilute

acid hydrolysis of softwood: *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, no. 3–4, p. 151–159, doi:10.1016/S0141-0229(98)00101-X.

Larsson, S., A. Quintana-Sáinz, A. Reimann, N.-O. Nilvebrant, and L. J. Jönsson, 2000, Influence of Lignocellulose-Derived Aromatic Compounds on Oxygen-Limited Growth and Ethanolic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84, p. 16.

Lin, R., J. Cheng, L. Ding, W. Song, J. Zhou, and K. Cen, 2015, Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation: *Bioresource Technology*, v. 196, p. 250–255, doi:10.1016/j.biortech.2015.07.097.

Liu, Z. L., 2011, Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates: *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, no. 3, p. 809–825, doi:10.1007/s00253-011-3167-9.

Liu, Z. L., and M. Ma, 2020, Pathway-based signature transcriptional profiles as tolerance phenotypes for the adapted industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* resistant to furfural and HMF: *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, no. 8, p. 3473–3492, doi:10.1007/s00253-020-10434-0.

Louie, T. M., K. Louie, S. DenHartog, S. Gopishetty, M. Subramanian, M. Arnold, and S. Das, 2021, Production of bio-xylytol from d-xylose by an engineered *Pichia pastoris* expressing a recombinant xylose reductase did not require any auxiliary substrate as electron donor: *Microbial Cell Factories*, v. 20, no. 1, p. 50, doi:10.1186/s12934-021-01534-1.

Modig, T., G. Lide, and M. J. Taherzadeh, 2002, Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: p. 8.

Naumov, G. I., E. S. Naumova, and K. L. Boundy-Mills, 2018, Description of *Komagataella mondaviorum* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris*: *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 111, no. 7, p. 1197–1207, doi:10.1007/s10482-018-1028-6.

- Nwamba, M. C., F. Sun, M. R. Mukasekuru, G. Song, J. D. Harindintwali, S. A. Boyi, and H. Sun, 2021, Trends and hassles in the microbial production of lactic acid from lignocellulosic biomass: *Environmental Technology & Innovation*, v. 21, p. 101337, doi:10.1016/j.eti.2020.101337.
- Overkamp, K. M., P. Kötter, R. van der Hoek, S. Schoondermark-Stolk, M. A. H. Luttkik, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk, 2002, Functional analysis of structural genes for NAD⁺-dependent formate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*: Formate dehydrogenase genes in *S. cerevisiae*: *Yeast*, v. 19, no. 6, p. 509–520, doi:10.1002/yea.856.
- Paes, B. G., A. S. Steindorff, E. F. Formighieri, I. S. Pereira, and J. R. M. Almeida, 2021, Physiological characterization and transcriptome analysis of *Pichia pastoris* reveals its response to lignocellulose-derived inhibitors: *AMB Express*, v. 11, no. 1, p. 2, doi:10.1186/s13568-020-01170-9.
- Palmqvist, E., J. S. Almeida, and B. Hahn-Hägerdal, 1999, Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture: *Biotechnology and Bioengineering*, v. 62, no. 4, p. 447–454, doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19990220)62:4<447::AID-BIT7>3.0.CO;2-0.
- Palmqvist, E., and B. Hahn-Hägerdal, 2000, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition: *Bioresource Technology*, v. 74, no. 1, p. 25–33, doi:10.1016/S0960-8524(99)00161-3.
- Pampulha, M. E., and M. C. Loureiro-Dias, 1989, Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast: *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 31–31, no. 5–6, p. 547–550, doi:10.1007/BF00270792.
- Park, S.-E., H. M. Koo, Y. K. Park, S. M. Park, J. C. Park, O.-K. Lee, Y.-C. Park, and J.-H. Seo, 2011, Expression of aldehyde dehydrogenase 6 reduces inhibitory effect of furan derivatives on cell growth and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*: *Bioresource Technology*, v. 102, no. 10, p. 6033–6038, doi:10.1016/j.biortech.2011.02.101.

- Peña, D. A., B. Gasser, J. Zanghellini, M. G. Steiger, and D. Mattanovich, 2018, Metabolic engineering of *Pichia pastoris*: *Metabolic Engineering*, v. 50, p. 2–15, doi:10.1016/j.ymben.2018.04.017.
- Perrone, G. G., S.-X. Tan, and I. W. Dawes, 2008, Reactive oxygen species and yeast apoptosis: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1783, no. 7, p. 1354–1368, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.01.023.
- Petersson, A., J. R. M. Almeida, T. Modig, K. Karhumaa, B. Hahn-Hägerdal, M. F. Gorwa-Grauslund, and G. Lidén, 2006, A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance: *Yeast*, v. 23, no. 6, p. 455–464, doi:10.1002/yea.1370.
- Phaff, H. J., M. W. Miller, and M. Shifrine, 1956, The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California: *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 22, no. 1, p. 145–161, doi:10.1007/BF02538322.
- Qin, L., W.-C. Li, L. Liu, J.-Q. Zhu, X. Li, B.-Z. Li, and Y.-J. Yuan, 2016, Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase: *Biotechnology for Biofuels*, v. 9, no. 1, p. 70, doi:10.1186/s13068-016-0485-2.
- Ralph, J., C. Lapierre, and W. Boerjan, 2019, Lignin structure and its engineering: *Current Opinion in Biotechnology*, v. 56, p. 240–249, doi:10.1016/j.copbio.2019.02.019.
- Ramos, T. G. S., F. Justen, C. V. G. C. Carneiro, V. M. Honorato, P. F. Franco, F. S. Vieira, D. Trichez, C. M. Rodrigues, and J. R. M. Almeida, 2021, Xylonic acid production by recombinant *Komagataella phaffii* strains engineered with newly identified xylose dehydrogenases: *Bioresource Technology Reports*, v. 16, p. 100825, doi:10.1016/j.biteb.2021.100825.
- da Silva, C. M. S., A. de C. O. Carneiro, B. R. Vital, C. G. Figueiró, L. de F. Fialho, M. A. de Magalhães, A. G. Carvalho, and W. L. Cândido, 2018, Biomass torrefaction for energy purposes – Definitions and an overview of challenges and opportunities in Brazil: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 82, p. 2426–2432, doi:10.1016/j.rser.2017.08.095.

