

FERMENTAÇÃO DE MALTOSE E MALTOTRIOSE POR LEVEDURAS ISOLADAS DA NATUREZA

AMANDA FIDELIS GASPARIN^{1*}, RENATA L. A. WOSNIAK¹, ANDERSON GIEHL²,
ANGELA A. DOS SANTOS DE ALMEIDA³, SÉRGIO LUIZ ALVES JR.⁴

1 Introdução

A produção de bioetanol a partir de matérias-primas ricas em amido, como a mandioca, consolida-se como uma alternativa sustentável aos combustíveis fósseis (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Após a hidrólise enzimática do amido em açúcares fermentescíveis, as leveduras convertem esses carboidratos em etanol e outros metabólitos de interesse biotecnológico. Nesse contexto, a prospecção de leveduras selvagens em matrizes vegetais constitui um nicho promissor para a seleção de novas linhagens com elevada diversidade metabólica (FLEET, 2003). Diante disso, a caracterização de leveduras isoladas desses substratos pode contribuir para a identificação de linhagens com potencial de aplicação em processos fermentativos a partir de hidrolisados de amido.

2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo isolar, identificar e avaliar o crescimento de leveduras associadas a mandioca diante dos carboidratos presentes em dornas de fermentação de etanol de primeira geração, visando selecionar isolados com potencial biotecnológico.

3 Metodologia

3.1 Isolamento: Em uma horta domiciliar, no município de Iporã do Oeste-SC, foram coletadas amostras de caule e raízes de mandioca (*Manihot esculenta*). Pequenos pedaços das amostras coletadas 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 cultivo apresentar turbidez. Para a obtenção de colônias isoladas puras e conservação dos isolados, seguiu-se o protocolo descrito por Giehl *et al.* (2025), porém com cultivos nas diferentes temperaturas.

¹ Graduada em Eng. Ambiental e Sanitária, UFFS, campus Chapecó, gasparinamanda2017@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**

3.2 Cultivo em microescala: Vinte e três linhagens selecionadas aleatoriamente foram pré-cultivadas em meio YP sólido contendo 20 g/L de glicose e 20 g/L de ágar (YPDA) por 48 h a 30 °C. Após esse pré-cultivo, com o auxílio de uma alça de inoculação calibrada para 1 µL, as células foram coletadas, ressuspensas em 100 µL de água destilada estéril e agitadas no vórtex. Subsequentemente, inoculou-se 1 µL da suspensão de células de cada isolado em poços de microplacas de 96 poços contendo 100 µL de meio YP acrescido de 20 g/L de glicose, sacarose, maltose ou maltotriose. A placa foi selada e incubada em um leitor de microplaca Varioskan Lux (Thermo Scientific) por 24 h, sob agitação orbital a 180 rpm e a 30 °C. O crescimento celular foi monitorado pela densidade ótica (DO) a 600 nm (Giehl *et al.*, 2025).

3.3 Identificação de leveduras: A identificação foi realizada por MALDI-TOF MS pela deposição de colônias frescas sobre placa metálica, previamente tratada com 1 µL de ácido fórmico (70%) e 1 µL de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico). Consideraram-se identificações com índice de similaridade igual ou superior a 95% (Cassagne *et al.*, 2013).

4 Resultados e Discussão

A partir do isolamento de leveduras realizado em amido e maltose sob diferentes temperaturas, obtiveram-se 63 isolados. Na Tabela 1, é possível observar que a maioria dos isolados foram obtidos a 40 °C, sendo um total de 40. Essa temperatura favorece o crescimento de microrganismos mesófilos, que se desenvolvem bem numa faixa de temperatura de 20 a 45 °C. Algumas leveduras reconhecidas como tolerantes a temperatura de 40° C, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Meyerozyma* spp., *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia kudriavzevii*, foram isoladas de ambientes industriais (Tolieng et al., 2017) e de nuruk (Choi et al., 2017).

Tabela 1. Isolados de leveduras obtidos a partir de amostras de mandioca. 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-519, CHAP-521, CHAP-523, CHAP-524, CHAP-530, CHAP-531, CHAP-537, CHAP-538, CHAP-539, CHAP-540, CHAP-543, CHAP-551, CHAP-552, CHAP-553, CHAP-564, CHAP-595
	40°C	CHAP-549, CHAP-550, CHAP-554, CHAP-555, CHAP-556, CHAP-557, CHAP-558, CHAP-559, CHAP-575, CHAP-576, CHAP-577, CHAP-578, CHAP-579, CHAP-580

MENINAS E MULHERES NA CIÊNCIA

YP+Maltose	10°C	CHAP-596, CHAP-597
	30°C	CHAP-520, CHAP-522, CHAP-536, CHAP-541, CHAP-542, CHAP-544, CHAP-560
	40°C	CHAP-534, CHAP-535, CHAP-549, CHAP-550, CHAP-561, CHAP-562, CHAP-563, CHAP-565, CHAP-566, CHAP-567, CHAP-568, CHAP-569, CHAP-570, CHAP-571, CHAP-572, CHAP-573, CHAP-574, CHAP-581, CHAP-582, CHAP-583, CHAP-584, CHAP-585, CHAP-586, CHAP-587

No intuito de avaliar a assimilação de carboidratos, presentes na produção do etanol de primeira geração, realizou-se cultivos em microescala frente a meios contendo glicose, sacarose, maltose e maltotriose. Como observado na Figura 1, os isolados apresentaram diferentes incrementos de DO após 24 h de cultivo, sendo os isolados CHAP-519, CHAP-522, CHAP-583, CHAP-584 e CHAP-597 os que mais tiveram incremento em biomassa nesse período de tempo.

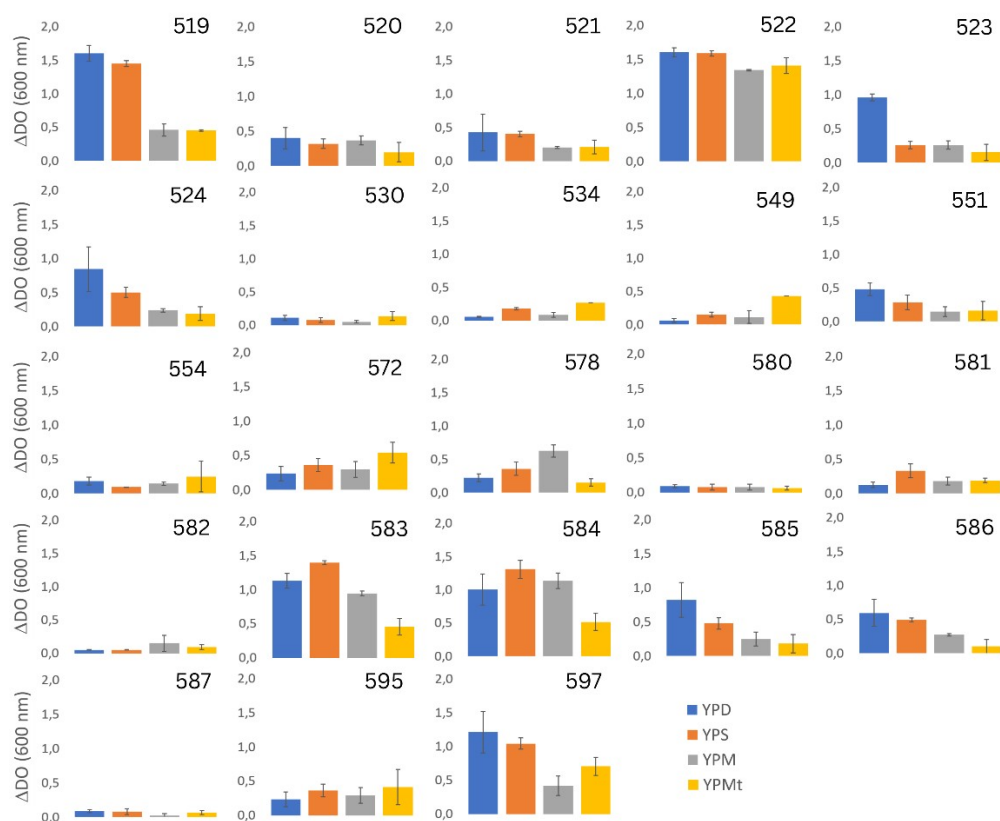


Figura 1. Incremento de biomassa estimado em densidade óptica (ΔDO , medido em unidades de absorvância a 600 nm) das linhagens CHAP-519, 520, 521, 522, 523, 524, 530, 534, 549, 551, 554, 572, 578, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 595 e 597 (conforme apontado nos gráficos de barra) cultivadas em 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.

As curvas de crescimento dos quatro isolados que apresentaram melhor desempenho estão apresentadas na Figura 2. A identificação das espécies por MALDI-TOF indica que os isolados CHAP-519, CHAP-522, CHAP-583 e CHAP-584 pertencem à espécie *Meyerozyma guilliermondii* com 99,90% de identidade. Essa espécie apresenta potencial de produção de etanol de segunda geração, de xilitol a partir de hemicelulose, de biocontrole contra bolores e de degradação de micotoxinas, como a aflatoxina B1 (Zhang *et al.*, 2025; Atzmüller *et al.*, 2020). Entretanto, não foi possível identificar o isolado CHAP-597 devido à ausência de um espectro de massa similar na base de dados SARAMIS do equipamento, sendo necessário assim a utilização de sequenciamento genético para a identificação em nível de espécie.

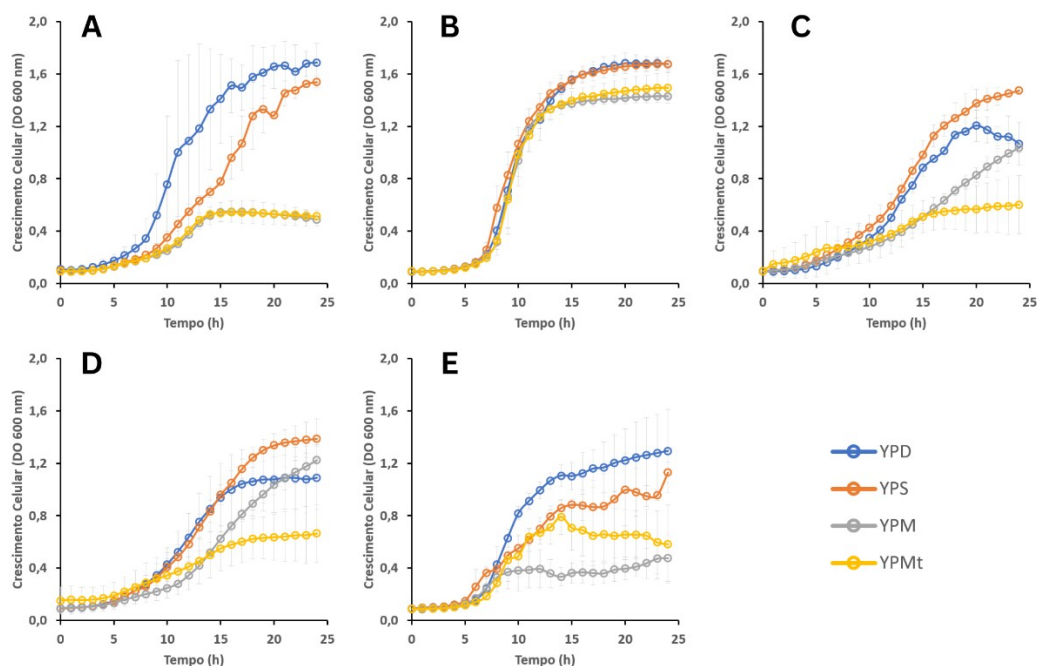


Figura 2. Crescimento celular estimado em densidade óptica (DO, medido em unidades de absorbância a 600 nm) das linhagens CHAP-519 (A), CHAP-522 (B), CHAP-583 (C), CHAP-584 (D) e CHAP-597 (E) cultivadas em microescala em meios contendo glicose (YPD), sacarose (YPS), maltose (YPM) ou maltotriose (YPMt) com fonte de carbono. Cada condição experimental foi avaliada em triplicata, e os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

5 Conclusão

Os resultados demonstraram a viabilidade de isolar leveduras promissoras a partir de matrizes amiláceas de mandioca. A linhagem CHAP-522 (*Meyerozyma guilliermondii*) apresentou o perfil cinético e metabólico mais promissor frente aos diferentes açúcares testados, consolidando-se como candidata para futuras aplicações na produção de bioetanol.

Referências Bibliográficas

ATZMÜLLER, D. *et al.* A. Identification of genes involved in xylose metabolism of *Meyerozyma guilliermondii* and their genetic engineering for increased xylitol production. **AMB Expr**, v. 10, no. 78, 2020.

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.

CHOI, DH. *et al.* Isolation of thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* from nuruk. **Food Sci Biotechnol**. V. 26, pg.1357–1362, 2017.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1–2, p. 11–22, 2003.

GIEHL, A. *et al.* Prospecting Araucaria-Associated Yeasts for Second-Generation Biorefineries. **Sustainability**. 2025, v. 17, 8134.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 13, p. 5270–5295, 2008.

TOLIENG V. *et al.* Diversity of Yeasts and Their Ethanol Production at high Temperature. **J App Pharm Sci**, v. 8(02), p. 136-142, 2018.

ZHANG, W. *et al.* Biodegradation of aflatoxin B1 by a novel mined aldo–keto reductase from *Meyerozyma guilliermondii* AF01. **Biological Control**, v. 200, n. 105676, 2025.

Palavras-chave: Leveduras, Fermentação, Mandioca, Maltose e Maltotriose

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2025-0281

Financiamento:

