

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas

Aluna: Angela da Silva Machado
Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub, Dr.
Co-orientador(a): Nicole Teixeira Sehnem, MSc.

Trabalho redigido sob modelo de impressão do periódico Bioresource Technology.

Adaptação de *Spathaspora arborariae* a Altas Concentrações de Compostos Furânicos e seu Perfil Cinético para Produção de Etanol na Presença de 5-Hidroxiacetilfurfural e Furfural.

Angela da Silva Machado, Nicole Teixeira Sehnem e Marco Antonio Záchia Ayub

Laboratório de Biotecnologia e Engenharia Bioquímica (BiotecLab), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO

O estudo de cepas resistentes a compostos tóxicos, como o 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) e furfural, gerados durante o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, é necessário para que hidrolisados lignocelulósicos possam ser uma alternativa viável na indústria do bioetanol. Uma levedura recentemente descrita, *Spathaspora arborariae*, possui potencial para produzir etanol utilizando esses hidrolisados como substrato. O objetivo deste trabalho foi submeter uma cepa de *S. arborariae* à adaptação a crescentes concentrações de furfural e HMF e comparar o perfil da cinética de crescimento e produção de etanol das cepas adaptadas em relação à parental. A exposição gradativa aos compostos tóxicos resultou em uma cepa adaptada, que tolera 5,5 g.L⁻¹ de furaldeídos, denominada *S. arborariae* HF5,5. A cepa apresentou produtividade de etanol e produção de biomassa maior com relação à sensível na presença de furaldeídos.

Palavras-chave: Bioetanol, resistência, 5-hidroxiacetilfurfural; furfural; *Spathaspora arborariae*.

1. Introdução

A produção de etanol oriunda de recursos lignocelulósicos, como madeira e resíduos agroindustriais, é uma promissora aposta para a redução do acúmulo de gases causadores do aumento do efeito estufa e para reduzir a pressão sobre a escassez de combustíveis fósseis (Wyman & Hinman, 1990; Galbe & Zacchi, 2002). As vantagens na utilização desses resíduos como matéria-prima são a abundância na natureza e o fato de não

haver concorrência com a produção de alimentos (Octave e Thomas, 2009).

Materiais lignocelulósicos são constituídos por uma mistura de carboidratos polimerizados (celulose, hemicelulose) e lignina, e suas propriedades químicas fazem deles um substrato com alto valor biotecnológico (Malherbe & Cloete, 2002). O método mais amplamente utilizado para que os açúcares presentes nesses materiais sejam liberados e utilizados na fermentação consiste em uma hidrólise química através de ácido

diluído (clorídrico, sulfúrico) e essa reação se define basicamente em dois tipos: elevadas temperaturas (superiores a 160°C) em processo de fluxo contínuo para baixa concentração de sólidos 5 - 10 % (fração mássica) e baixa temperatura (inferior a 160°C) em processo por batelada e alto teor de sólidos (10 - 40 %, fração mássica). A hidrólise ácida diluída em condições menos severas pode atingir altas taxas de conversão de xilana em xilose, já quando altas temperaturas são empregadas, a hidrólise da celulose é favorecida (McMillan, 1994).

Além disso, altas temperaturas acarretam a formação de substâncias inibitórias para a célula, como ácidos fracos e compostos furânicos (Palmqvist e Hähn-Hagerdal, 2000; Klinke et al., 2004). Os compostos furânicos 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural são os inibidores mais potentes derivados da degradação da biomassa através da hidrólise ácida diluída (Dunlop 1948; Antal et al., 1991; Larsson et al., 1999; Lewkowski, 2001). Estes compostos são quimicamente relacionados (Figura 1). Ambos contêm um anel furânico e um grupo aldeído e são produtos formados pela desidratação de carboidratos (Sjostrom, 1993).

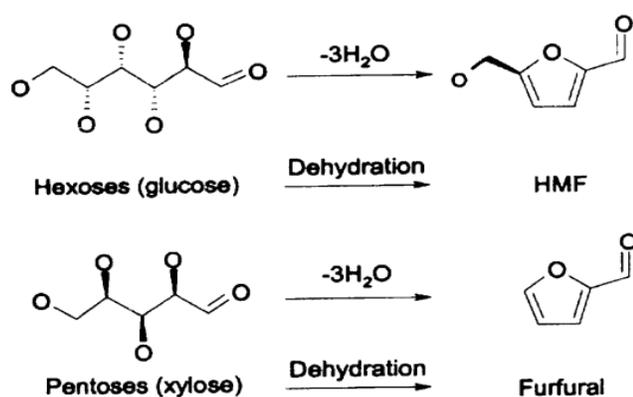


Figura 1. Ilustração esquemática das reações de formação dos compostos furânicos através da desidratação de carboidratos.

Os efeitos dependem da concentração de furaldeídos e da cepa utilizada (Almeida et al.,

2007). Em geral, afetam a fisiologia celular, podendo causar uma diminuição da viabilidade, diminuição do rendimento e de produtividade do etanol (Zaldivar et al., 2001). Além de reduzir atividades enzimáticas, causar a desnaturação do DNA, inibir a síntese de RNA e de proteínas, e causar danos na parede celular mesmo em baixas concentrações. Essa ação aparenta causar desequilíbrio no balanço redox e por consequência interferência na glicólise, crescimento celular (aumenta a fase lag do cultivo) e biossíntese de moléculas

A toxicidade dos furaldeídos pode ser explicada por uma reorientação da energia da levedura para a fixação do dano causado pelos compostos e pela redução de ATP intracelular e dos níveis de NAD(P)H, quer por inibição enzimática ou por consumo/regeneração de cofatores (Almeida et al., 2007). O HMF é um composto tóxico bastante importante, pois pode causar o acúmulo de lipídeos e diminuição da concentração de proteínas em células de leveduras. Este composto também interfere na atividade das enzimas triose-fosfato desidrogenase, álcool desidrogenases, aldeídos desidrogenases e piruvato desidrogenase (Petersson et al., 2006).

O furfural é um dos maiores inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos. Este composto pode ser convertido para álcool furfurílico, e em alguns casos para ácido furóico. A adição de altas concentrações de furfural em culturas industriais de *S. cerevisiae* inibe o crescimento de biomassa, consumo de glicose e produção de etanol principalmente nas primeiras horas do processo fermentativo (Lin et al., 2009; Martín e Jönsson, 2003). Estudos do fluxo metabólico têm mostrado que furfural afeta os fluxos da via glicolítica e o ciclo do ácido tricarbóxico (TCA), que estão envolvidos no metabolismo de energia, pois a redução de furfural compete por NADH disponível, podendo causar queda na produção de etanol (Liu et al., 2009). Em *S. cerevisiae* o furfural promove o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, danos a membrana

mitocondrial e vacuolar, a cromatina e a actina (Almeida et al., 2007).

Embora *S. cerevisiae* seja o microrganismo mais utilizado na indústria de fermentação, sua utilização na produção de etanol sobre esses hidrolisados não é tão eficiente, já que essa levedura não é capaz de fermentar pentoses a etanol e, portanto, de uso limitado para hidrolisados com alto teor destas (Zaldivar et al., 2001). Na busca por microrganismos capazes de fermentar pentoses, destaca-se uma nova espécie recentemente descrita, *Spathaspora arborariae*, isolada de madeira em decomposição nos ecossistemas da Mata Atlântica e do Cerrado no Brasil (Cadete et al., 2009).

Essa linhagem cresce bem em xilose e glicose, produzindo praticamente a mesma quantidade de biomassa e etanol em ambas fontes de carbono. No entanto, como típico de outras leveduras fermentadoras de xilose (Panchal et al., 1988; Sanchez et al., 2002; Stambuk et al., 2003), essa levedura tem uma clara preferência para a fermentação de glicose (Cadete et al., 2009).

Uma alternativa para utilizar os hidrolisados lignocelulósicos para a produção de etanol é o estudo de cepas resistentes aos compostos tóxicos para a direta utilização desse produto sem etapas adicionais. Um estudo recente demonstrou que essa levedura possui potencial para produzir etanol utilizando hidrolisado de casca de arroz como substrato, porém, compostos como furfural e HMF afetam o metabolismo dessa levedura, inclusive a produção de etanol (Cunha-Pereira et al., 2011).

Diante disso, o objetivo do trabalho foi realizar engenharia evolutiva com furfural, HMF ou a combinação de ambos para obter cepas derivadas de *S. arborariae* (UFMG-HM19.1A) adaptadas a altas concentrações desses compostos, e avaliar a cinética de crescimento e produção de etanol dessas cepas derivadas em comparação com a parental.

2. Material e Métodos

2.1. Organismo, Meio de Cultivo e Preparação de Inóculo

Foi utilizada a cepa *S. arborariae* (UFMG-HM19.1A = NRRL Y-48658), caracterizada por Cadete et al. (2009). As células foram armazenadas a -20°C em solução contendo 20 % de glicerol e 80% de meio YPD (fração volumétrica), contendo (g.L^{-1}): glicose, 20; extrato de levedura, 10; peptona bacteriológica, 20.

Para inóculo dos cultivos, a levedura foi cultivada em meio YPD a 28°C em agitador orbital (Marconi MA 830, Brasil) a 150 rpm até atingir a fase exponencial de crescimento. Os inóculos foram feitos com uma densidade óptica (DO, 600 nm) de 0,1.

2.2. Engenharia evolutiva para obtenção de cepas resistentes a altas concentrações de compostos furânicos.

S. arborariae (UFMG-HM19.1A) foi inoculada em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 30 mL de meio YPD contendo diferentes concentrações iniciais de compostos furânicos: $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF, $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de cada composto (furfural e HMF).

As culturas foram mantidas a 28°C em agitador orbital a 150 rpm, e a cada 48 horas (fase exponencial de crescimento) foram realizados repiques, aumentando a concentração dos tóxicos em $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, até que não fosse mais observado crescimento exponencial da cultura. A cada repique a cultura foi estocada em glicerol para avaliações posteriores.

2.3. Cinética de culturas de *S. arborariae* na ausência e presença de HMF e furfural.

As cepas UFMG-HM19.1A (cepa parental) e HF5,5 (cepa adaptada) de *S. arborariae* foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 70 mL de

meio YPD, em triplicata, nas seguintes condições: Controle (ausência de qualquer composto furânico); HMF (2,5 g.L⁻¹); Furfural (2,5 g.L⁻¹) e HMF e Furfural (1,5 g.L⁻¹ de cada).

