

## AUMENTO DA TOLERÂNCIA DA *KOMAGATAELLA PHAFFII* À INIBIDORES PRESENTES EM HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS

Eduardo Franco Brandalise<sup>1\*</sup>; Lívia Teixeira Duarte-Brandão<sup>1</sup>; João Ricardo Moreira de Almeida<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Embrapa Agroenergia. \*E-mail: edubrandalisee@gmail.com

Os carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica podem ser utilizados como fonte de carbono e energia pelos microrganismos. Entretanto, para que esses açúcares possam ser utilizados no processo industrial, é necessário submeter a biomassa aos processos de pré-tratamento. Os processos de pré-tratamento facilitam a liberação de açúcares fermentáveis da biomassa; no entanto, eles também levam à formação e liberação de compostos que inibem o metabolismo microbiano, dentre eles, o furfural e o 5- hidróxi- metil-furfural (HMF). Os mecanismos de resposta natural de leveduras relacionam-se com a expressão diferencial de genes, que redireciona o metabolismo para permitir o reparo dos danos e o aumento das atividades de desintoxicação inatas. Desta forma, a identificação e utilização da expressão destes genes, por meio de engenharia genética, em linhagens de leveduras, apresentam um elevado potencial para aplicação bioenergética. O objetivo deste trabalho foi desenvolver linhagens transformadas da levedura *Komagataella phaffii* tolerantes a inibidores presentes em hidrolisados de biomassa. Para tanto, seis genes- alvo foram selecionados a partir de análises de transcriptoma da *K. phaffii* na presença de compostos inibitórios presentes no hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar. Os seis genes foram clonados no vetor de expressão pKLD empregando-se estratégias de recombinação homóloga. Após a construção dos vetores, estes foram utilizados para transformar a linhagem *K. phaffii*-X33. Após seleção em placa contendo antibiótico, linhagens recombinantes contendo cada um dos genes foram confirmadas por PCR. O plasmídeo pKLD sem nenhum gene sendo superexpresso foi utilizado para obter uma linhagem controle. As linhagens recombinantes foram avaliadas quanto à tolerância a HMF, furfural e hidrolisado de biomassa de cana. Os dados demonstraram a capacidade de alguns genes aumentarem a capacidade de destoxificação do meio e conseqüente melhor crescimento da linhagem transformada mesmo na presença do inibidor. Das 6 linhagens transformadas obtidas, duas apresentaram menor período de adaptação, de 14 horas, em relação à linhagem controle, que necessitou 20 horas para ultrapassar a fase lag de crescimento, em furfural 2 g/L e em hidrolisado 30%. Ademais, uma destas linhagens transformadas demonstrou uma taxa de crescimento 42,6% maior em furfural 2 g/L do que a mesma taxa na linhagem controle. Assim, a superexpressão de genes selvagens da *K. phaffii* permitiu a construção de linhagens mais tolerantes aos inibidores do hidrolisado lignocelulósico para aplicação em bioprocessos.

**Palavras-chave:** Bioprocessos; Engenharia genética; Leveduras.

**Agradecimentos:** CNPq 20.22.00.007.00.00