

## Avaliação da tolerância ao etanol por *Candida akabanensis* UFVJM-R131

Fellipe Rocha Pereira <sup>a</sup>, Natália Oliveira Pereira <sup>b</sup>, Rafaela Paula Carvalho Pontes<sup>c</sup>, Lílian de Araújo Pantoja<sup>d</sup> e Alexandre Soares dos Santos<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Estudante do Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da UFVJM, nível mestrado. E-mail: fellipe.rocha@ufvjm.edu.br

<sup>b</sup>Estudante de Engenharia Química da UFVJM. E-mail: oliveira.natalia@ufvjm.edu.br

<sup>c</sup>Estudante do Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da UFVJM, nível doutorado. E-mail: rafaela.pontes@ufvjm.edu.br

<sup>d</sup>Professor do Instituto de Ciência e Tecnologia da UFVJM. E-mail: l.pantoja@ufvjm.edu.br

<sup>e</sup>Professor do Departamento de Ciências Básicas da UFVJM. E-mail: alexandre.soares@ufvjm.edu.br

1

**Resumo:** *Candida akabanensis* UFVJM-R131 é uma linhagem de levedura não-convencional com habilidade de converter xilose em bioetanol, o que a torna um potencial biocatalizador para a produção de etanol 2G. Considerando que o etanol, quando em altas concentrações, é tóxico para as leveduras, há necessidade de avaliar seu efeito. O presente estudo avaliou o efeito da adição de etanol (0% a 8%), utilizando meio de cultivo YPMX (28°C, 150 rpm), sobre o crescimento celular e o consumo de açúcares. Concentrações iniciais de etanol iguais ou maiores que 4% afetaram o crescimento e o consumo de xilose.

**Palavras-chave:** xilose, etanol 2G, inibição por produto, levedura, pentoses

### 1 - Introdução

A fermentação alcoólica é um processo-chave para a indústria de etanol combustível (WU *et al.*, 2023). O etanol de 2ª geração (2G) é produzido a partir da fermentação alcoólica dos açúcares provenientes de biomassas lignocelulósicas, e considerado uma alternativa sustentável e de baixa emissão de CO<sub>2</sub> em contraponto aos combustíveis de origem fóssil (Subudhi *et al.*, 2022).

Para a produção de etanol 2G é necessário realizar o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Esse pré-tratamento tem por finalidade desconstruir a hemicelulose, reduzir a recalcitrância da celulose e, em alguns casos, remover a lignina do complexo lignocelulósico, permitindo maior eficiência na etapa de sacarificação (SINGH A; SINGHANIA, R. R; SOAM, 2022), que resultará na liberação de unidades monoméricas representadas, principalmente, por unidades de xilose e glicose.

Contudo, o aproveitamento integral dos monossacarídeos recuperados da hidrólise dos polissacarídeos lignocelulósicos depende de micro-organismos capazes de fermentar pentoses

e hexoses. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, comumente utilizada em processos industriais, só é capaz de fermentar hexoses, como a glicose (NANDAL; SHARMA; ARORA, 2020). Nesse sentido, a prospecção e o estudo de micro-organismos capazes de fermentar pentoses é necessário.

A levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131, isolada de bagaço de cana-de-açúcar, foi reconhecida pela capacidade de fermentar pentoses e hexoses (VALINHAS *et al.*, 2018) e produzir álcool. Todavia, nada se sabe sobre sua tolerância ao acúmulo de etanol no meio fermentativo.

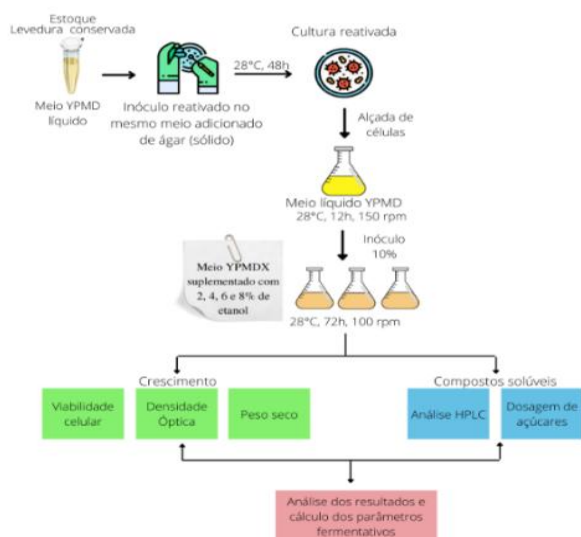
O etanol pode comprometer a membrana celular e promover mudanças em sua estrutura (COT, M. *et al.*, 2007), que vão desde a adição de ácido graxo insaturados a maior produção de ergosterol na membrana (SAINI; BENIWAL; KOKKILIGADDA, 2018). O etanol, inicialmente interage com os fosfolipídios da membrana das células de leveduras, pois a região hidrofóbica desta molécula se liga com a cauda lipídica, e o grupo hidroxila se ligue a região da cabeça polar da molécula lipídica fazendo com que a membrana se expanda.

