

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE 2-FENILETANOL POR LEVEDURAS ASSOCIADAS A PLANTAS E INSETOS

STÉFANY KELL BRESSAN^{1,2*}, ANDERSON GIEHL^{2,3}, CAMILA GIRARDI DE OLIVEIRA², ODINEI FOGOLARI², SÉRGIO LUIZ ALVES JR.^{1,2,3}.

1 Introdução

A crescente demanda por compostos naturais de alto valor agregado tem incentivado o desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis. Dentre esses compostos, destaca-se o 2-feniletanol (2-PE), álcool aromático com odor de rosas utilizado em diferentes setores industriais devido às suas propriedades organolépticas, antifúngicas e antimicrobianas (Guo et al., 2018; Martínez-Avila et al., 2018). Tradicionalmente produzido quimicamente, o 2-PE gera impactos ambientais significativos, porém sua produção biotecnológica por leveduras, por meio das vias de Chiquimato (a partir de açúcares) ou Ehrlich (a partir de L-fenilalanina), surge como alternativa (Mitri et al., 2022).

Leveduras selvagens, isoladas de plantas e insetos, têm demonstrado maior tolerância e diversidade metabólica, sendo mais eficientes que cepas industriais na síntese de compostos aromáticos (Gamero et al., 2016). Além disso, uso de resíduos agroindustriais como meio de cultivo reduz custos e favorece o reaproveitamento (Mitri et al., 2022). A casca de laranja, resíduo abundante da produção de suco no Brasil, é rica em açúcares (Minussi et al., 2024), e o bagaço de malte, resíduo da indústria cervejeira, rico em proteínas e L-fenilalanina (Mussatto, 2014). Assim, juntos, esses resíduos são promissores para a produção de 2-PE. Suplementos nitrogenados, como ureia e sulfato de amônio, podem ainda aumentar a produtividade, desde que os pré-tratamentos dos resíduos liberem açúcares e aminoácidos adequadamente (Alonso-Vargas et al., 2022; Minussi et al., 2024; Schmidt et al., 2023).

2 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo viabilizar a produção de 2-feniletanol a partir de resíduos agroindustriais — casca de laranja e bagaço de malte — por meio de bioprocessos conduzidos por leveduras selvagens.

3 Metodologia

3.1 Preparação dos Extratos

Cascas de laranja e bagaço de malte fornecidos secos, triturados e peneirados pelo

¹Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, campus Chapecó. Stefany.bressan@uffs.edu.br

² Grupo de Pesquisa: Laboratório de Bioquímica de Leveduras – LabBiolev.

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina -UFSC.

Laboratório de Resíduos Sólidos da UFFS (campus Chapecó) foram utilizados para preparar extratos. O extrato de casca de laranja foi obtido adicionando o resíduo à água destilada (15:100 p/v), homogeneizado e incubado em banho-maria a 90 °C por 30 min, seguido de centrifugação (6000 g, 15 min) e filtração a vácuo. O extrato de bagaço de malte, visando à extração de proteínas, foi tratado com NaOH 0,1 M (1:40 p/v), incubado a 95 °C por 4 h, e posteriormente processado da mesma forma. Ambos os extratos foram produzidos em triplicata.

3.2 Triagem de Leveduras

As leveduras utilizadas pertencem à coleção do Laboratório de Bioquímica de Leveduras da UFFS – campus Chapecó, preservadas em 30% de glicerol a -80 °C. Essas linhagens foram isoladas de flores e insetos (Fenner *et al.*, 2025), tendo em vista sua capacidade de produção de 2-PE nesses ambientes. As cepas utilizadas foram: CHAP-208, CHAP-209, CHAP-211, CHAP-213, CHAP-214, CHAP-215, CHAP-216, CHAP-219, CHAP-220, CHAP-221, CHAP-242, CHAP-245 e CHAP-248, sendo as três últimas isoladas de abelhas (*Scaptotrigona postica* e *Tetragonisca angustula*) e as demais de flor (*Senna macranthera*). As leveduras foram inicialmente submetidas a um pré-inóculo em frascos de 25 mL contendo 5 mL de meio sólido YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose e 20 g/L de ágar) incubados a 30 °C por 72 horas. Após esse período, as linhagens foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo meio com 50 g/L de sacarose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, incubados por 96 horas a 30 °C sob agitação (145 rpm).

3.3 Cultivo de Leveduras nos Extratos

A levedura que apresentou maior capacidade de síntese de 2-PE foi submetida a um pré-inóculo em meio YPD contendo ágar, conforme descrito anteriormente. Em seguida, foi cultivada em duplicata nos seguintes meios: extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte (M1), extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 2,8 g/L de ureia (M2), extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 5 g/L de sulfato de amônio (M3). Os dois extratos utilizados (casca de laranja e bagaço de malte) foram, em todos os casos, misturados na proporção 1:1. A ureia (meio M2) e o sulfato de amônio (meio M3) foram dissolvidos nessa mistura. Todos os meios foram filtrados a vácuo após serem ajustados ao pH 5,0.

Os cultivos foram mantidos a 30 °C e 145 rpm por 72 h, com amostras coletadas periodicamente para leitura da densidade óptica (DO 570 nm), permitindo a construção de

curvas de crescimento. Ao final, os sobrenadantes foram separados por centrifugação para análise de 2-PE. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

3.4 Quantificação de açúcares, proteínas e 2-PE

A concentração de açúcares redutores nos extratos de casca de laranja foi determinada pelo método DNS em microplaca (Santos et al., 2017). As proteínas do bagaço de malte foram quantificadas pelo método de Bradford, e o 2-PE foi medido por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna C-18.

4 Resultados e Discussão

O extrato de casca de laranja apresentou elevado teor de açúcares ($78,754 \pm 5,354$ g/L), revelando alto potencial como fonte de carbono para o metabolismo das leveduras. O extrato de bagaço de malte apresentou teor considerável de proteínas ($2,795 \pm 0,598$ g/L), que podem fornecer aminoácidos essenciais, incluindo a L-fenilalanina, precursora direta do 2-PE.

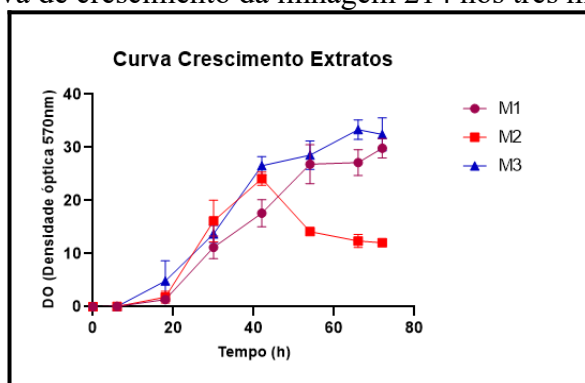
Os resultados obtidos através da triagem das leveduras indicam que a linhagem CHAP-214 apresentou a maior produção de 2-feniletanol ($145,736 \pm 4,91$ mg/L), destacando-se entre todas as avaliadas (Tabela 1). Portanto, a CHAP-214 foi incubada nos extratos produzidos. A Figura 1 apresenta o crescimento dessa linhagem nos diferentes meios de cultivo. Todas as culturas apresentaram fase lag curta, seguida por aumento da densidade óptica (fase exponencial). O meio M2 apresentou crescimento mais rápido até 40 h, alcançando a maior DO nesse ponto, mas apresentou declínio subsequente, sugerindo possível queda de nutrientes ou acúmulo de metabólitos inibidores, como etanol ou 2-PE, como apresentado por Gamero et al. (2016), que destacam o efeito inibitório desses compostos aromáticos.

Tabela 1 - Produção de 2-PE por diferentes linhagens de leveduras.

Linhagem	Concentração 2-PE (mg/L)
208	$0,000 \pm 0,00$
209	$61,959 \pm 0,58$
211	$114,833 \pm 2,19$
213	$80,143 \pm 2,50$
214	$145,736 \pm 4,91$
215	$139,024 \pm 4,72$
216	$0,000 \pm 0,00$
218	$0,000 \pm 0,01$
219	$42,305 \pm 3,44$
220	$136,401 \pm 2,18$
221	$63,107 \pm 6,23$
242	$90,478 \pm 0,39$
245	$62,178 \pm 1,36$
248	$85,266 \pm 5,71$

Fonte: autoria própria (2025).

Figura 1 – Curva de crescimento da linhagem 214 nos três meios de testados.



Fonte: autoria própria (2025).

Já M1 e M3 mantiveram crescimento mais estável. O M3, em especial, apresentou o maior valor final de DO (~35) após 72 h, sugerindo que sua composição apresenta maior equilíbrio entre fontes de carbono e nitrogênio, possibilitando o desenvolvimento celular.

A Tabela 2 mostra que, no meio M2, a levedura não produziu 2-PE, possivelmente devido à baixa disponibilidade de precursores aromáticos ou condições desfavoráveis para a via de Ehrlich (Wang et al., 2018). O meio M3, embora tenha apresentado maior densidade óptica, proporcionou menor produção de 2-PE que o M1, sugerindo que a suplementação com sulfato de amônio favoreceu o crescimento celular em detrimento da síntese secundária do 2-PE (Alonso-Vargas et al., 2022).

Tabela 2 – Produção de 2-PE pela CHAP-214 nos três meios testados.

Meio Extrato	Concentração 2-PE (mg/L)
M1	5,73 ± 0,82
M2	0,00 ± 0,00
M3	2,99 ± 0,27

Fonte: autoria própria (2025).

O desempenho superior da levedura no meio M1 pode ser atribuído à complexidade nutricional dos resíduos. A casca de laranja fornece açúcares para crescimento e energia da via de Ehrlich, enquanto o bagaço de malte oferece aminoácidos, como a L-fenilalanina, precursor do 2-PE. Essa interação entre carbono e nitrogênio é reconhecida como essencial para maximizar a biossíntese de 2-PE (Mitri et al., 2022).

5 Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que os resíduos agroindustriais podem servir como fontes de nutrientes para bioprocessos com leveduras, possibilitando a produção de compostos de grande importância industrial. Entretanto, para que essa produção seja eficiente, são necessários mais estudos que busquem otimizar o processo, de modo a gerar quantidades

expressivas do composto desejado, o 2-PE.

Referências Bibliográficas

- ALONSO-VARGAS, Monserrat et al. Optimization of 2-Phenylethanol Production from Sweet Whey Fermentation Using *Kluyveromyces marxianus*. *Fermentation*, v. 8, n. 2, p. 39, 2022.
- GAMERO, Amparo et al. High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiology*, v. 60, p. 147–159, dez. 2016.
- FENNER, Eduardo Dias et al. Ethanol and 2-phenylethanol production by bee-isolated *Meyerozyma caribbica* strains. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, v. 55, n. 3, p. 359–369, 2025.
- GUO, Daoyi et al. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of 2 Phenylethanol and 2-Phenylethyl Acetate from Glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 23, p. 5886–5891, 2018.
- MARTÍNEZ-AVILA, Oscar et al. Bioprocesses for 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 23, p. 9991–10004, 2018.
- MINUSSI, Gabriel do Amaral et al. Transforming orange waste with yeasts: bioprocess prospects. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*, v. 59, p. e1859, 2024.
- MITRI, Sara; et al, Nicolas. Bioproduction of 2-Phenylethanol through Yeast Fermentation on Synthetic Media and on Agro-Industrial Waste and By-Products: A Review. *Foods*, v. 11, n. 1, p. 109, 2022.
- MUSSATTO, Solange I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 94, n. 7, p. 1264–1275, 2014.
- SCHMIDT, Aline Ruth et al. Applications of Brewer's Spent Grain Hemicelluloses in Biorefineries: Extraction and Value-Added Product Obtention. *Catalysts*, v. 13, n. 4, p. 755, 2023.
- TORRADO, Ana María et al. Citric acid production from orange peel wastes by solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 394–409, 2011.
- WANG, Zhaoyue et al. Reconstruction of metabolic module with improved promoter strength increases the productivity of 2-phenylethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, v. 17, n. 1, p. 60, 2018.

Palavras-chave: 2-PE, Resíduos agroindústrias, Casca de Laranja e Bagaço de Malte.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2024-0470

Financiamento

