

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE FONTES AMILÁCEAS

RENATA L. A. WOSNIAK^{1*}, AMANDA F. GASPARIN¹, ANDERSON GIEHL²,
ANGELA A. DOS SANTOS DE ALMEIDA³, SÉRGIO L. ALVES JR.⁴

1 Introdução

O aumento da demanda por energia tem impulsionado a busca por fontes energéticas renováveis, no Brasil o etanol tem destaque desde o programa ProÁlcool, devido à sua renovabilidade e rápida produção. Visando o aumento da produção de etanol, almejando a transição de uma matriz mais limpa e reduzir a dependência da gasolina, fontes amiláceas como o milho, trigo e triticale podem auxiliar nesse incremento. Nesse contexto, as amilases, especialmente as α -amilases, são necessárias para a hidrólise das ligações α -1,4 de glicose presente no amido, frequentemente aplicadas em processos de etanol de milho (dos Santos *et al.*, 2026). As leveduras presentes em diversos ecossistemas, podem apresentar características de interesse industrial, especialmente as associadas à batatas, que para acessar a glicose presente no amido necessitam dessas enzimas (Carreiro *et al.*, 2011). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de produção de amilases por leveduras isoladas da batata e a assimilação de açúcares presentes nos processos fermentativos de primeira geração, visando contribuir para a viabilização da produção de etanol em maior escala reduzindo a necessidade de enzimas exógenas e flexibilizando a produção desse álcool.

2 Objetivos

Isolar, caracterizar a assimilação dos carboidratos presente no etanol de primeira geração e identificar leveduras associadas a batatas, visando a redução da necessidade do emprego de enzimas exógenas e flexibilizando a produção desse álcool.

3 Metodologia

3.1 Isolamento de leveduras: As amostras de batata-doce branca (*Ipomoea batatas*) foram

1 Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária, UFFS, *campus* Chapecó, renatalw28@gmail.com*
2 Doutorando em Biotecnologia e Biociências, UFSC, *campus* Trindade/CCB
3 Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UDESC, *campus* Pinhalzinho
4 Doutor em Ciências, USP, **Orientador**

coletadas em uma horta domiciliar, no município de Iporã do Oeste, Santa Catarina. A partir das amostras de batatas coletadas, pedaços pequenos cortados foram adicionados em meios YP (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, pH 5,0) contendo 0,2 g/L de cloranfenicol e 20 g/L de maltose ou 20 g/L de amido solúvel. Os frascos foram mantidos em shaker a temperaturas de 10, 30 e 40 °C até o meio de cultivo apresentar alta turbidez. As etapas do isolamento seguiram conforme descritas por Tadioto *et al.* (2022), porém com incubações nas três diferentes temperaturas. Os 22 isolados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Isolados de leveduras obtidos de amostras de batata. Os isolamentos foram realizados em meios com amido ou maltose incubados sob diferentes temperaturas

Meio de isolamento	Temperatura de isolamento	Código das linhagens isoladas
YP+Amido	30°C	CHAP-525, CHAP-526, CHAP-527
	10°C	CHAP-598, CHAP-599, CHAP-600, CHAP-601, CHAP-602, CHAP-603
	30°C	CHAP-528, CHAP-529, CHAP-532, CHAP-533
	40°C	CHAP-547, CHAP-548, CHAP-588, CHAP-589, CHAP-590, CHAP-591, CHAP-592, CHAP-593, CHAP-594
YP+Maltose		

3.2 Prospecção de leveduras amilolíticas: Para a prospecção de leveduras com atividade amilolítica, foi utilizado meio YP sólido (com 20 g/L de ágar) contendo 20 g/L de amido. Foram testadas 84 linhagens de leveduras (os 22 isolados da Tabela 1 e outros 62 isolados de mandioca, oriundos de outro trabalho deste grupo de pesquisa), com incubação a 30 °C por 96 h. A atividade amilolítica foi avaliada pela formação de halos de hidrólise após a aplicação de solução de Lugol sobre a superfície do meio.

3.3 Cultivo em microescala: Oito linhagens selecionadas aleatoriamente foram pré-cultivadas em meio YP sólido com 20 g/L de glicose (YPDA) por 48 h a 30 °C. O preparo da microplaca de 96 poços foi realizado conforme Giehl *et al.* (2025). Foram utilizados meios YP contendo 20 g/L de glicose, sacarose, maltose ou maltotriose. A microplaca foi incubada em leitor de microplaca (Varioskan, Thermo Scientific) por 24 h, a 30 °C e 180 rpm. As medidas de Densidade Ótica (DO) foram realizadas a cada hora com comprimento de onda de 600 nm.

