

# PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A PLANTAS DO GÊNERO AGAVE PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

**Palavras-Chave:** Caldo de Agave; Etanol 1G; Prospecção microbiana.

**Autores(as):**

**MARINA VICTORIA FREITAS DE OLIVEIRA, IB – UNICAMP**

**MSc<sup>(a)</sup>. LARA ISENSEE SABOYA DE SOUSA, coorientadora, UNICAMP**

**MSc<sup>(a)</sup>. BEATRIZ DE OLIVEIRA VARGAS, coorientadora, UNICAMP**

**DR<sup>(a)</sup>. FLÁVIA ALVARENGA, coorientadora, UNICAMP**

**DR. FELLIPE DA SILVEIRA BEZERRA DE MELLO, coorientador, UNICAMP**

**PROF. DR. GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA, orientador, UNICAMP**

---

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento econômico sustentável requer utilização de recursos renováveis, como biomassa vegetal, resíduos agrícolas e florestais, para promover a redução gradual da dependência de combustíveis fósseis. O aquecimento global está associado a modificações ecossistêmicas extremas que culminam, por exemplo, na desertificação de diversas áreas do planeta. No Brasil, o fenômeno acomete principalmente a região semiárida, porém há tendência de avançar progressivamente para outras regiões. O semiárido brasileiro é caracterizado por apresentar baixos índices pluviométricos e longos períodos de seca, mas devido às crescentes mudanças climáticas a degradação do solo tem avançado de forma mais significativa [1]. As plantas do gênero *Agave* apresentam produtividade em zona semiárida devido a pouca exigência de água e nutrientes para sobreviver, devido à sua fisiologia metabólica, possibilitando maior resistência a longos períodos de seca, tornando-se uma potencial cultura para a bioenergia neste cenário [2]. Os microrganismos, como as leveduras, são os principais atores nos processos biotecnológicos para a produção de diversas moléculas, como o etanol, a partir dos açúcares desta biomassa. No caso do caldo de *Agave* sp., a utilização de leveduras não convencionais torna-se uma atraente alternativa para biossíntese, dado uma melhor capacidade de adaptar-se às condições deste substrato e, portanto, fornecer melhor rendimento de bioprocessos quando comparado a levedura *Saccharomyces cerevisiae* [2,3]. Diante disso, este trabalho tem como objetivo a avaliação do potencial biotecnológico de leveduras associadas ao caldo de diferentes plantas do gênero *Agave* e identificação morfológica e molecular das espécies mais promissoras.

## 2. METODOLOGIA

As folhas basais, medianas e apicais de cinco espécies de *Agave* – *Agave tequilana*, *Agave sisalana*, *Agave wercklei*, *Agave* híbrido IAC4 e *Agave* híbrido H11648 – foram coletadas e processadas em moinho de facas, seguido de extração do substrato líquido em filtro prensa, nomeado caldo ou suco da folha. Este foi plaqueado diretamente em meio Rosa Bengala (Agar DRBC) e WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient Agar), bem como em experimentos independentes de crescimento microbiano: fermentação espontânea do caldo e enriquecimento seletivo para espécies fermentativas. As leveduras isoladas foram organizadas em bibliotecas em placas de 96 poços, as quais serão utilizadas para caracterização quanto à produção de etanol em experimentos de fenotipagem em alto rendimento. Para identificação preliminar das espécies de leveduras, foram empregados meios seletivos e cromogênicos como Meio WLN, Meio Ágar Cândida, Meio Diferencial de *Kluyveromyces* (KDM) e Meio Ágar Lisina. Para a identificação molecular, o DNA genômico de leveduras foi extraído pela metodologia fenol/clorofórmio e serão identificadas a partir de ensaios moleculares de amplificação e sequenciamento da região do ITS e D1/D2.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO

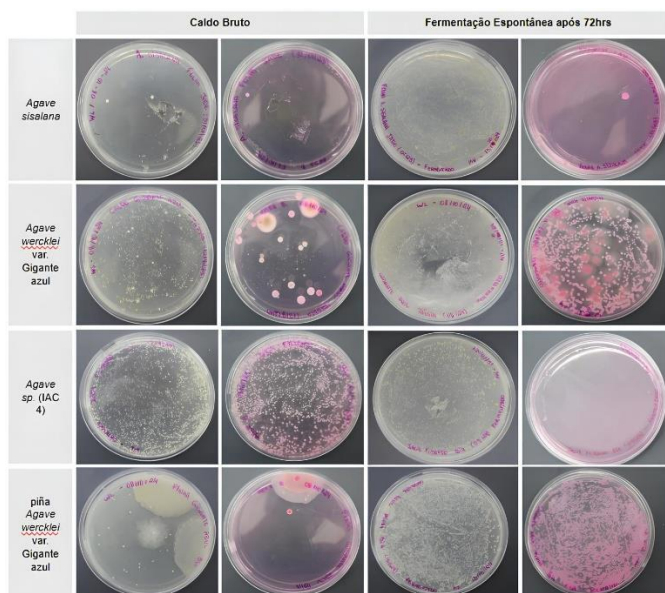
O isolamento microbiológico resultou em um total de 238 cepas (Tabela 1), obtidas a partir do plaqueamento dos caldos antes e após a incubação. Ao destrinchar os dados por espécie vegetal, observou-se que, em conjunto, a *A. sisalana*, *A. wercklei* e *A. IAC4* obtiveram 64 colônias isoladas (Figura 1); enquanto que a *A. tequilana* apresentou o maior número de isolados, com um total de 118 colônias (Figura 2); e, por fim, *A. H11648* resultou em 56 colônias (Figura 3). A partir dessa distribuição, nota-se que a espécie *A. tequilana* demonstrou não apenas um maior número de colônias, como também maior diversidade morfológica, observada a partir da variedade de cepas obtidas em diferentes momentos de cultivo.

| Caldo Bruto                |                       |          | Fermentação espontânea 72h |          |
|----------------------------|-----------------------|----------|----------------------------|----------|
|                            | Morfotipos diferentes | Isolados | Morfotipos diferentes      | Isolados |
| <i>Agave sisalana</i>      | 2                     | 4        | 5                          | 10       |
| <i>Agave wercklei</i>      | 9                     | 18       | 1                          | 2        |
| <i>Agave IAC4</i>          | 6                     | 12       | 3                          | 6        |
| pinã <i>Agave wercklei</i> | -                     | -        | 6                          | 12       |
| Total dos isolados         |                       | 34       |                            | 30       |

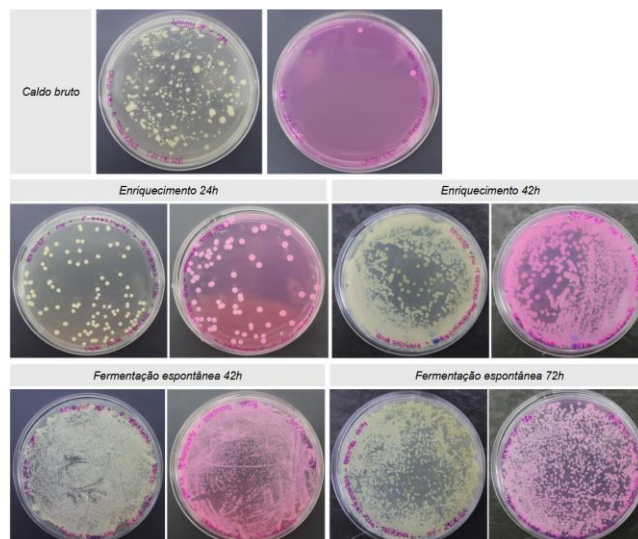
| <i>Agave H11648</i>        | Diferentes morfotipos | Total isolado |
|----------------------------|-----------------------|---------------|
| Caldo Cru                  | 7                     | 14            |
| Enriquecimento 42h         | 6                     | 12            |
| Enriquecimento 72h         | 3                     | 6             |
| Fermentação espontânea 42h | 5                     | 10            |
| Fermentação espontânea 72h | 7                     | 14            |
| Total dos isolados         |                       | 56            |

| <i>Agave tequilana</i>     | Diferentes morfotipos | Total isolado |
|----------------------------|-----------------------|---------------|
| Caldo Cru                  | 3                     | 6             |
| Enriquecimento 24h         | 9                     | 18            |
| Enriquecimento 42h         | 14                    | 28            |
| Fermentação espontânea 42h | 12                    | 24            |
| Fermentação espontânea 72h | 21                    | 42            |
| Total dos isolados         |                       | 118           |

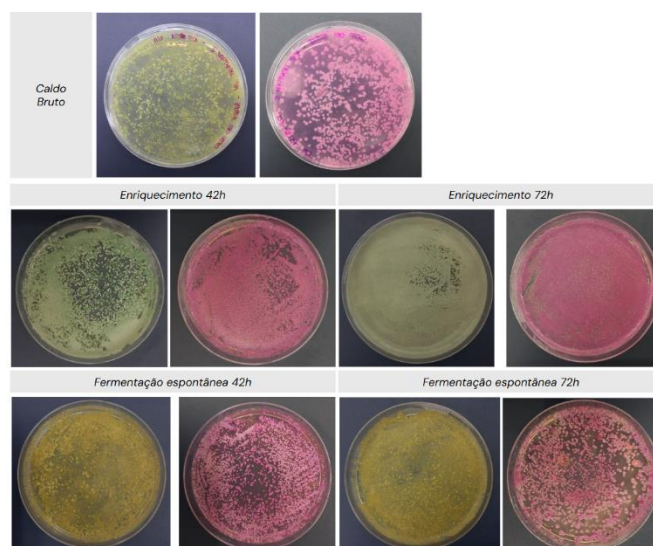
**Tabela 1:** Total de isolados obtidos a partir do plaqueamento dos caldos antes e após a incubação, resultando na obtenção de 238 cepas.



**Figura 1:** Isolamento e contagem das cepas obtidas após plaqueamento do caldo bruto e do caldo fermentado em *A. sisalana*, *A. wercklei* e *A. IAC4*. Figura autoral, 2025.



**Figura 2:** Isolamento e contagem das cepas obtidas após plaqueamento do caldo bruto, fermentado e enriquecido da *A. tequilana*. Figura autoral, 2025.



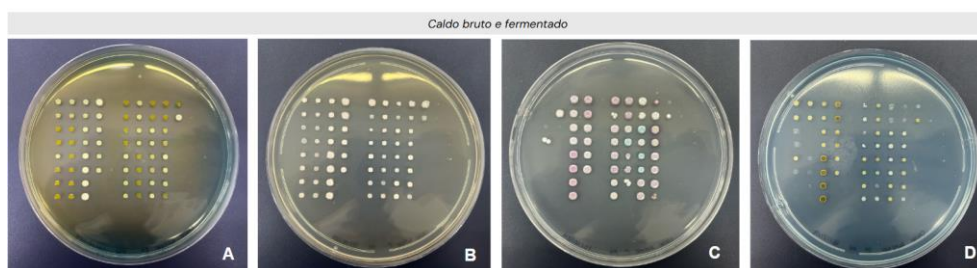
**Figura 3:** Isolamento e contagem das cepas obtidas após plaqueamento do caldo bruto, fermentado e enriquecido da *A. H11648*. Figura autoral, 2025

### 3.2 IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR EM MEIOS SELETIVOS E CROMOGÊNICOS

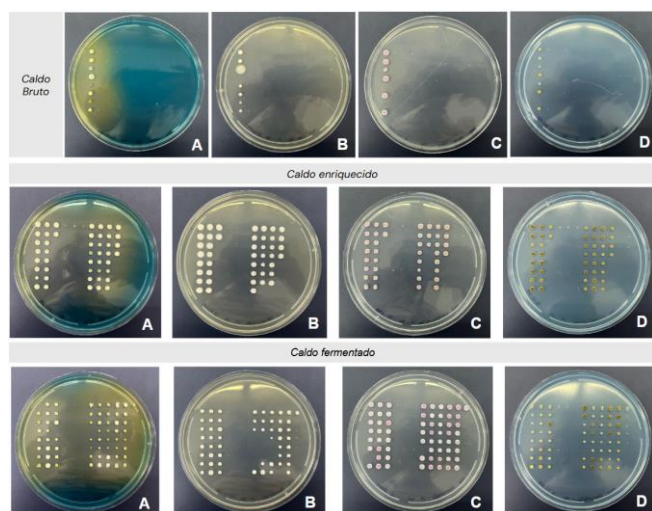
A identificação preliminar por meio das bibliotecas carimbadas em meios seletivos e cromogênicos, permitiram inferências fenotípicas importantes referentes ao perfil metabólico e a diversidade dos microrganismos isolados. No meio WLN (A) a acidificação evidenciada pela mudança de coloração indica a produção de ácidos orgânicos. Enquanto no meio KDM (B) não foi observada a coloração azul característica da atividade da  $\beta$ -galactosidase, impossibilitando a identificação de cepas do gênero *Kluyveromyces*. Por outro lado, no meio Ágar Cândida (C), que diferencia colônias com base em sua coloração e morfologia, foi possível identificar uma variedade de fenótipos, o que permite inferir a presença de diferentes gêneros no cultivo. Já no meio Ágar Lisina (D), houve maior formação de



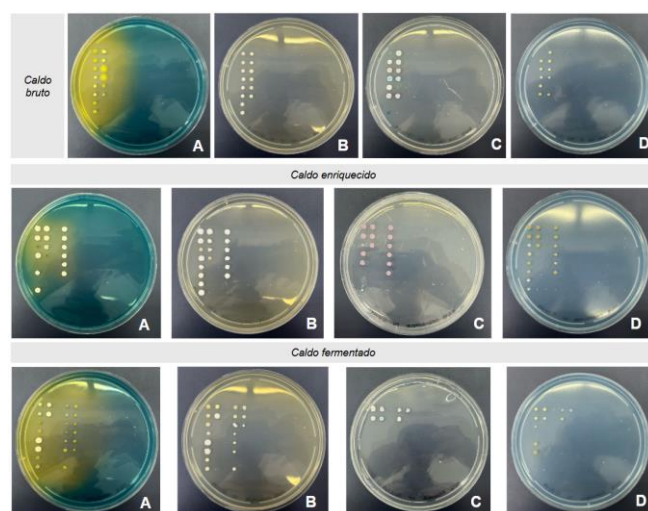
colônias evidenciando uma vasta gama de leveduras não convencionais, visto que a *Saccharomyces cerevisiae* não se desenvolve nesse ambiente.



**Figura 4:** Identificação preliminar em meios de cultura seletivos e cromogênicos, a coluna à esquerda representa as cepas oriundas da fermentação, enquanto a coluna à direita o caldo bruto. Em A - Meio Wallerstein Nutrient (WLN), B - Meio Diferencial de *Kluyveromyces* (KDM), C - Meio Ágar Cromogênico Cândida e em D - Meio Ágar Lisina. Figura autoral, 2025.



**Figura 5:** Identificação preliminar em meios de cultura seletivos e cromogênicos da A. H11648. Em A - Meio Wallerstein Nutrient (WLN), B - Meio Diferencial de *Kluyveromyces* (KDM), C - Meio Ágar Cromogênico Cândida e em D - Meio Ágar Lisina. Figura autoral, 2025.



**Figura 6:** Identificação preliminar em meios de cultura seletivos e cromogênicos da A. *tequilana*. Em A - Meio Wallerstein Nutrient (WLN), B - Meio Diferencial de *Kluyveromyces* (KDM), C - Meio Ágar Cromogênico Cândida e em D - Meio Ágar Lisina. Figura autoral, 2025.

### 3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A amplificação da região ITS do rDNA resultou, em algumas amostras, na visualização de mais de uma banda, o que pode estar associado à presença de DNA genômico misto, pseudogenes ou variações intragenômicas. Contudo, foram obtidas bandas únicas e bem definidas em 161 das 238 colônias analisadas, com tamanhos variando entre, aproximadamente, 500 pb e 750 pb, faixa compatível com o esperado para a região ITS em leveduras e fungos filamentosos. As amostras com amplificação satisfatória foram selecionadas para sequenciamento e análise filogenética por meio da comparação com bancos de dados genômicos, como NCBI. Dentre as 32 cepas sequenciadas originadas das espécies *A. sisalana*, *A. wercklei* e *A. IAC4*, observou-se uma predominância de *Clavispora lusitaniae* (68,75%), seguida por *Kluyveromyces marxianus* (15,63%), *Meyerozyma guilliermondii* (12,5%) e *Rhodotorula mucilaginosa* (3,13%). A presença majoritária de *C. lusitaniae* sugere não apenas sua alta adaptação às condições físico-químicas do caldo de agave, mas também uma capacidade competitiva frente a outros microrganismos presentes no mesmo nicho.

## 4. CONCLUSÕES

Conforme previsto, verificou-se uma elevada diversidade microbiana nos caldos das diferentes espécies de agave, evidenciada pelo isolamento e identificação preliminar. Esses achados indicam que o agave constitui um nicho microbiológico naturalmente rico, desde o caldo cru até as fases subsequentes de fermentação. No momento, a identificação molecular da *A. tequilana* e *A. H11648* está na fase de execução e, em seguida, será realizada a caracterização fenotípica quanto à produção de etanol das espécies de leveduras identificadas em todos os substratos.

---

## 5. BIBLIOGRAFIA

- [1] TAVARES, V. C.; DE ARRUDA, Í. R. P.; DA SILVA, D. G. Desertificação, mudanças climáticas e secas no semiárido brasileiro: uma revisão bibliográfica. **Geosul**, v. 34, n. 70, p. 385–405, 2019.
- [2] YAN, X.; CORBIN, K. R.; BURTON, R. A.; TAN, D. K. Y. Agave: A promising feedstock for biofuels in the water-energy-food-environment (WEFE) nexus. **Journal of Cleaner Production**, v. 261, p. 121283, 2020.
- [3] GUEDES, J. M.; SANTOS, A. G. D.; SANTOS, H. S. Uso da biomassa como fonte energética para produção de biocombustíveis. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 1, n. 1, 2021