



ANÁLISE DO DESEMPENHO DE UMA NOVA LINHAGEM DE *Candida pseudointermedia* DIANTE DE CARBOIDRATOS E INIBIDORES ENCONTRADOS NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

L. DEOTI^{1*}, A. GIEHL¹, A. C. LUCARONI¹, L. M. MILANI¹ e S. L. ALVES JR.¹

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Chapecó,
Laboratório de Bioquímica e Genética

*E-mail para contato: leticiadeoti@gmail.com

RESUMO – A carência de microrganismos capazes de fermentar xilose e celobiose e de tolerar inibidores ácidos carboxílicos (ácido acético e ácido fórmico), dificulta a produção de etanol 2G. Visando encontrar uma levedura tolerante aos inibidores mencionados e eficiente na fermentação de glicose, xilose e celobiose, a cepa selvagem *Candida pseudointermedia* UFFS-CE-3.6 teve seus perfis de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol avaliados em diferentes meios de cultura. Os resultados obtidos demonstram que a levedura logrou êxito com crescimento nos três carboidratos, no entanto, obteve expressiva produção de etanol apenas na presença da hexose. O consumo de celobiose foi o mais afetado pelos inibidores, de modo que as células não foram capazes de crescer nessa fonte de carbono diante da concentração intermediária dos ácidos a que foram submetidas as células (1,8 g L⁻¹ de ácido acético e 0,3 g L⁻¹ de ácido fórmico). Em contrapartida, em glicose e xilose as células só foram completamente inibidas nas concentrações mais altas dos dois inibidores (3,6 g L⁻¹ e 0,6 g L⁻¹ de ácido acético e ácido fórmico, respectivamente). De todo modo, o aumento gradual dos inibidores sempre retardou o início do consumo de açúcares e estendeu a fase *lag* para os crescimentos celulares. Assim, este estudo demonstra que a espécie avaliada possui grau intermediário de tolerância a inibidores, porém dispõe de todas as enzimas necessárias para garantir o metabolismo de xilose e celobiose.

1. INTRODUÇÃO

A expansão da frota de transportes brasileira tem ocasionado, nos últimos anos, um aumento considerável do consumo de biocombustíveis veicular no Brasil. O etanol de segunda geração (2G) pode ser obtido a partir de resíduos de biomassa lignocelulósica oriundos da produção do etanol de primeira geração. Este é obtido pelo processamento primário da biomassa, enquanto aquele é oriundo do bagaço e da palha da cana, assim como de materiais em decomposição, produzindo energia limpa e renovável e diminuindo a quantidade de resíduos do ambiente.



O etanol 2G é produto da fermentação, realizada por leveduras, dos carboidratos que constituem a biomassa lignocelulósica, composta basicamente por celulose, hemicelulose e lignina (Rubin, 2008). Para o acesso das enzimas aos polissacarídeos ser facilitado, é necessário separar a lignina da hemicelulose e da celulose, processo conhecido como pré-tratamento lignocelulósico. Durante esta sequência, compostos tóxicos chamados de inibidores são gerados, prejudicando o crescimento e a fermentação microbiana. Jönsson e Martín (2016) mostram que a maioria dos inibidores derivados da lignocelulose se forma durante o pré-tratamento, quando hemiceluloses e/ou lignina são solubilizados e degradados. Segundo Klinke *et al.* (2004), os inibidores são fatores limitantes na viabilidade de conversões biotecnológicas de lignocelulose para a produção de etanol.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a principal responsável pela produção de etanol de primeira geração, devido a suas adaptações às condições industriais de fermentação alcoólica. No entanto, ela é incapaz de fermentar tanto a xilose (Stambuk *et al.*, 2008), que é o segundo açúcar mais abundante nos hidrolisados lignocelulósicos, quanto a celobiose (Lee *et al.*, 2017), fato que limita seu uso na produção de etanol 2G. Sendo assim, o principal desafio a ser superado é encontrar novas leveduras capazes de fermentar os açúcares presentes no hidrolisado, como a glicose, xilose e celobiose, além de tolerar os inibidores advindos dos processos que antecedem a fermentação, como ácido acético e ácido fórmico.

Leveduras selvagens têm sido amplamente avaliadas com o objetivo de conhecer a capacidade de fermentação de xilose e celobiose, assim como a tolerância a inibidores ácidos. Guamán-Burneo *et al.* (2015) demonstrou recentemente que a espécie *Candida pseudointermedia* é capaz de consumir xilose. Portanto, o uso de novas leveduras pode contribuir com a indústria de etanol, sendo utilizadas tanto isoladamente quanto expressando seus genes em *S. cerevisiae*.

Este trabalho avaliou a tolerância de uma levedura selvagem de *C. pseudointermedia*, linhagem UFFS-CE-3.6, em meios com glicose, xilose e celobiose sob diferentes concentrações de ácidos fracos (ácido acético e ácido fórmico). O estudo do comportamento dessa levedura é de essencial importância visando sua possível aplicabilidade na produção de etanol de segunda geração.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Isolamento e Identificação das Leveduras

A levedura UFFS-CE-3.6 foi isolada a partir de amostras de matéria vegetal em decomposição coletadas nas matas da Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Chapecó, em uma região de Mata Atlântica do Sul do Brasil, localizada no Oeste de Santa Catarina. Seu isolamento e sua identificação taxonômica foram realizados conforme Bazoti *et al.* (2017).

2.2. Crescimento Celular, Consumo de Açúcares e Produção de Etanol

A análise dos perfis de crescimento celular iniciou com um pré-cultivo por 48 horas em 10 mL de meio rico, contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose. As



células pré-crescidas foram posteriormente inoculadas em frascos Erlenmeyer com meio mínimo YNB (1/100 do volume final), contendo 0,67% de base nitrogenada e 2% de glicose, xilose ou celobiose como fontes de carboidrato. Os meios foram ajustados em pH 5,0 e esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos. Os frascos foram incubados sob agitação periódica de 145 rpm a 25°C.

Para avaliar o grau de tolerância das células aos diferentes inibidores de fermentação, foram adicionadas concentrações crescentes de ácido acético e ácido fórmico aos meios de cultura, de forma independente. O ácido acético foi utilizado com concentrações de 0 g L⁻¹ como controle, 0,6 g L⁻¹, 1,8 g L⁻¹ e 3,6 g L⁻¹, enquanto o ácido fórmico, por possuir propriedades altamente tóxicas, foi utilizado em menores concentrações de 0 g L⁻¹, 0,1 g L⁻¹, 0,3 g L⁻¹ e 0,6 g L⁻¹. Em tempos previamente determinados (8 coletas durante 48 horas), as amostras de cada cultivo celular foram coletadas e passaram pela verificação do crescimento celular em espectrofotômetro, com absorbância a 570 nm (DO570nm).

O consumo de açúcares e a produção de etanol foram avaliados com amostras retiradas dos meios de cultura em tempos pré-determinados e centrifugadas por três minutos a 5.000 g. Os sobrenadantes das amostras foram filtrados para posterior análise em HPLC (fase móvel 5 mM H₂SO₄, 50°C, fluxo de 0,6 mL min⁻¹ em coluna Aminex HPX-87H, Bio-Rad, e detecção por índice de refração RID-10, Shimadzu).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a tolerância da levedura UFFS-CE-3.6 aos inibidores ácido acético e ácido fórmico e seu metabolismo celular diante dos principais açúcares encontrados em hidrolisados lignocelulósicos, comparou-se o crescimento celular da linhagem em diferentes concentrações de ambos os ácidos em meios com glicose, xilose ou celobiose, além de seu perfil de consumo dos referidos carboidratos e a produção de etanol realizada pelas suas células.

A linhagem foi capaz de crescer em meios contendo alternadamente as três fontes de carbono, mas os efeitos de inibição sobre o crescimento celular foram diretamente proporcionais às concentrações dos inibidores (Figuras 1-A e 1-D, 2-A e 2-D, 3-A e 3-D): quanto maior a concentração de ácido, maior a fase *lag* antes do início do crescimento exponencial. A mesma relação se observou também nos perfis de consumo dos carboidratos analisados (Figuras 1-B e 1-E, 2-B e 2-E, 3-B e 3-E).

As taxas de consumo de açúcar foram sempre maiores e os crescimentos foram sempre inferiores em meios com glicose (Figura 1), os únicos em que se observou produção de etanol (~9 g L⁻¹). Isso corrobora os dados de Duval *et al.* (2010), que demonstram que, quando açúcares são consumidos lentamente, o metabolismo das leveduras é essencialmente respiratório, gerando maior biomassa celular, como observado nos crescimentos da UFFS-CE-3.6 em xilose e celobiose (Figuras 2 e 3). Em outras palavras, a levedura, em condições contendo apenas um desses dois carboidratos como fonte de carbono, metabolizou-os através da respiração e não da fermentação alcoólica, por isso houve maior crescimento celular e ausência da produção de etanol nos diferentes meios. De fato, recentemente foram encontradas diferentes leveduras com capacidade de consumo de xilose, mas em suas células esse açúcar foi completamente oxidado a CO₂ pela respiração celular ou apenas convertido a xilitol (Sena *et al.*, 2017).



Figura 1 - Perfis de crescimento celular (A e D), consumo de carboidrato (B e E) e produção de etanol (C e F) da levedura UFFS-CE-3.6 em meios com 2% de glicose como fonte de carbono. Os meios continham ainda, alternadamente, 0 (\blacktriangle), 0,6 (\bullet), 1,8 (\blacksquare) e 3,6 (\blacklozenge) g L^{-1} de ácido acético (A, B e C) ou 0 (\triangle), 0,1 (\circ), 0,3 (\square) e 0,6 (\diamond) g L^{-1} de ácido fórmico (D, E e F).

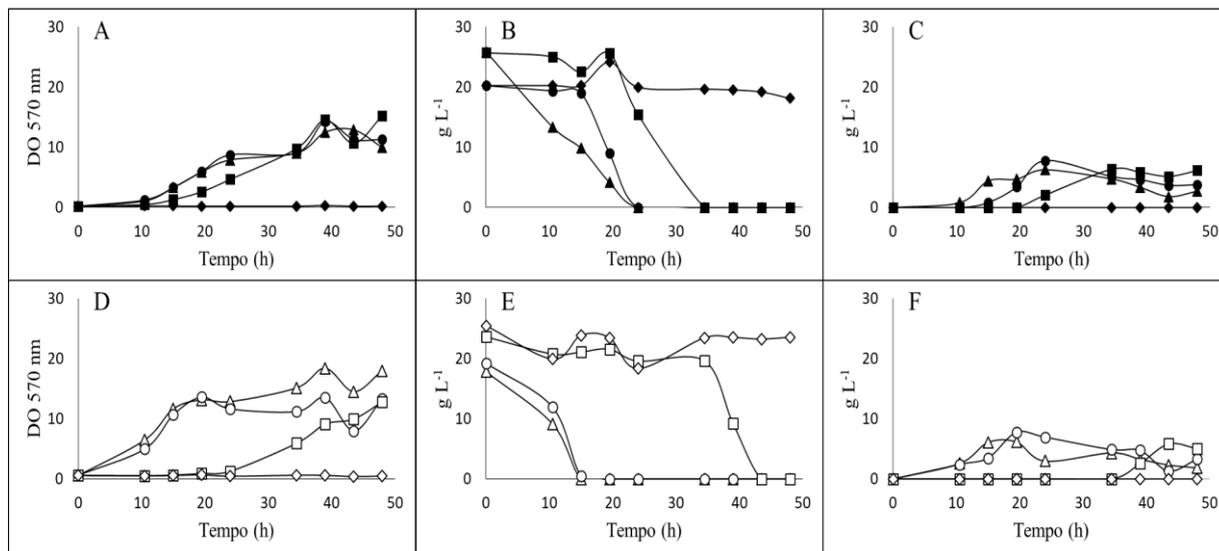


Figura 2 - Perfis de crescimento celular (A e D), consumo de carboidrato (B e E) e produção de etanol (C e F) da levedura UFFS-CE-3.6 em meios com 2% de xilose como fonte de carbono. Os meios continham ainda, alternadamente, 0 (\blacktriangle), 0,6 (\bullet), 1,8 (\blacksquare) e 3,6 (\blacklozenge) g L^{-1} de ácido acético (A, B e C) ou 0 (\triangle), 0,1 (\circ), 0,3 (\square) e 0,6 (\diamond) g L^{-1} de ácido fórmico (D, E e F).

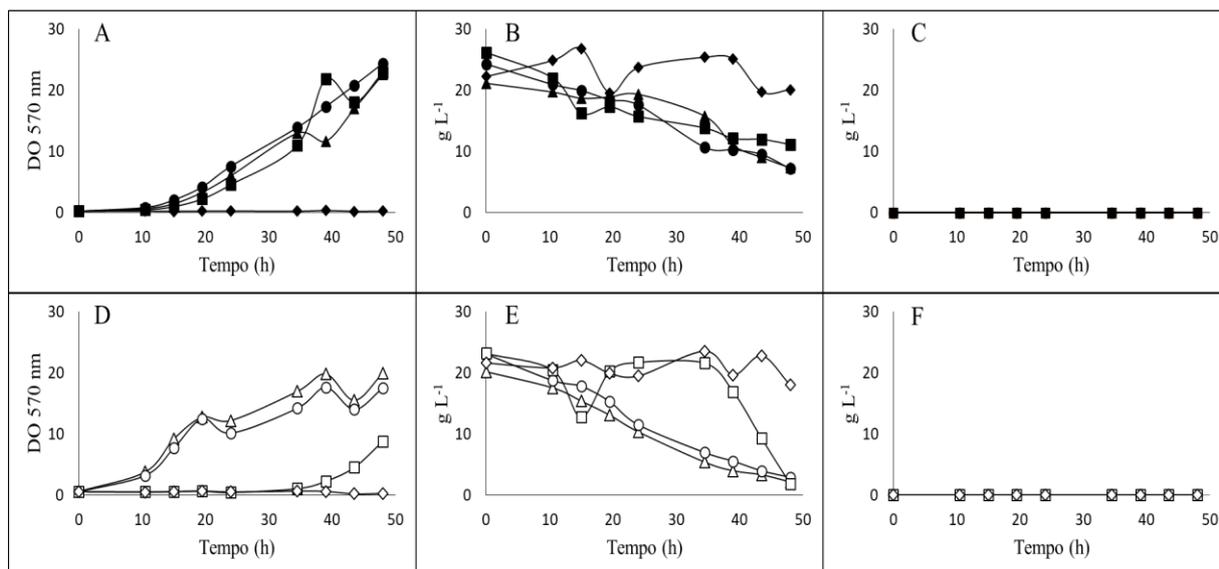
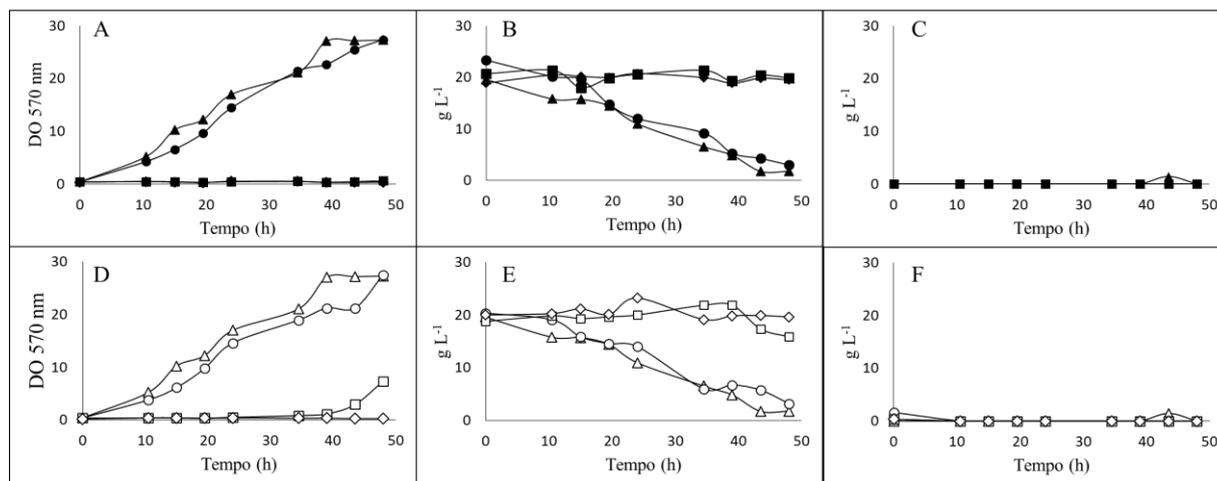


Figura 3 - Perfis de crescimento celular (A e D), consumo de carboidrato (B e E) e produção de etanol (C e F) da levedura UFFS-CE-3.6 em meios com 2% de celobiose como fonte de carbono. Os meios continham ainda, alternadamente, 0 (\blacktriangle), 0,6 (\bullet), 1,8 (\blacksquare) e 3,6 (\blacklozenge) g L^{-1} de ácido acético (A, B e C) ou 0 (\triangle), 0,1 (\circ), 0,3 (\square) e 0,6 (\diamond) g L^{-1} de ácido fórmico (D, E e F).



A inibição foi mais pronunciada quando as células se encontravam metabolizando a celobiose (Figura 3), haja vista a ausência total de consumo de açúcar e crescimento celular na concentração intermediária de inibidores (1,8 g L^{-1} de ácido acético e 0,3 g L^{-1} de ácido fórmico). Já nos meios com glicose (Figura 1) ou xilose (Figura 2), a levedura só foi completamente inibida nas maiores concentrações testadas dos ácidos carboxílicos em questão (3,6 g L^{-1} de ácido acético e 0,6 g L^{-1} de ácido fórmico). Esses dados são similares aos que Du et al. (2019) observaram recentemente para a levedura *Spathaspora passalidarum*, espécie também encontrada na Mata Atlântica (Cadete e Rosa, 2018).

4. CONCLUSÃO

A levedura *C. pseudointermedia* UFFS-CE-3.6 tolerou os inibidores ácido acético e ácido fórmico em diferentes concentrações nas três fontes de carbono testadas: glicose, xilose e celobiose. Esta espécie, embora não tenha fermentado a xilose e a celobiose, pode ser uma potencial fornecedora de genes a serem expressos em leveduras já empregadas na produção de etanol atualmente produzido a partir de material lignocelulósico, assim como sua resistência e eficiência podem ser melhoradas através de engenharia evolutiva. Portanto, os estudos realizados relacionados a levedura UFFS-CE-3.6 são de fundamental importância para a otimização do etanol 2G.

5. REFERÊNCIAS

BAZOTI, S. F.; GOLUNSKI, S.; SIQUEIRA, D. P.; SCAPINI, T.; BARRILLI, E. T.; MAYER, D. A.; BARROS, K. O.; ROSA, C. A.; STAMBUKE, B. U.; ALVES JR, S. L.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. *Bioresource Technol*, v. 244, p. 582-587, 2017.



- CADETE, R. M.; ROSA, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. *Yeast*, v. 35, p. 191-199, 2018.
- DU, C., LI, Y., ZHAO, X., PEI, X., YUAN, W., BAI, F., JIANG, Y. The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 103, p. 2845-2855, 2019.
- DUVAL, E. H.; ALVES Jr., S. L.; DUNN, B.; SHERLOCK, G.; STAMBUK, B. U. Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy 52 number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. *Journal of Applied Microbiology*, v.109, p.248-259, 2010.
- GUAMÁN-BURNEO, M. C.; DUSSÁN, K. J.; CADETE, R. M.; CHEAB, M. A.; PORTERO, P.; CARVAJAL-BARRIGA, E. J.; SILVA, S. S.; ROSA, C. A. Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* f.a., sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 108, p. 919-931, 2015.
- JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, p. 1-16, 2013.
- JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 102-112, 2016.
- KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, p. 10-26, 2004.
- LEE, W. H.; JIN, Y. S. Evaluation of ethanol production activity by engineered *Saccharomyces cerevisiae* fermenting cellobiose through the phosphorylytic pathway in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 1649-1656, 2017.
- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, v. 454, p. 841–845, 2008.
- SENA, L. M., MORAIS, C. G., LOPES, M. R., SANTOS, R. O., UETANABARO, A. P., MORAIS, P. B., VITAL, M. J., DE MORAIS, M. A. JR., LACHANCE, M. A., ROSA, C. A. D-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 110, p. 53-67, 2017.
- STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BON, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 67, p. 918-926, 2008.