- Soares, C. E. V. F., J. C. Bergmann, and J. R. M. de Almeida, 2021, Variable and dose-dependent response of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts toward lignocellulosic hydrolysate inhibitors: *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, no. 2, p. 575–586, doi:10.1007/s42770-021-00489-0.
- Swinnen, S., S. F. Henriques, R. Shrestha, P.-W. Ho, I. Sá-Correia, and E. Nevoigt, 2017, Improvement of yeast tolerance to acetic acid through Haa1 transcription factor engineering: towards the underlying mechanisms: *Microbial Cell Factories*, v. 16, no. 1, p. 7, doi:10.1186/s12934-016-0621-5.
- Träff, K. L., L. J. Jönsson, and B. Hahn-Hägerdal, 2002, Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*: Putative xylose and arabinose reductases in *S. cerevisiae*: *Yeast*, v. 19, no. 14, p. 1233–1241, doi:10.1002/yea.913.
- Trichez, D., C. V. G. C. Carneiro, M. Braga, and J. R. M. Almeida, 2022, Recent progress in the microbial production of xylonic acid: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 38, no. 7, p. 127, doi:10.1007/s11274-022-03313-5.
- Vanmarcke, G., M. M. Demeke, M. R. Foulquié-Moreno, and J. M. Thevelein, 2021, Identification of the major fermentation inhibitors of recombinant 2G yeasts in diverse lignocellulose hydrolysates: *Biotechnology for Biofuels*, v. 14, no. 1, p. 92, doi:10.1186/s13068-021-01935-9.
- Verduyn, C., E. Postma, W. A. Scheffers, and J. P. Van Dijken, 1992, Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation: *Yeast*, v. 8, no. 7, p. 501–517, doi:10.1002/yea.320080703.
- Wang, S., G. Cheng, C. Joshua, Z. He, X. Sun, R. Li, L. Liu, and Q. Yuan, 2016, Furfural tolerance and detoxification mechanism in *Candida tropicalis*: *Biotechnology for Biofuels*, v. 9, no. 1, p. 250, doi:10.1186/s13068-016-0668-x.
- Wang, X., Z. Liang, J. Hou, X. Bao, and Y. Shen, 2016, Identification and functional evaluation of the reductases and dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae*

- involved in vanillin resistance: *BMC Biotechnology*, v. 16, no. 1, p. 31, doi:10.1186/s12896-016-0264-y.
- Wang, X., E. N. Miller, L. P. Yomano, X. Zhang, K. T. Shanmugam, and L. O. Ingram, 2011, Increased Furfural Tolerance Due to Overexpression of NADH-Dependent Oxidoreductase FucO in *Escherichia coli* Strains Engineered for the Production of Ethanol and Lactate: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, no. 15, p. 5132–5140, doi:10.1128/AEM.05008-11.
- Wang, S., X. Sun, and Q. Yuan, 2018, Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: A review: *Bioresource Technology*, v. 258, p. 302–309, doi:10.1016/j.biortech.2018.03.064.
- Wegner, G. H., 1990, Emerging applications of the methylotrophic yeasts: *FEMS Microbiology Letters*, v. 87, no. 3–4, p. 279–284, doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb04925.x.
- Yamada, Y., M. Matsuda, K. Maeda, and K. Mikata, 1995, The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae): *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 59, no. 3, p. 439–444, doi:10.1271/bbb.59.439.
- Yi, X., H. Gu, Q. Gao, Z. L. Liu, and J. Bao, 2015, Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment: *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, no. 1, p. 153, doi:10.1186/s13068-015-0333-9.
- Zhang, Y., Z.-W. Sun, R. Iratni, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. Hampsey, and D. Reinberg, 1998, SAP30, a Novel Protein Conserved between Human and Yeast, Is a Component of a Histone Deacetylase Complex: *Molecular Cell*, v. 1, no. 7, p. 1021–1031, doi:10.1016/S1097-2765(00)80102-1.
- Zhao, X., J. Tang, X. Wang, R. Yang, X. Zhang, Y. Gu, X. Li, and M. Ma, 2015, *YNL134C* from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a novel protein with aldehyde reductase activity for detoxification of furfural derived from

lignocellulosic biomass: Aldehyde reductase gene of *YNL134C*: *Yeast*, v. 32, no. 5, p. 409–422, doi:10.1002/yea.3068.