3.4 Identificação de leveduras: As três linhagens de melhor desempenho foram pré-cultivadas em meio YPDA por 24 h a 30 °C. Após, com auxílio de um palito de dente estéril, a biomassa de uma colônia foi coletada e depositada (em triplicata) em poços de placa específica para a identificação de massas por Dessorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz com Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS). Posteriormente, em cada

poço foi adicionado 1 μ L de ácido fórmico 70% sobre a biomassa. Após secagem, adicionaram-se 10 mg/mL de ácido α -Ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) eluído em solução 33:33:33 de etanol:acetonitrila:ácido trifluoracético 10% (Cassagne *et al.*, 2013). Após a identificação dos espectros de massas no equipamento Axima Confidence MALDI-TOF (Shimadzu), os espectros obtidos foram comparados a base de dados SARAMIS do mesmo equipamento e indicado o percentual de identidade em relação aos espectros de espécies “tipo” presentes.

4 Resultados e Discussão

Com o intuito de avaliar o potencial hidrolítico frente ao amido, a triagem inicial dos 84 isolados avaliados, em placas contendo meios sólidos com amido e posteriormente coradas com lugol, não revelaram casos positivos para a presença de amilases nos isolados. Embora tenha ocorrido crescimento das leveduras, conforme exemplificado na Figura 1, não houve formação de halos para os 84 isolados testados. O crescimento decorreu do metabolismo dos nutrientes presentes no extrato de levedura e na peptona, e não do consumo do amido.

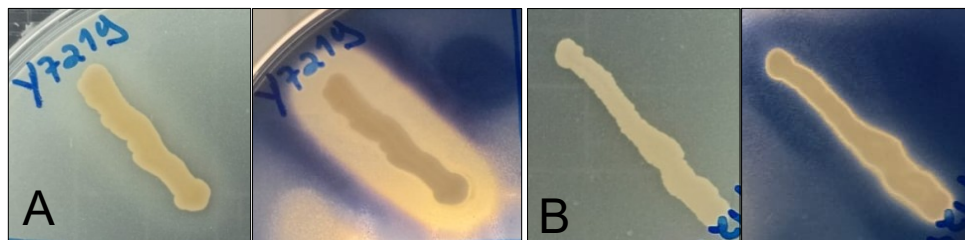


Figura 1. Ilustração do teste de atividade amilolítica realizado. Como exemplo, a figura apresenta o controle positivo *Saitozyma flava* Y7219 (A) e a cepa CHAP-548 (B) após o cultivo em placas de Petri (imagens à esquerda em A e B) e aplicação do lugol (imagens à direita em A e B).

Para compreender melhor a assimilação de carboidratos presentes na produção de etanol de primeira geração, oito isolados foram submetidos a cultivos em microescala contendo glicose, sacarose, maltose ou maltotriose. Todas as leveduras se mostraram capazes de crescer frente a esses carboidratos (Figura 2), porém o aumento da DO para maior parte dos isolados se deu nos cultivos em glicose e sacarose, o que pode indicar a falta de transportadores funcionais para o transporte de maltotriose, que necessita ser encaminhada para o interior da célula para que α -glicosidases atuem na clivagem e liberem glicose (Alves *et al.*, 2018).

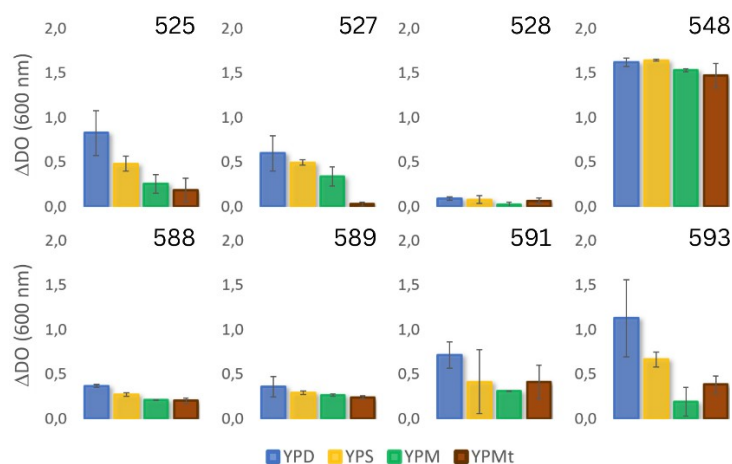


Figura 2. Incremento de biomassa estimado em densidade óptica (ΔDO , medido em unidades de absorvância a 600 nm) das linhagens CHAP-525, CHAP-527, CHAP-528, CHAP-548, CHAP-588, CHAP-589, CHAP-591 e CHAP-593 (conforme apontado nos gráficos de barra) cultivadas em microescala em meios contendo glicose (YPD), sacarose (YPS), maltose (YPM) ou maltotriose (YPMt) com fonte de carbono. Cada condição experimental foi avaliada em triplicata, e os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Os três isolados que apresentaram maior incremento da DO foram identificados por MALDI-TOF como pertencentes a espécie *Meyerozyma guilliermondii*, com uma identidade de 99,90%. As curvas de crescimento dessas linhagens estão apresentadas na Figura 3. Apesar de não apresentar amilases, essa espécie se destaca por possuir alta osmotolerância e produzir altas concentrações de etanol, além de expressar a enzima β -glicosidase, se mostrando versátil como potencial uso em usinas que visam utilizar fontes amiláceas, de sacarose e resíduos lignocelulósicos misturados ou variando a fonte ao longo do ano (da Silva *et al.* 2019).

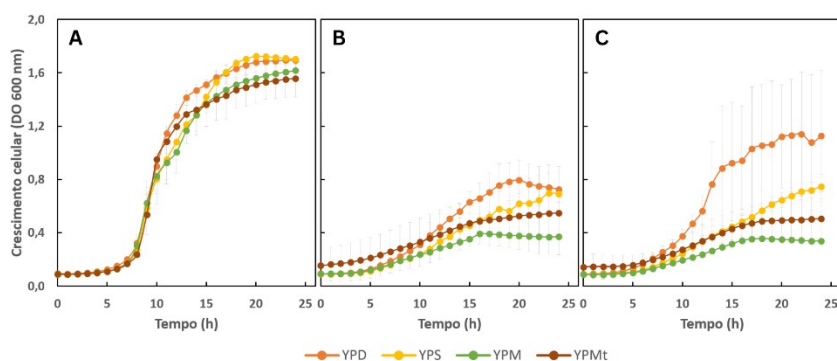


Figura 3. Crescimento celular estimado em densidade óptica (DO, medido em unidades de absorvância a 600 nm) das linhagens CHAP-548 (A), CHAP-591 (B) e CHAP-593 (C) cultivadas em microescala em meios contendo glicose (YPD), sacarose (YPS), maltose (YPM) ou maltotriose (YPMt) com fonte de carbono. Cada condição experimental foi avaliada em triplicata, e os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

5 Conclusão

Apesar dos isolados obtidos em materiais ricos em amido não apresentarem atividade

amilolítica, as linhagens identificadas como *M. guilliermondii* (CHAP-548, CHAP-591 e CHAP-593) demonstram potencial no aproveitamento dos açúcares obtidos na hidrólise do amido e como possíveis candidatas para a produção de etanol a partir de fontes amiláceas.

Referências Bibliográficas

- ALVES, S. L., Jr, *et al.* Extracellular maltotriose hydrolysis by *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking the *AGT1* permease. **Letters in Applied Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 377–383.
- CARREIRO, S. C. et al. Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Revista de Biociências**, Taubaté, v. 17, n. 2, p. 15-24, 2011.
- CASSAGNE, C.*et al.* Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. **Medical Mycology**, v. 51, Issue 4, p. 371–377, 2013.
- DA SILVA, R. R. et al. Biochemical characteristics and potential application of a novel ethanol and glucose-tolerant β -glucosidase secreted by *Pichia guilliermondii* G1.2. **Journal of Biotechnology**, v. 294, p. 73-80, 2019.
- DOS SANTOS, A. A *et al.* Chapter 4 - Current status and new avenues for first- and second-generation ethanol: Integrating processes and yeasts, Editor(s): Anuj K. Chandel, Fanny M. Jofre, Júlio C. dos Santos, Maria G.A. Felipe. **Yeast Biotechnology and Biorefinery**, Elsevier, 2026, pg. 75-104.
- GIEHL, A. *et al.* Prospecting Araucaria-Associated Yeasts for Second-Generation Biorefineries. **Sustainability**. 2025, v. 17, 8134.
- TADIOTO, V. *et al.* Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. **World J Microbiol Biotechnol**. 2022; v. 38(2):35.

Palavras-chave: Amido, Fermentação, Hidrólise, Maltose e Maltotriose

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2025-0278

Financiamento:

