

ANÁLISE DAS ATIVIDADES AMILOLÍTICAS DE LEVEDURAS DE MICROAMBIENTES DO SUL DO BRASIL

TRICIANE TORNAI PEREIRA^{1,2*}, ANDERSON GIEHL^{2,3}, SÉRGIO LUIZ ALVES
JR^{2,3**}.

1 Introdução

O amido é um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza, constituindo a principal reserva energética de diversas plantas e um recurso renovável de grande relevância para a indústria alimentícia, farmacêutica e de biocombustíveis. Sua estrutura confere-lhe propriedades físico-químicas específicas, que exigem a ação de enzimas hidrolíticas, como as amilases, para a liberação de açúcares fermentescíveis (Junejo, 2022).

Leveduras com capacidade amilolítica possuem importância biotecnológica significativa, pois são capazes de converter diretamente o amido em açúcares simples, reduzindo etapas e custos em processos fermentativos. Essa característica é desejável em setores como a produção de etanol, a fabricação de bebidas fermentadas e a obtenção de xaropes açucarados. Além disso, o estudo da diversidade microbiana em diferentes microambientes possibilita a identificação de cepas com alto potencial enzimático, ampliando o leque de microrganismos aplicáveis em biorrefinarias (Carreiro, 2011).

A diversidade de ecossistemas e a variedade de resíduos vegetais ricos em amido oferecem um cenário propício para a prospecção de novas leveduras amilolíticas. Entre as fontes potenciais de microrganismos de interesse estão grãos e sementes em decomposição, como o milho e o pinhão, que podem abrigar cepas adaptadas à utilização de carboidratos complexos. Nesse contexto, a avaliação do crescimento de leveduras em diferentes substratos, como glicose, maltose e maltotriose, também é importante, pois permite compreender sua versatilidade metabólica e direcionar aplicações industriais específicas (Silva; Lopes; Alves, 2017).

2 Objetivos

1 Graduada de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Chapecó, contato: triciane.pereira@estudante.uffs.edu.br

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

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

Este trabalho visou identificar e caracterizar leveduras selvagens (provenientes de microambientes do Sul do Brasil) capazes de secretar amilases e de metabolizar açúcares presentes em hidrolisados de amido (glicose, maltose e maltotriose). Com isso, tínhamos também o intuito de avaliar o potencial de aplicação dessas leveduras em processos biotecnológicos que utilizam substratos amiláceos como matéria-prima.

3 Metodologia

3.1 Prospecção de leveduras amilolíticas

Preparou-se um meio de cultura sólido contendo 6,7 g/L de *Yeast Nitrogen Base* (YNB), 20 g/L de amido solúvel e 20 g/L de ágar. Para isso, pesaram-se 6,7 g de YNB, 20 g de amido solúvel e 20 g de ágar, os quais foram adicionados a aproximadamente 800 mL de água destilada em um Becker de 1 L. A mistura foi agitada até a dissolução dos componentes. Em seguida, a solução foi transferida para uma proveta e o volume foi completado até 1 L com água destilada. O meio foi então distribuído em frascos de vidro e esterilizado em autoclave. Após a esterilização, sob condições assépticas, o meio ainda líquido foi vertido em placas de Petri estéreis, utilizando-se cerca de 20 mL por placa. As placas foram mantidas abertas até a completa solidificação do meio e, posteriormente, armazenadas em posição invertida, até o momento da utilização. Foram então inoculadas 156 linhagens de levedura. Após o período de incubação (96 h a 30 °C), fez-se a revelação dos halos de hidrólise através da coloração do meio com solução de lugol. Por fim, as placas foram fotografadas e as imagens processadas no software ImageJ para a mensuração do diâmetro do halo de degradação e da colônia.

3.2 Cultivo em microescala em meios com glicose, maltose e maltotriose

As cepas de leveduras isoladas foram inicialmente pré-cultivadas em tubos contendo meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose). Para a avaliação do crescimento em diferentes fontes de carbono, as cepas foram inoculadas, em triplicata, em microplacas de 96 poços contendo 100 µL dos seguintes meios: YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), YPM (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de maltose) e YPMt (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de maltotriose). Em microtubos contendo 1 mL de água destilada estéril, adicionou-se 1 µL de células com auxílio de uma alça de inoculação calibrada. Posteriormente, transferiu-se 1 µL do volume de suspensão de células dos microtubos para os poços da placa. A placa foi selada utilizando

filme selante de microplaca, para impedir contaminação dos poços durante a incubação. A placa foi cultivada por 48 h, sob agitação de 180 rpm a 30 °C no leitor de microplacas Varioskan Lux. Foram feitas leituras de absorbância a cada 1 h para o acompanhamento do crescimento celular.

4 Resultados e Discussão

4.1 Prospecção de leveduras amilolíticas

A prospecção de leveduras amilolíticas revelou que, dentre as 156 cepas avaliadas, apenas 9 linhagens apresentaram atividade positiva para degradação de amido, demonstrada pela formação de halos de hidrólise no meio contendo amido solúvel. O cálculo do Índice Enzimático (IE) permitiu comparar a eficiência hidrolítica das cepas positivas em relação ao controle (*Saitozyma flava*, CHAP Y7219), previamente descrito na literatura por apresentar elevada atividade amilolítica (Santos, 2022).

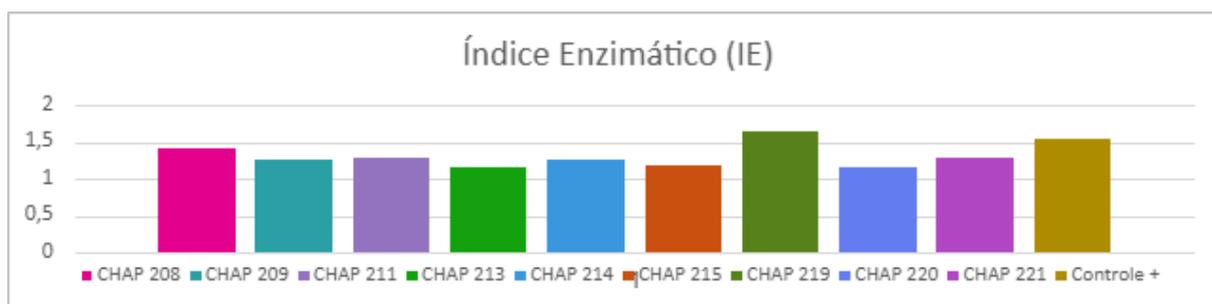


Figura 1. Determinação do Índice Enzimático (IE), em cm, das cepas que testaram positivo no teste de crescimento em amido, usando a relação $IE = \text{diâmetro halo} / \text{diâmetro colônia}$, tendo como Controle + a cepa CHAP Y7219 (*Saitozyma flava*) com referida atividade amilolítica.

A detecção dessa atividade indica a presença de enzimas extracelulares, como α -amilases e glicoamilases, capazes de romper ligações α -1,4 glicosídicas, liberando açúcares redutores a partir da matriz de amido. Essas enzimas são de interesse industrial por possibilitarem a conversão direta de substratos amiláceos em carboidratos fermentescíveis, reduzindo custos e etapas em processos como a produção de etanol, xaropes e bebidas fermentadas.

As cepas CHAP 209, CHAP 211, CHAP 213, CHAP 214, CHAP 215, CHAP 219, CHAP 220 e CHAP 221 pertencem ao gênero *Aureobasidium*, que já possui atividade amilolítica documentada (Liu, 2018), apresentando enzimas como α -amilase e glucoamilase, capazes de degradar amido durante a fermentação. Essa atividade natural está relacionada à redução do peso molecular do pululano, que é um polisacarídeo exopolimérico (EPS) linear e não ramificado produzido por algumas espécies do fungo, ao longo do cultivo, especialmente

na fase final de crescimento, quando a secreção dessas enzimas é mais intensa. Assim, essas cepas apresentam um potencial intrínseco para estudos sobre a relação à atividade amilolítica. O fato de a maioria das cepas não apresentar halos de degradação sugere que, apesar da diversidade microbiana explorada, a capacidade amilolítica não é uma característica amplamente distribuída entre leveduras de microambientes do Sul do Brasil. Essa baixa frequência ressalta a importância de triagens amplas para prospecção microbiana.

4.2 Cultivo em microescala em glicose, maltose e maltotriose

As mesmas 156 linhagens de levedura foram também avaliadas, em triplicata, quanto à capacidade de crescimento em meios com glicose, maltose e maltotriose. Isso gerou 468 curvas de crescimento. Para resumir esses resultados, consideramos na Figura 2 apenas a capacidade de crescimento das cepas. A glicose foi mais amplamente utilizada pelas leveduras. Este resultado é esperado, uma vez que a glicose é um monossacarídeo prontamente assimilável, que entra diretamente na via glicolítica sem a necessidade de hidrólise prévia. O crescimento em maltose (dissacarídeo) e maltotriose (trissacarídeo), por sua vez, exige que a levedura sintetize enzimas específicas (α -glicosidases) para quebrar as ligações glicosídicas α -1,4 e liberar as unidades de glicose. A maltotriose, sendo um maltooligossacarídeo (MOS) com um grau de polimerização (DP) de 3, é um componente fundamental do amido e um substrato direto para muitas enzimas amilolíticas. Portanto, a habilidade de uma levedura em crescer eficientemente em maltotriose, pode ser um indicativo de seu potencial amilolítico.

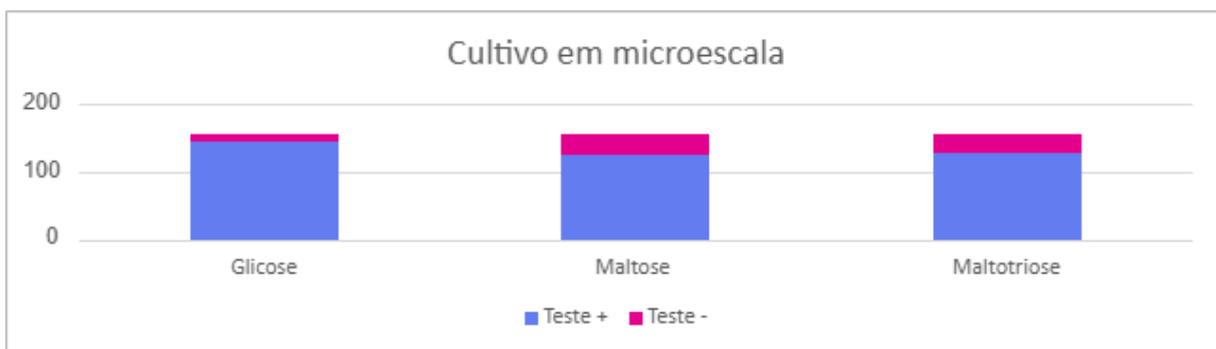


Figura 2. Determinação da quantidade de cepas que cresceram em cada tipo de açúcar, sendo representado por “+” as que apresentaram crescimento de acordo com a Curva de Crescimento Microbiano de Monod e “-” as que não seguiram o padrão. Foram testadas 156 cepas.

No entanto, apesar de 128 cepas terem apresentado crescimento em maltotriose, apenas 9 testaram positivo para amilase, evidenciando a necessidade de melhorar a acurácia

do método enzimático. Em contrapartida, esses resultados demonstram, dentre as leveduras isoladas, alto potencial de emprego em setores industriais que empreguem hidrolisados de amido como substrato para fermentação.

5 Conclusão

Este estudo prospectou leveduras do Sul do Brasil, avaliando 156 cepas em meios com amido, glicose, maltose e maltotriose. Embora apenas 9 cepas tenham demonstrado atividade de amilolítica, com destaque para o gênero *Aureobasidium*, 128 cepas cresceram em maltotriose, demonstrando capacidade de emprego em setores da indústria que utilizam hidrolisados parciais de amido como substrato.

Referências Bibliográficas

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. Disponível em: <https://periodicos.unitau.br/biociencias/article/download/1963/1386/0>. Acesso em: 08 ago. 2025.

JUNEJO, S. A. et al. Starch structure and nutritional functionality – Past revelations and future prospects. **Carbohydrate Polymers**, v. 277, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118837>. Acesso em: 08 ago. 2025.

LIU, Nan-Nan et al. α -Amylase, glucoamylase and isopullulanase determine molecular weight of pullulan produced by *Aureobasidium melanogenum* P16. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 727-734, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.235>. Acesso em: 14 ago. 2025.

SILVA, D. A.; LOPES, A. L. V.; ALVES, P. A. Atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de resíduos agroindustriais. **Biotemas**, Florianópolis, v. 30, n. 4, p. 77-84, 2017. Disponível em: <https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2017v30n4p77>. Acesso em: 10 ago. 2025.

Palavras-chave: Amido; Amilase; Hidrólise; Maltose; Maltotriose.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2024-0469

Financiamento