A levedura, no ambiente intracelular, age na tentativa de diminuir a concentração do etanol, para isso, ocorre, primeiramente, sua conversão em acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase 2 (adh2), que, posteriormente, é convertido em acetato pela enzima aldeído desidrogenase, entrando no ciclo de Krebs como acetil-CoA e, então, participando da gliconeogênese, se transformando em glicose (TORTORA, 2007). Essa transformação é uma estratégia da levedura para lidar com a toxicidade do etanol e consome muita energia sendo utilizada apenas como último recurso. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de diferentes concentrações de etanol no desempenho da linhagem de levedura *Candida akabanensis* UFVJM-R131, em processos fermentativos para produção de etanol.

## 2 - Material e Métodos

As etapas experimentais do presente projeto foram realizadas no Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação (LabBio), no Laboratório de Pré-tratamento e Caracterização de Biomassas Energéticas e no Laboratório de Microbiologia para Biocombustíveis (LabMBio) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), localizado no Campus JK, Diamantina-MG. A linhagem *Candida akabanensis* UFVJM-R131 pertence ao acervo microbiano do LabMBio.

Os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Fluxograma das etapas do processo fermentativo adicionado de etanol em diferentes concentrações (2, 4, 6 e 8 %) conduzido com a linhagem de *Candida akabanensis* UFVJM R131

### 2.1. Reativação e autenticação dos micro-organismos

A linhagem de *Candida akabanensis* UFVJM-R131, registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob Cod. A18446E, se encontrava conservada em meio de cultura Yeast Extract-Peptide-Malt-Dextrose-YEPMX (3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte; 5,0 g L<sup>-1</sup> de peptona de soja e 10,0 g L<sup>-1</sup> de glicose), em microtubos tipo *Eppendorf* contendo ainda glicerol a 10%, mantido a -18°C. A reativação da cultura foi realizada em meio sólido YEPMX (3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte; 5,0 g L<sup>-1</sup> de peptona de soja e 10,0 g L<sup>-1</sup> de xilose; 17 g L<sup>-1</sup> de ágar).

#### 2.1.1 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado por meio da transferência de uma alçada da cultura crescida em meio ágar YEPMX, para 30 mL de meio YPMD líquido, contido em Erlenmeyer de 50 mL, incubado à 28°C, sob a agitação de 150 rpm até atingir 1,0 D.O. (610nm). Aliquotas de 5 mL foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 min, seguida do descarte do sobrenadante. As células foram recuperadas e ressuspensas em água e novamente submetida a centrifugação e então usadas para inocular os ensaios fermentativos.

### 2.2 Processo fermentativo

Os ensaios foram conduzidos em frascos cônicos de 125 mL, contendo 50 mL de meio sintético YEPMX, adicionados de etanol para produzir concentrações de 2, 4, 6 e 8%. Os ensaios foram conduzidos a 28°C, pH 5,0 a 150 rpm por 40 horas e monitorado quanto ao crescimento celular e consumo de açúcar através da retirada de alíquotas de 1 mL a cada 4 horas. O crescimento celular e a taxa de consumo de açúcares foram considerados

fatores de resposta, calculados conforme as equações 1, 2, 3 e 4, a seguir:

i-Taxa específica de crescimento microbiano, equação 1:

$$\mu_{\text{máx}} t = \ln \frac{X}{X_0} \quad \text{Equação (1)}$$

$\mu_{\text{máx}}$  = taxa específica de crescimento microbiano máximo ( $\text{h}^{-1}$ );

$X$  = massa celular final ( $\text{g L}^{-1}$ );

$X_0$  = massa celular inicial ( $\text{g L}^{-1}$ );

$t$  = duração da fase exponencial do crescimento celular (h).

ii-Tempo de geração, equação 2;

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{máx}}} \quad \text{Equação (2)}$$

$t_g$  = tempo de geração;

$\mu_{\text{máx}}$  = taxa específica de crescimento microbiano máximo ( $\text{h}^{-1}$ );

iii- Consumo de xilose, equação 3:

$$\text{Consumo} = \frac{X_{\text{il inicial}} - X_{\text{il final}}}{\text{Tempo}} \quad \text{Equação (3)}$$

iv- Rendimento, equação 4:

$$Y_{P/S} = \frac{P}{S_i - S_f} \quad \text{Equação (4)}$$

$Y_{P/S}$  = Rendimento em ( $g_{\text{produto}} / g_{\text{substrato}}$ )

$P$  = Concentração final de etanol ( $\text{g L}^{-1}$ )

$S_i$  = Concentração inicial de açúcar presente no meio ( $\text{g L}^{-1}$ )

$S_f$  = Concentração final de açúcar presente no meio ( $\text{g L}^{-1}$ )

### 2.2.2 Quantificação de compostos solúveis

A quantificação de açúcares redutores foi determinada através do método colorimétrico com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrito (VALINHAS et al., 2018). O ensaio foi realizado em microtubo do tipo Eppendorf, a partir da adição de 100  $\mu\text{L}$  da amostra e 100  $\mu\text{L}$  do reagente DNS seguido de incubação em banho-maria a 70°C por 25 minutos, resfriamento em banho de água e gelo e leitura em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Asys Tech) a 540 nm.

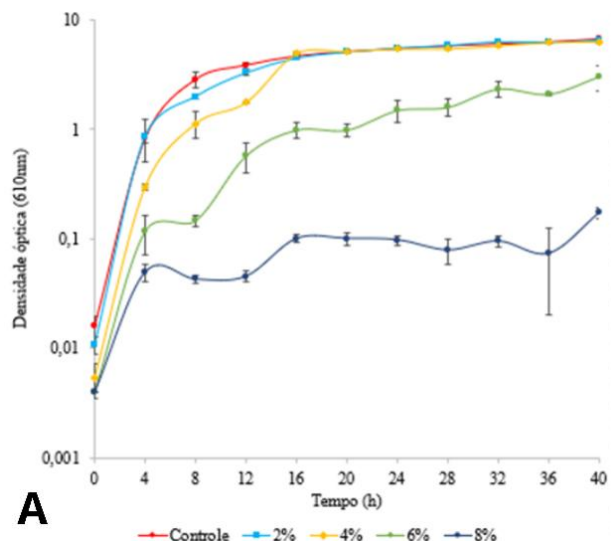
A concentração de etanol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando sistema Shimadzu Prominence UPLC

20A equipado com coluna Rezex ROA-Phenomenex® (300  $\times$  7,8 mm) mantida a 60°C. Os analitos foram eluídos com 0,0025 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a fluxo de 0,6  $\text{mL min}^{-1}$ . O etanol foi analisado usando um detector de índice de refração (Modelo RID-20A, Shimadzu®).

## 3 - Resultados e Discussão

Na Figura 2 se encontram os resultados do crescimento celular da levedura *C. akabansensis* no meio controle (0% de etanol) e nos meios contendo as demais concentrações de etanol (2%, 4%, 6% e 8%). Os dados obtidos, permitiram observar que o crescimento celular, no meio contendo concentração 2% de etanol, não diferiu do controle (0%). Todavia, em meios contendo 4% de etanol notou-se que a levedura teve uma demora de 16h para entrar na fase estacionária, sendo este tempo maior que o obtido no meio controle, 12h. O crescimento celular em meios contendo 6% e 8% de etanol não entraram na fase estacionária até o final do processo fermentativo de 40 h, ou seja, seguiram crescendo lentamente. Cabe mencionar que, após 4 e 8 horas de processo, foi observado uma desaceleração do crescimento no meio contendo 6 e 4% de etanol, respectivamente. No meio contendo 6% de etanol, após as 8 horas, se notou, que, a cada 4 horas, o crescimento celular se alternava entre estagnar e crescer até completar o tempo total de fermentação. Este fato também foi observado, no bioprocessamento conduzido com 4%, todavia, nos períodos de 8 a 16 horas. Esta condição pode estar atrelada a uma estratégia de sobrevivência, pois, muitos organismos a desenvolvem a fim de superar o estresse causado pelo etanol (SAHANA et al., 2024).

A taxa de crescimento microbiano e o tempo de geração (Tabela 1), foram afetadas nos processos conduzidos na concentração de 8% de etanol. Se observou que a quantidade de etanol contida no meio de fermentação, quando, igual ou abaixo de 6%, não afeta a taxa de crescimento microbiana.



**Figura 2.** Crescimento celular em meio YPMX elaborados com diferentes concentrações de etanol (0%, 2%, 4%, 6% e 8%), conduzidas com a levedura *Candida akabanensis* Ufvjm R131

Ao comparar os valores de taxa de crescimento ( $\mu\text{m h}^{-1}$ ) e tempo de geração ( $\text{tg h}^{-1}$ ) foram 13,7 vezes menor e 10,79 vezes maior, respectivamente, no meio de fermentação com 8% de etanol comparado ao controle.

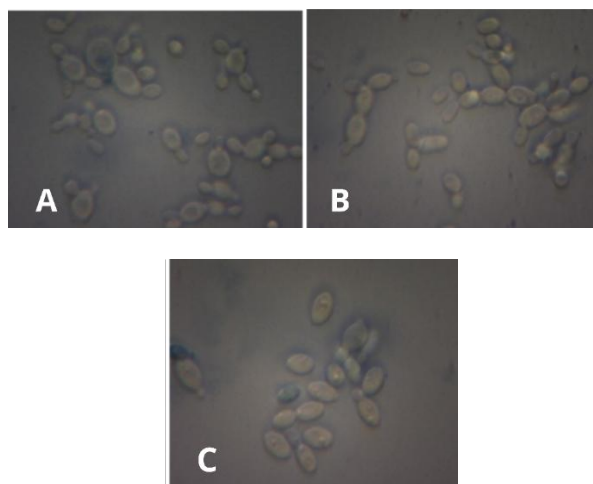
**Tabela 1.** Taxa de crescimento e tempo de geração da *Candida akabanensis* Ufvjm R131 em meio YPMX contendo diferentes concentrações de etanol

Concentração de etanol (%)	Taxa de crescimento $\mu_{\text{Max}} (\text{h}^{-1})$	Tempo de geração $t_g (\text{h}^{-1})$
0*	0,41±0,02 <sup>a</sup>	1,69±0,07 <sup>b</sup>
2	0,34±0,01 <sup>a</sup>	2,01±0,03 <sup>b</sup>
4	0,28±0,01 <sup>a</sup>	2,44±0,06 <sup>b</sup>
6	0,30±0,14 <sup>a</sup>	3,39±1,92 <sup>b</sup>
8	0,03±0,01 <sup>b</sup>	18,24±19,75 <sup>a</sup>

\*Controle. Letras iguais na coluna correspondente indicam que não há diferença estatística ao nível de 95% de significância pelo teste de Tukey.

A seguir se encontram os aspectos celulares da linhagem *C. akabanensis* com 12 horas de cultivo no meio YPMX sendo: i) Controle; ii) meio com 4% de etanol e iii) meio com 8% de etanol (Figura 3). Foi observado células da levedura viáveis, com brotamento e formação de pseudo-hifa, características comuns da referida linhagem (VALINHAS et al., 2018). À medida que a concentração de

etanol foi aumentando o número de células viáveis foi reduzindo. Este fato pode estar relacionado com a ação do etanol que altera a fluidez e a permeabilidade da membrana plasmática e modifica o pH do citosol e a ingestão de nutrientes. Conseqüentemente, o estresse causado pelo etanol diminui rapidamente o processo de divisão celular, e ainda, afeta a sua viabilidade (PINTO et al., 2024).



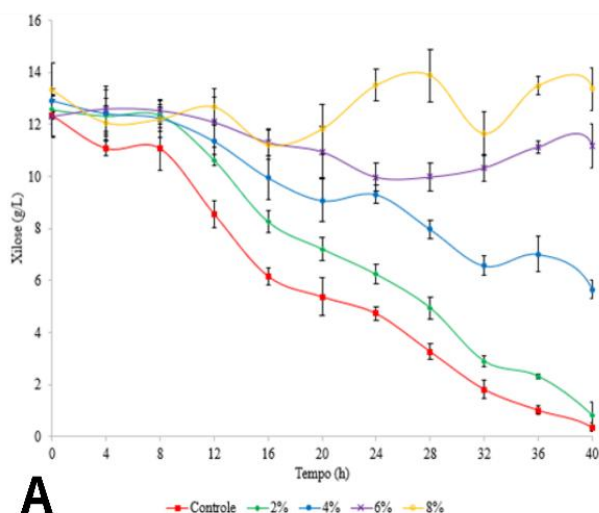
**Figura 3.** Aspecto microscópico da linhagem de *Candida akabanensis* Ufvjm R131, isolada de bagaço de cana-de-açúcar, aumento de 100x com 48 horas de cultivo em meio YPMX. A) aspecto das leveduras provenientes do processo fermentativo sem adição de etanol (controle), B) aspecto das leveduras com provenientes do processo fermentativo contendo 6% de etanol e, C) aspecto das leveduras provenientes do processo fermentativo contendo 8% de etanol.

### 3.1- Consumo de xilose

Considerando o comportamento do consumo de açúcares redutores (AR) no meio fermentativo sem adição de etanol, controle, foi possível observar, que, este álcool, afetou o consumo de açúcares em todas as concentrações estudadas (Figura 4). Na ausência do etanol, no início do processo, a levedura estudada, demonstrou capacidade de consumir xilose desde as primeiras horas de fermentação, chegando alcançar 0,41 g de açúcar em 40 horas, ou seja, consumiu quase todo o açúcar disponível no meio.

No processo foi observado que na presença de 2% e 4% de etanol, o consumo de xilose iniciou após 8 h de fermentação e na presença de 6%, o consumo da xilose foi de 1,65 g dos 9,77 g de xilose inicial, o que

representa um consumo de apenas 16,89% (Tabela 2). Na presença de 8% de etanol foi observado um baixo consumo de açúcar no meio fermentativo para processos com *C. akabanensis* não aclimatada ( $0,35 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ ).



**Figura 4.** Consumo de açúcares redutores em processos fermentativos conduzidos com *Candida akabanensis* UFVJM R131 em meio YPMX elaborados com diferentes concentrações de etanol (0%, 2%, 4%, 6% e 8%).

No processo de fermentação foi possível observar que o consumo médio de xilose foi afetado pela presença de etanol a partir de 4%, pois, diminuiu gradativamente à medida que a concentração aumentava. Não foi observado diferença significativa entre os valores de consumo de xilose na presença de 6 e 8% de etanol. (Tabela 2). Este fato pode estar atrelado aos efeitos negativos que o etanol causa nas células, dentre estes estão: i. aqueles que afetam as organelas celulares à medida que sua concentração aumenta, interrompendo, assim, as atividades celulares, ii. afetam a absorção de açúcares e aminoácidos e, iii. provocam uma redução na atividade enzimática (AUESUKAREE, 2017).

**Tabela 2.** Concentração de xilose inicial e final em  $\text{g L}^{-1}$  realizado em HPLC, em processos fermentativos conduzidos com *Candida akabanensis* UFVJM R131, em meio YPMX, contendo diferentes concentrações de etanol (0%, 2%, 4%, 6% e 8%).

Concentração de etanol (%)	Xilose inicial $\text{g L}^{-1}$	Xilose final $\text{g L}^{-1}$
0	$9,38 \pm 0,12^a$	$0,41 \pm 0,02^b$
2	$9,61 \pm 0,10^a$	$1,09 \pm 0,08^b$
4	$9,74 \pm 0,168^a$	$3,54 \pm 0,09^b$
6	$9,77 \pm 0,06^a$	$8,12 \pm 0,07^b$
8	$9,86 \pm 0,07^a$	$9,50 \pm 0,06^b$

Letras iguais na linha da sua respectiva levedura (aclimatada ou não aclimatada) correspondente indicam que não há diferença estatística ao nível de 95% de significância pelo teste de Tukey.

### 3.2. Quantificação do teor de etanol e parâmetros fermentativos

Na Tabela 3 estão apresentados os dados de produção e consumo de etanol, dos processos de fermentações elaborados com meios contendo diferentes concentrações de etanol e conduzidos com as leveduras *C. akabanensis*. Os dados obtidos indicam que as leveduras produziram etanol no meio controle (0%), porém, nos meios com mais de 2% de etanol não foi observado incremento na concentração de etanol.

**Tabela 3.** Concentração da produção e consumo de etanol em  $\text{g L}^{-1}$  realizado em HPLC, em processos fermentativos conduzidos com *Candida akabanensis* UFVJM R131, em meio YPMX, contendo diferentes concentrações de etanol

Concentração de etanol (%)	Etanol inicial $\text{g L}^{-1} \pm \text{DP}$	Etanol final $\text{g L}^{-1} \pm \text{DP}$
0 *	$0^a$	$1,71 \pm 0,02^b$
2	$13,09 \pm 0,31^a$	$13,33 \pm 0,48^a$
4	$28,66 \pm 1,55^a$	$26,05 \pm 0,52^a$
6	$44,06 \pm 0,45^a$	$39,21 \pm 1,86^a$
8	$57,67 \pm 1,62^a$	$54,51 \pm 0,44^a$

Letras iguais na linha da sua respectiva levedura (aclimatada ou não aclimatada) correspondente indicam que não há diferença estatística ao nível de 95% de significância pelo teste de Tukey.

#### 4 - Conclusões

O presente estudo evidenciou, que a linhagem de *Candida akabanensis* Ufvjm R131, foi de alguma forma afetada pela presença de etanol em concentrações superiores a 2%, influenciando negativamente no crescimento celular.

A levedura teve a capacidade de produzir etanol apenas no meio controle.

*C. kabanensis* Ufvjm R131 foi capaz de crescer na presença de até 6% de etanol, sendo este delongado nas concentrações acima de 4%.

O consumo da xilose foi afetado à medida que a concentração de etanol aumentava no meio de fermentação, sendo este totalmente inibido em concentrações de 8% de etanol.

Visando superar as limitações encontradas neste trabalho, sugere-se que, em estudos subsequentes, seja avaliada a adaptação celular voltada para a tolerância ao etanol, viabilizando, dessa forma, a utilização dessa levedura em processos industriais.

#### 5 - Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT-UFVJM), Programa de Pós Graduação em Biocombustíveis (PPGBiocombustíveis) da UFVJM, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

#### 6 - Referências

AUESUKAREE, C. **Mecanismos moleculares da resposta adaptativa da levedura e tolerância aos estresses encontrados durante a fermentação alcoólica.** Journal of Bioscience and Bioengineering , v. 124, n. 2, pág. 133–142, Agosto. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.009>.

COT, M. et al. **Comportamento fisiológico de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação aerada**

**descontínua para alta produção de bioetanol.** FEMS Yeast Research , v. 7, n. 1, p. 22–32, jan. 2007.

NANDAL, P.; SHARMA, S.; ARORA, A. **Bioprospecting non-conventional yeasts for ethanol production from rice straw hydrolysate and their inhibitor tolerance.** Renewable Energy, v. 147, p. 1694–1703, 2020.

PINTO,C.M; SCHNEPPER, A.P.;TRINDADE,P.H.E.; CARDOSO,L.H.;FIORETTO,M.N.;JUSTULIN,L.A.; ZANELLI,C.F.; VALENTE,G.T.; **The joint action of yeast eisosomes and membraneless organelles in response to ethanol stress.** Heliyon, v.10, 2024.

Sanjukta Subudhi et al., Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2024.105616>.

SAINI,P. BENIWAL, A. KOKKILIGADDA, A. VIJ. **Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation.** Process Biochemistry, v. 72, p.1-12, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.001>

SINGH A; SINGHANIA, R. R; SOAM.: **CHEA.Production of bioethanol from food waste: Status and perspectives.** 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127651>

SUBUDHI, S.; MUDGIL; D; SAHAA, K.; SARANGI, K. P.; PAL, P. **Yeast as a cell factory for the fermentative production of ethanol from xylose.** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2024.<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2024.105616>

TORTORA, G. J. **Princípios de Anatomia Humana.** 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

VALINHAS, R. V.; PANTOJA, L. A.; MAIA, A. C. F; MIGUEL, M. G. C. P.; VANZELA, A. P. F. C; NELSON, D. L; SANTOS, A. S. **Xylose fermentation to etanol by new.Galactomyces geotrichum and Candida akabanensis strains.** PeerJ. 4673, p.16, 2018.

WU, C; GUO, J; JIAN, H; LIU, L; ZHANG, H; YANG,N; XU,H; LEI,H. **Bioactive dipeptides enhance the tolerance of lager yeast to ethanol-oxidation cross-stress by regulating the multilevel defense system.** Food Microbiology, v. 114, 2023 . <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104288>