Esse cultivo foi realizado sob microaerofilia (150 rpm) a uma temperatura de 28°C. As amostras foram coletadas em 0, 6, 12, 24, 30, 36 e 48 horas de cultivo para determinação de produção de biomassa, consumo de glicose, produção de etanol e redução dos furaldeídos.

2.4. Métodos analíticos e cálculos de rendimento e produtividade volumétrica

A produção de biomassa seca foi determinada por método gravimétrico. A concentração de glicose e etanol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE/RID) (Shimadzu), utilizando uma coluna HPX87H (Biorad) a 45°C, tendo como fase móvel solução de H₂SO₄ 5mM em um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. Os tempos de retenção de glicose, glicerol e etanol foram de 8,9; 13,1 e 21 minutos, respectivamente.

As concentrações de HMF e furfural foram determinadas no mesmo equipamento, com detector ultravioleta com comprimento de onda de 276 nm (CLAE/UV), utilizando uma coluna Nucleosil LC-18 (Supelco) tendo como fase móvel solução composta por ácido acético, acetonitrila e água, na proporção de 1:20:79, sob um fluxo de 1,1 mL.min⁻¹ e um volume de injeção de 20 µL. O tempo de retenção do HMF 4,1 e para furfural é 6,4 minutos.

A taxa de rendimento de etanol ($Y_{P/S}$) foi calculada através da razão da quantidade de etanol formado por quantidade de glicose consumida (g.g⁻¹). Já a produtividade volumétrica (Q_P) foi dada pela razão da concentração de etanol produzidos pelo tempo de fermentação (g.L⁻¹.h⁻¹).

3. Resultados e Discussão

3.1. Engenharia evolutiva para obtenção de resistência a altas concentrações de compostos furânicos.

Evolução direcionada ou estratégia de adaptação é um método para mimetizar a seleção natural (Sauer, 2001). Liu e colaboradores (2005) realizaram esse método para avaliar cepas de leveduras adaptadas e demonstrou níveis significantes de tolerância à HMF e furfural quando comparada com a parental, sob condições controladas. Esse método é baseado em melhoramento experimental das propriedades celulares através de diversificação genética (induzida ou não por mutações) e processos de seleção.

A adaptação a furaldeídos foi realizada com o objetivo de selecionar cepas resistentes a compostos tóxicos resultantes do processo de geração de substrato proveniente de resíduos agroindustriais. Durante o processo de adaptação, os repiques sucessivos na presença de HMF chegaram à concentração de 3 g.L⁻¹ do composto. A partir da concentração de 3,5 g.L⁻¹ de HMF, o crescimento celular foi baixo, sendo que o processo de adaptação para esse tóxico teve duração de 14 dias. Na exposição ao furfural, as células de *S. arborariae* apresentaram uma sensibilidade levemente maior, não apresentando crescimento a partir de 2,5 g.L⁻¹ de furfural (tempo total de adaptação de 10 dias). Quando na presença da combinação dos dois tóxicos, essa levedura apresentou capacidade de crescer até 5,5 g.L⁻¹ (2,75 g.L⁻¹ de cada composto, sendo que a adaptação perdurou por 22 dias).

A partir desses resultados, a cepa adaptada (HF5,5) a ambos os compostos foi selecionada e submetida à avaliação de cinética de crescimento e produção de etanol para comparação com a cepa parental (UFMG-HM19.1A).

3.2. Cinética de culturas de *S. arborariae* na ausência e presença de HMF e furfural.

As figuras 2, 3, 4 e 5 apresentam o perfil cinético das cepas parental e adaptada quanto a produção de biomassa, consumo de glicose e assimilação desses compostos. Em dois dos quatro tratamentos realizados, com $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural e na combinação dos dois compostos, a

cepa parental não apresentou capacidade de estabelecer um crescimento celular no período de 48 horas do cultivo (fig. 2A e 4). Na análise da capacidade de produção de biomassa pela cepa parental na presença de HMF, foi observado um aumento da fase lag na presença do composto (fig. 2B).

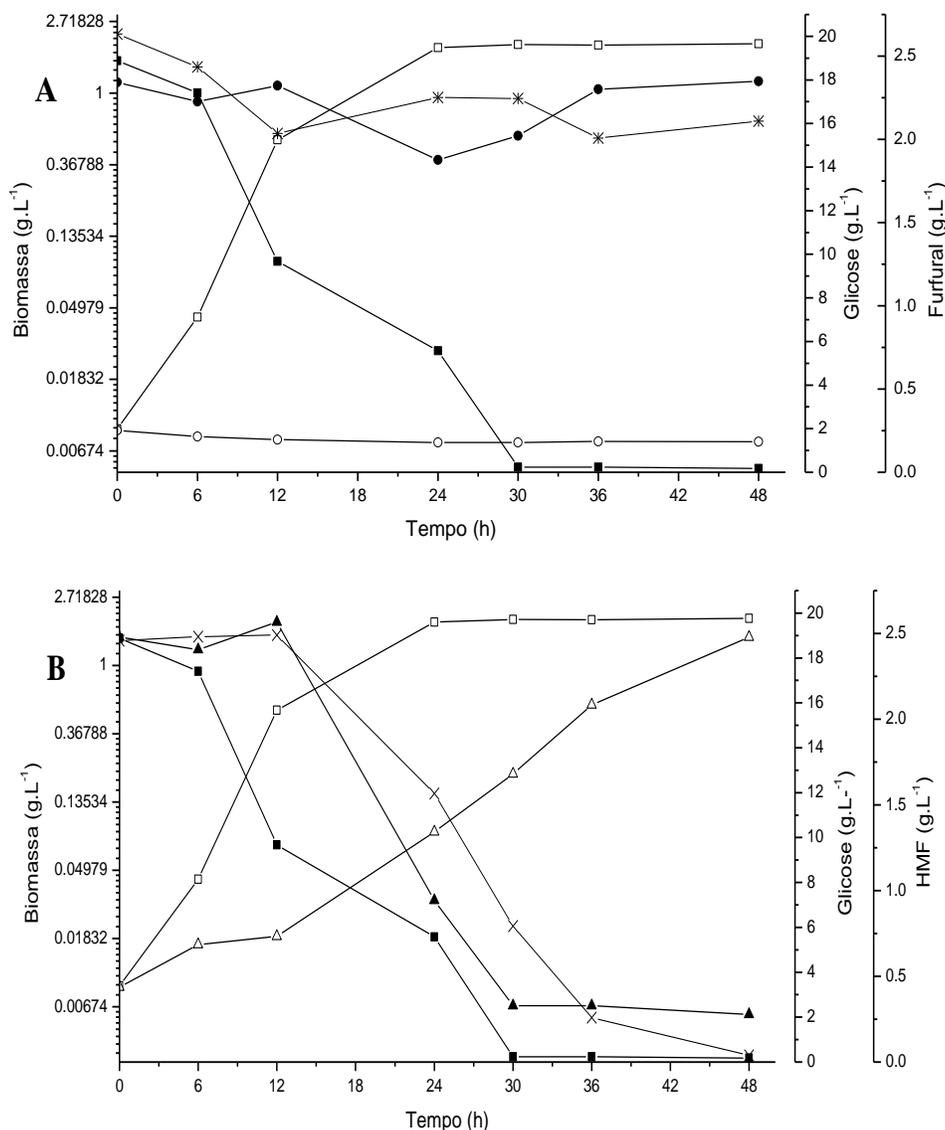


Figura 2. Perfil cinético da produção de biomassa, consumo de glicose e assimilação de compostos furfênicos da cepa UFMG-HM19.1A na presença de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural (A) e na presença de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF (B). (□) produção de biomassa na condição controle, (○) produção de biomassa na presença de furfural. (△) produção de biomassa na presença de HMF. (■) consumo de glicose na condição controle (●) consumo de glicose na presença de furfural (▲) consumo de glicose na presença de HMF, (*) assimilação de furfural, (×) assimilação de HMF.

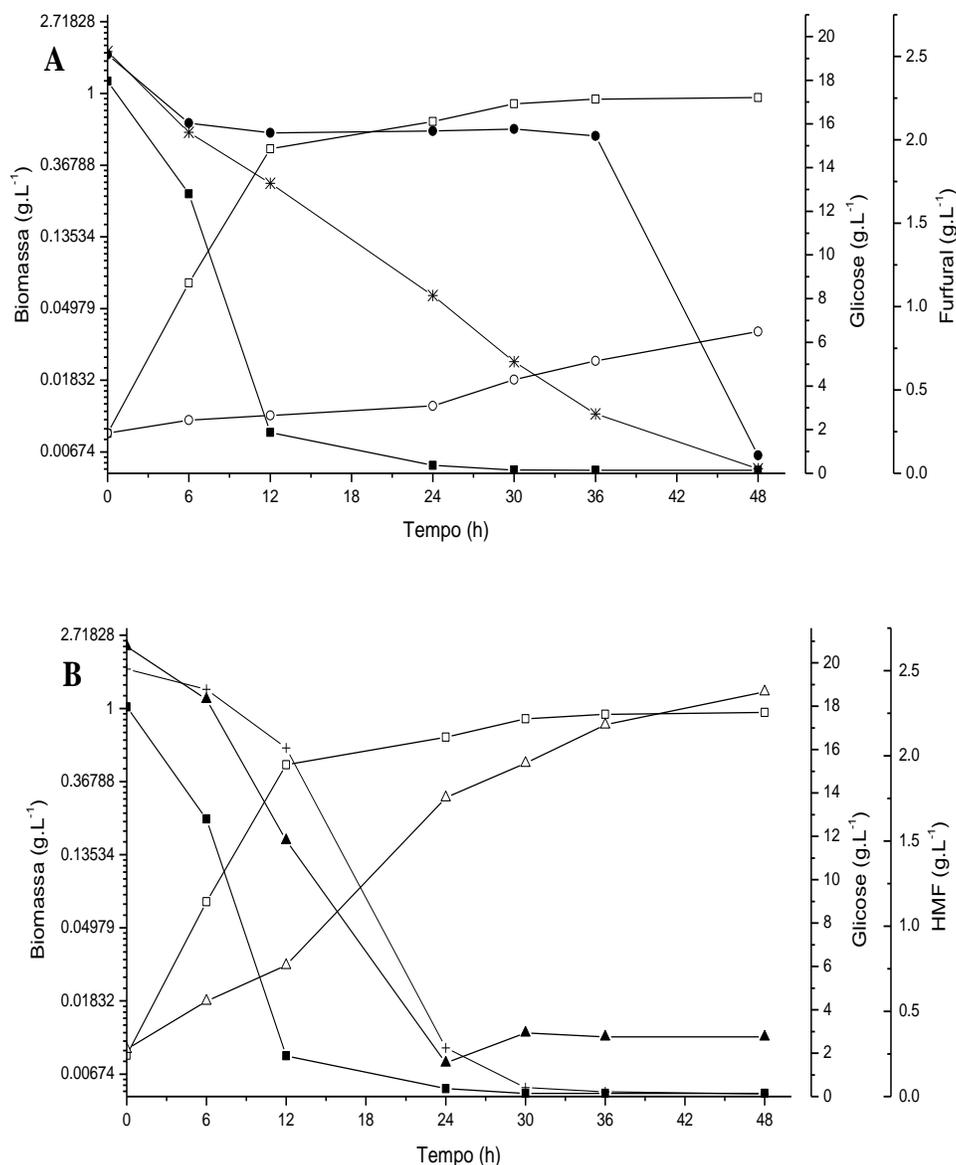


Figura 3. Perfil cinético da produção de biomassa, consumo de glicose e assimilação de compostos furânicos da cepa HF5,5 na presença de 2,5 g.L⁻¹ de furfural (A) e na presença de 2,5 g.L⁻¹ de HMF (B). (□) produção de biomassa na condição controle, (○) produção de biomassa na presença de furfural. (△) produção de biomassa na presença de HMF. (■) consumo de glicose na condição controle (●) consumo de glicose na presença de furfural (▲) consumo de glicose na presença de HMF, (*) assimilação de furfural, (×) assimilação de HMF.

Furaldeídos são conhecidos por causar efeitos no crescimento e fermentação de *S. cerevisiae* e serem convertidos por leveduras a compostos com menor capacidade inibitória

como álcool furfurílico, 2,5-bis-hidroximetilfurano (Liu et al., 2005). Entretanto, há diferenças importantes entre os efeitos causados por cada composto. Enquanto

os efeitos do HMF mostram-se a mais longo prazo, este pode exercer efeitos mais sérios que o furfural, porém seus efeitos tóxicos imediatos são claramente menores (Taherzadeh et al., 2000).

Apenas a cepa adaptada apresentou crescimento e produção de etanol em todas condições de tratamento realizadas neste trabalho. Tal comportamento também pode ser visto em um estudo recente onde uma cepa de *S. cerevisiae* adaptada, Y-50049, mostrou tolerância para furfural e HMF e teve a capacidade de completar a fermentação de etanol em 48 horas de cultivo, enquanto a cepa parental falhou em estabelecer crescimento sob as mesmas condições (Liu et al., 2008) Como observado por Liu e colaboradores (2004), cepas de leveduras mostram diferenças na tolerância a inibidores, sendo refletida no tempo de duração da fase lag de culturas expostas a furfural e/ou HMF. A variabilidade na resposta sugere que algumas leveduras possuem mecanismos mais efetivos para resistir a esses compostos. A fase lag prolongada sugere uma maior mudança na fisiologia das células para se adaptar ao estresse químico.

A cepa HF5,5 apresentou menor sensibilidade à presença dos compostos, na qual a fase exponencial de crescimento foi observada a partir de 12 horas de cultivo na presença de 2,5 g.L⁻¹ de HMF atingindo valor similar ao controle. A presença de furfural teve grande repressão sobre o crescimento celular da levedura, sendo que a fase exponencial de crescimento iniciou apenas após 30 horas de cultivo (fig. 3A).

Quanto à produção de biomassa, em 48 horas de cultivo na presença de HMF, a biomassa produzida foi semelhante à condição controle, cerca de 1 g.L⁻¹ (fig. 3B). Na presença de furfural a produção foi severamente afetada, atingindo uma biomassa de 0,03 g.L⁻¹.

Uma forte demanda por NADH na redução do furfural pode levar a um nível insuficiente de NADH para o término da respiração resultando em uma geração insuficiente de ATP para sustentar o crescimento (Taherzadeh et al., 2000).

Na presença de ambos compostos, a fase de adaptação da levedura é maior que a condição controle, iniciando sua fase exponencial a partir de 12 horas, porém, diferentemente da condição com HMF, a produção final de biomassa é afetada em cerca de 50% (fig. 5).

A influência da presença dos compostos no consumo de glicose percebe-se nos cultivos com a cepa adaptada, onde a presença destes, fez com que houvesse um aumento no tempo de consumo. Na cepa parental, na presença de HMF, o padrão foi similar ao controle. Estudos anteriores demonstram que concentrações de furfural acima de 2 g.L⁻¹ reduzem a taxa de consumo de glicose em *S. cerevisiae* - um efeito que pode ser atribuído à inibição de enzimas da via glicolítica. (Banerjee et al., 1981; Boyer et al., 1992).

Ao analisar a assimilação dos compostos tóxicos, a cepa parental só foi capaz de reduzir o HMF (fig. 2B), não mostrando capacidade de redução de furfural tanto no cultivo com 2,5 g.L⁻¹ (fig. 2A) quanto na concentração de 1,5 g.L⁻¹ com a presença também de HMF e furfural (fig. 4). A cepa adaptada demonstrou capacidade de assimilação dos compostos nas condições com 2,5 g.L⁻¹. Até 12 horas o decréscimo de furfural foi maior que o HMF, a partir disso, há uma drástica queda na concentração de HMF, que em 24 horas de cultivo consegue reduzir a concentração a 0,3 g.L⁻¹ (fig. 3B), enquanto a assimilação de furfural continua ocorrendo de maneira mais lenta e progressiva, chegando a esses níveis de concentração apenas em 36 horas (fig. 3A).

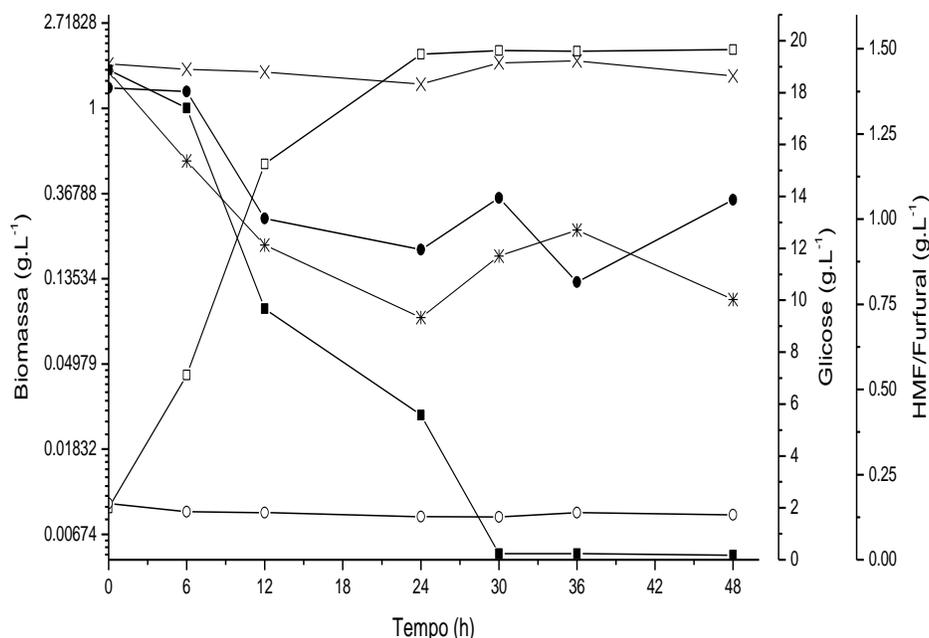


Figura 4. Perfil cinético da produção de biomassa, consumo de glicose e assimilação de compostos furânicos da cepa UFMG-HM19.1A na presença ou ausência de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural. (□) produção de biomassa na condição controle, (○) produção de biomassa na presença dos compostos. (■) consumo de glicose na condição controle (●) consumo de glicose na presença dos compostos, (*) assimilação de furfural, (×) assimilação de HMF.

No cultivo da cepa HF5,5 com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de cada composto juntos, a assimilação dos compostos furânicos também ocorre em velocidades diferentes (fig. 5). A assimilação de furfural é maior nas primeiras horas que a de

HMF e a queda drástica não é observada. Taherzadeh et al. (2000) confirmam que a redução de furfural é consideravelmente maior do que a de HMF, em cultivo de *S. cerevisiae* com a presença de ambos.

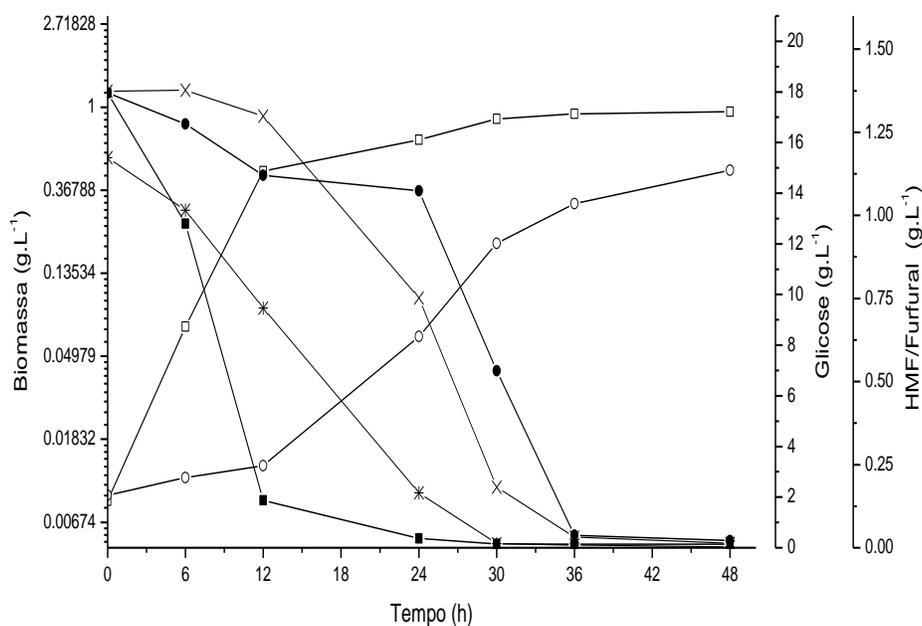


Figura 5. Perfil cinético da produção de biomassa, consumo de glicose e assimilação de compostos furânicos da cepa HF5,5 na presença ou ausência de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de HMF e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural. (□) produção de biomassa na condição controle, (○) produção de biomassa na presença dos compostos. (■) consumo de glicose na condição controle (●) consumo de glicose na presença dos compostos, (*) assimilação de furfural, (×) assimilação de HMF.

Sanchez & Bautista (1988) observaram que a velocidade de assimilação do furfural e HMF por *Candida guilliermondii* é diferente, uma vez que o furfural exibiu uma velocidade máxima nos primeiros 15 minutos de fermentação, enquanto o HMF, na primeira meia hora, sugerindo a possibilidade de que as enzimas para o metabolismo de furfural são constitutivas na levedura, enquanto para o metabolismo de HMF precisam de um tempo de indução.

O rendimento de etanol ($Y_{P/S}$) e a produtividade volumétrica (Q_P) foram calculadas para todas as condições realizadas (Tabela 1). A cepa adaptada apresentou um rendimento de etanol superior à cepa parental. As condições controle e com a presença de HMF e furfural da cepa adaptada foram superiores à condição controle da parental.

Para a cepa HF 5,5, o rendimento de etanol foi menos afetado pela presença dos

compostos do que a sua produtividade volumétrica. O composto que mais afetou o rendimento foi o HMF. Em estudos realizados por Nirupama et al. (1981 *apud* Sanchez & Bautista 1998) foi constatado que o furfural inibiu fortemente a síntese de proteína e RNA de *C. tropicalis* enquanto o 5-hidroximetilfurfural inibiu a produção de etanol por *S. cerevisiae*. A condição com a combinação de HMF e furfural apresentou o mesmo rendimento da condição controle (0,38 g.g⁻¹) enquanto sua produtividade volumétrica representa 35% da atingida pelo controle. Embora atinja valores similares de produção de etanol, o tempo na produção é afetado pelos compostos. Segundo Palmqvist et al. (1999) e Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), para *S. cerevisiae* o crescimento celular se mostrou mais sensível ao furfural do que a produção de etanol.

Tabela 1. Valores de rendimento ($Y_{P/S}$) e Produtividade volumétrica (Q_P) de etanol das cepas UFMG-HM19.1A e HF5,5 na ausência e presença dos compostos furânicos. C (controle), HMF (5-hidroximetilfurfural), FUR (furfural).

Cepa	UFMG-HM19.1A				HF5,5			
	C	HMF	FUR	HMF e FUR	C	HMF	FUR	HMF e FUR
$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	0,30	0,23	0,02	0,06	0,39	0,13	0,25	0,39
Q_P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,23	0,07	0,001	0,03	0,44	0,10	0,08	0,16

Importantes efeitos secundários de furaldeídos no metabolismo são as mudanças no balanço de cofatores das células, que pode aparecer durante a redução destes. A redução de HMF e furfural é acoplada com a oxidação de NADPH ou NADH; o fluxo metabólico de regeneração do cofator pode mudar em virtude da enzima utilizada na redução (Almeida et al, 2009). A relação NADH/NADPH para redução do furfural e HMF foi calculada por Wahlbom e Hahn-Hägerdal (2002). Para utilização na redução de furfural essa razão foi de cerca de 20:1 enquanto que para a de HMF foi de 1:10. A diferença na preferência de cofator não só

explica a distinta formação de produtos, mas sim também sugere um diferente mecanismo dos inibidores.

Com essa diferença no mecanismo dos inibidores, outra variável que define a produção e crescimento é a concentração de compostos presente no meio. Em um estudo com duas cepas de *S. cerevisiae* e uma de *Pichia stipitis*, a duração da fase lag variou de poucas horas a vários dias dependendo da concentração do inibidor adicionado à cultura. Após atingir a fase de crescimento celular, as cepas foram capazes de consumir a glicose e produzir álcool. Isso demonstra uma clara

dose-dependência das leveduras aos inibidores furfural e HMF (Liu et al., 2005).

4. Conclusão

Foi demonstrado que uma exposição gradativa a compostos tóxicos resulta em uma cepa adaptada, capaz de tolerar 5,5 g.L⁻¹ de furaldeídos, denominada *S. arborariae* HF5,5. Esta mesma cepa apresenta produtividade de etanol e produção de biomassa maior com relação à parental na presença de furaldeídos. Mais estudos são necessários para elucidar mecanismos de tolerância à furaldeídos de *S. arborariae* visto que a espécie possui potencial para ser usada na indústria de bioetanol. As perspectivas desse trabalho são a de realizar esses testes com a utilização da xilose como fonte de carbono além da determinação das atividades de enzimas relacionadas à tolerâncias a esses compostos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) e Fundação do Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo suporte financeiro a este trabalho.

Referências

- Almeida, J. R. M., Modig, T, Petersson, A, Hahn-Hagerdal, B, Liden, G, Gorwa-Grauslund, M. F. 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 82:340–349.
- Almeida, J. R., Karhumaa, K., Bengtsson, O., et al. 2009. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* strains with respect to anaerobic growth in non-detoxified lignocellulose hydrolysate. *Bioresour Technol* 100: 3674–3677.
- Antal, M. J., Leesomboon, T., Mok, W. S., Richards, G. N. 1991. Mechanism of formation of 2-furaldehyde from D-xylose. *Carbohydr Res* 217:71–85
- Banerjee, N., Bhatnagar, R., Viswanathan, L. 1981. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *European J Appl Microbiol Biotechnol* 11:226–228.
- Boyer, L. J., Vega, J. L., Klasson, K. T., Clausen, E. C., Gaddy, J. L. 1992. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biomass Bioenergy* 3:41–48.
- Cadete, R. M.; Santos, R. O.; Melo, M. A.; Mouro, A.; Gonçalves, D. L.; Stambuk, B. U.; Gomes, F. C. O.; Lachance, M. A.; Rosa, c. A. 2009. *Spathaspora arborariae* sp. Nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in brazil. *Fems yeast research*. 9: 1338–1342.
- Cunha-Pereira, F., Hickert, L.R., Sehnem, N.T., De Souza-Cruz, P.B., Rosa, C.A., Ayub, M.A. 201. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. *Bioresour technol.*, 102: 4218-4225.
- Dunlop, A. P. 1948. Furfural formation and behavior. *Ind Eng Chem* 40:204–209
- Galbe, M.; Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied microbiology and biotechnology*. 59:618-628.
- Klinke, H.B., Thomsen, A., Ahring, B. 2004. Inhibition of ethanol producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:10-26.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., Nilvebrant, N.O. 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme microb. Technol.* 24:151–159.

- Lewkowski, J. 2001. Synthesis, chemistry and applications of 5-hydroxymethylfurfural and its derivatives. *Arkivoc* 1:17-54
- Lin, F. M., Qiao, B, Yuanyj. 2009. Comparative Proteomic Analysis of Tolerance and Adaptation of Ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to Furfural, a Lignocellulosic Inhibitory Compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 3765-3776.
- Liu, Z. L., Slininger, P. J., Dien, B. S, Berhow, M. A., Kurtzman, C. P. and Gorsich, S. W. 2004. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J Ind MicrobiolBiotechnol* 31:345-352.
- Liu, Z. L., Slininger, P. J. and Gorsich, S. W. 2005. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. *Appl Biochem Biotechnol* 121-124:451-460.
- Liu, Z. L, Moon, J. , Andersh, B. J., Slininger, P.J. and Weber, S. 2008. Multiple gene-mediated aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and HMF by ethanologenic yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81(4):743-753.
- Liu, Z. L., Ma, M., Song, M. 2009. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Mol Genet Genomics*. 282:233-244.
- Malherbe, S & Cloete, T.E. 2002., Lignocellulose biodegradation : fundamentals and applications', reviews in environmental science and biotechnology. 1(2):105-114.
- Martín C, Jönsson, L. J. 2003. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors *Enzyme and Microbial Technology*. 32:386-395.
- Mcmillan, J.D. 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. *Enzymatic conversion of biomass for fuels production (Symposium, series 566)*. American Chemical Society, USA .293-324.
- Octave, S. & Thomas, D. 2009. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*. 91: 659-664.
- Palmqvist, E, Almeida, J, Hahn-Hägerdal, B. 1999. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnol Bioeng* 62:447-454.
- Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates i: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol*. 74:17-24.
- Panchal, C. J.; Bast, C. J.; Russell, I.; Stewart, G.G. 1988. Repression of xylose utilization by glucose in xylose-fermenting yeasts. *Canadian journal of microbiology*. 34:1316-1320.
- Postma, E. Van den Broek, P.J. 1990. Continuous-culture study of the regulation of glucose and fructose transport in *Kluveromyces marxianus* CBS 6556. *J. Bacteriol*. Jun; 172(6):2871-2876.
- Sanchez, S.; Bravo, V.; Castro, E.; Moya, A. J.; Camacho, F. 2002. The fermentation of mixtures of d-glucose and d-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *Journal of chemical technology & biotechnology*. 77: 641-648.
- Sanchez, B, Bautista J. 1988. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. *Enzyme Microb Technol* 10:315-318.
- Sauer, U. 2001. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 73:129-169.

- Sjöström, E. 1993. Wood chemistry: fundamentals and applications, 2nd edn. Academic Press, San Diego
- Stambuk, B. U.; Franden, M. A.; Singh, A.; Zhang, M. 2003. D-xylose transport by *candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. Applied biochemistry and biotechnology. 105:255–263.
- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C., Lidén, G. 2000. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 53:701–708.
- Wahlbom, C. F and Hahn-Hägerdal, B. 2002. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng 78:172–178.
- Wyman, C.E. & Hinman, N.D. 1990. Ethanol: fundamentals of production from renewable feeds tocks and use as a transportation fuel. Appl. Biochem. Biotech., 24/25, 735.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., Olsson, L. 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:17–34.