



"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

## **PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS POR *Saccharomyces cerevisiae* 37**

Mateus P. F. SANTOS<sup>1</sup>, Angie J. G.G. DOMINGUEZ<sup>1\*</sup>, Abdias B. S. NETO<sup>1</sup>, Ian D. A. CRUZ<sup>1</sup>, Ana Paula Trovatti UETANABARO<sup>2</sup> & Andréa Miura da COSTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brasil. <sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brasil.

\*E-mail para contato: [angiet16.agd@gmail.com](mailto:angiet16.agd@gmail.com)

**RESUMO** – *Enzimas amilolíticas de origem microbiana, vem ganhando bastante destaque nos últimos anos, logo o estudo de novos microrganismos produtores dessas enzimas segue sendo bastante necessário. O objetivo do trabalho foi verificar a capacidade da Saccharomyces cerevisiae 37, isolada de dornas de cachaçaria em produzir enzimas amilolíticas, essenciais para diversas aplicações industriais, como na produção de alimentos e biotecnologia. Utilizando o delineamento Box-Behnken, a produção enzimática foi otimizada variando a concentração de amido, pH e tempo de fermentação. As melhores condições foram estabelecidas em pH 6, concentração de amido de 5%, e 48 horas de fermentação. Os resultados demonstraram que a SC37 produziu amilases com atividade significativa, alcançando até 2,97 U/mL. A aplicação de ferramentas estatísticas revelou-se eficaz para aumentar a produção enzimática, sugerindo que a SC37 tem grande potencial biotecnológico. Concluiu-se que essa cepa pode ser uma fonte promissora de amilases para aplicações industriais, embora sejam necessários mais experimentos de otimização para explorar seu máximo potencial.*

**Palavras-chave:** Leveduras; Fermentação submersa; Enzimas; Biotecnologia.

## **PRODUCTION OF AMYLOLYTIC ENZYMES BY *Saccharomyces cerevisiae* 37**

**ABSTRACT** – *Microbial origin amylolytic enzymes have gained significant attention in recent years, making the study of new enzyme producing microorganisms still very necessary. The aim of this work was to verify the ability of Saccharomyces cerevisiae 37, isolated from cachaça fermentation vats, to produce amylolytic enzymes, which are essential for various industrial applications, such as in food production and biotechnology. Using the Box-Behnken design, enzyme production was optimized by varying starch concentration, pH, and fermentation time. The best conditions were established at pH 6, 5% starch concentration, and 48 hours of fermentation. The results showed that SC37 produced amylases with significant activity, reaching up to 2.97 U/mL. The application of statistical tools proved effective in enhancing enzyme production, suggesting that SC37 has great biotechnological potential. It was*

*concluded that this strain could be a promising source of amylases for industrial applications, although further optimization experiments are needed to explore its full potential.*

*Keywords: Yeasts; Submerged fermentation; Enzymes; Biotechnology.*

## 1. INTRODUÇÃO

A levedura é essencial no processo de fermentação de alimentos, com *Saccharomyces cerevisiae* sendo a espécie mais amplamente utilizada em processos industriais devido à sua versatilidade e eficácia (Tamang et al., 2016).

As enzimas amilolíticas, desempenham um papel crucial na indústria alimentícia ao hidrolisar amidos em açúcares simples, facilitando a produção de xaropes, pães e bebidas alcoólicas (Elgarahy et al., 2023). No entanto, otimizar a produção dessas enzimas de forma econômica e sustentável é um desafio contínuo. A busca por métodos de produção que atendam às demandas do mercado enquanto minimizam impactos ambientais é essencial (Ashwini et al., 2011). Amilases microbianas têm uma vasta gama de aplicações biotecnológicas, desde indústrias têxteis e de papel até detergentes e alimentos (Singh et al., 2022; Aghaei et al. 2022; Jin et al. 2020; Vijayalakshmi et al., 2012; Ashwini et al., 2011; Elgarahy et al., 2023). O desenvolvimento de métodos eficientes e sustentáveis para a obtenção e caracterização desses biocatalisadores é crucial.

Nesse sentido, torna-se necessário o desenvolvimento, técnica de obtenção e caracterização de biocatalisadores que sejam baratas, rápidas, não agridam o meio ambiente e proporcionem benefícios sustentáveis em longo prazo. Apesar de sua ampla utilização industrial, faltam estudos recentes sobre a produção de amilases por *Saccharomyces cerevisiae*. Este trabalho investiga a cepa SC37, isolada de dornas de cachaçaria, para avaliar seu potencial na produção dessas enzimas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. O screening da SC37 para produção de amilase

O isolado de *Saccharomyces cerevisiae* 37, do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Agroindústria (LABMA) da Universidade Estadual de Santa Cruz, é proveniente de projetos anteriores (Gillet, 2019; Figueirêdo 2017; Silva, 2009). Essa levedura, identificada bioquímica e molecularmente como *S. cerevisiae* (Silva, 2009), foi reativada em meio YPD ágar e incubada a 30 °C por 24 horas. Após a incubação, a atividade da amilase foi avaliada observando os halos de hidrólise do amido, e a levedura com maior atividade foi selecionada para a fermentação submersa.

### 2.2. Fermentação submersa para a produção de amilase pela levedura SC 37

A fermentação foi realizada em frascos de 125 mL com meio Czapeck e diferentes soluções tampão (Citrato pH 4,0; Fosfato pH 6,0; Tris-HCl pH 8,0) e amido em concentrações de 1,0%, 5,0% e 9,0%. Após esterilização e resfriamento, as leveduras foram inoculadas ( $1-2 \times 10^7$  células/mL) e mantidas a 30°C com agitação constante a 150 rpm por períodos de 24, 48 e 72 horas. Após a fermentação, o cultivo foi centrifugado e o sobrenadante, considerado extrato

enzimático bruto, foi coletado para análises.

### 2.2.1. Delineamento Box-Behnken de otimização da produção enzimática da SC 37

Foi realizado um planejamento experimental Box-Behnken com três fatores e três níveis para otimizar a produção de amilase. As variáveis independentes consideradas foram: concentração de amido (1%, 5% e 9%), tempo de fermentação (24, 48 e 72 horas), e pH (4, 6 e 8), enquanto a atividade enzimática (U/mL) foi definida como a variável dependente.

### 2.3. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada adicionando 125 µL de extrato enzimático, 125 µL de amido 1%, e 125 µL de tampão fosfato (pH 7,0). Após 10 minutos a 50 °C, o açúcar redutor foi quantificado pelo método DNS. Uma unidade de atividade corresponde à enzima que libera 1 µmol do produto por minuto.

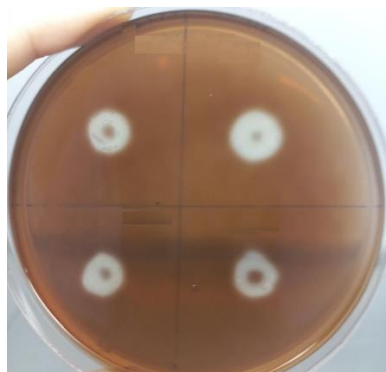
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. O screening da SC37 para produção de amilase

A triagem de placas foi realizada com o objetivo de identificar se a levedura era capaz de produzir enzimas amilolíticas para hidrolisar o amido, demonstrando que eram capazes de utilizar o amido solúvel como única fonte de carbono. A Tabela 1 mostra os halos médios de degradação do amido e a Figura 1 mostra o resultado experimental do screening em placa.

**Tabela 1.** Halos de hidrólise do amido pela levedura

| Isolado                     | Halos (cm)        |
|-----------------------------|-------------------|
| SC37                        | 1.25              |
|                             | 1.04              |
|                             | 1.38              |
| <b>Média dos Halos (cm)</b> | <b>1,2 ± 0,17</b> |



**Figura 1.** Resultado do screening em placa da enzima amilase, após adição do corante revelador.

O teste de *screening* em placa é utilizado para encontrar microrganismos potencialmente interessantes com base em diversos critérios de seleção qualitativos e geralmente indiretos, os critérios de triagem são por exemplo halos de hidrólise, halos de inibição, halos de precipitação ou emulsificação, alterações no indicador de pH, crescimento em meio sólido e morfologia colonial ou microscópica (Banoth et al., 2021). Os critérios de triagem se concentram em simplesmente avaliar a presença ou ausência da atividade desejada (Ottoni et al., 2020).

Até o momento, foi notado que as leveduras terrestres que podem produzir enzimas amilolíticas extracelulares incluem *Lipomyces*, *Saccharomycopsis*, *Schwanniomyces*, *Candida japonica* e *Filobasidium capsuligenum* e as enzimas amilolíticas extracelulares produzidas por elas foram bem caracterizadas (Farooq et al., 2021; De Mot; Verachtert, 1985). Por exemplo, descobriu-se que *Saccharomycopsis fibuligera* poderia converter amido em trealose de forma eficaz, e o rendimento de trealose poderia ser superior a 23 g/100 g de peso seco da célula (Chi et al., 2003). Embora a produção de amilase pelo gênero *Saccharomyce* ser menos comum, o presente trabalho demonstrou que as linhagens de *S. cerevisiae*, em especial a SC37, foi capaz de produzir halos de degradação do amido.

### 3.2. Produção da amilase da SC 37

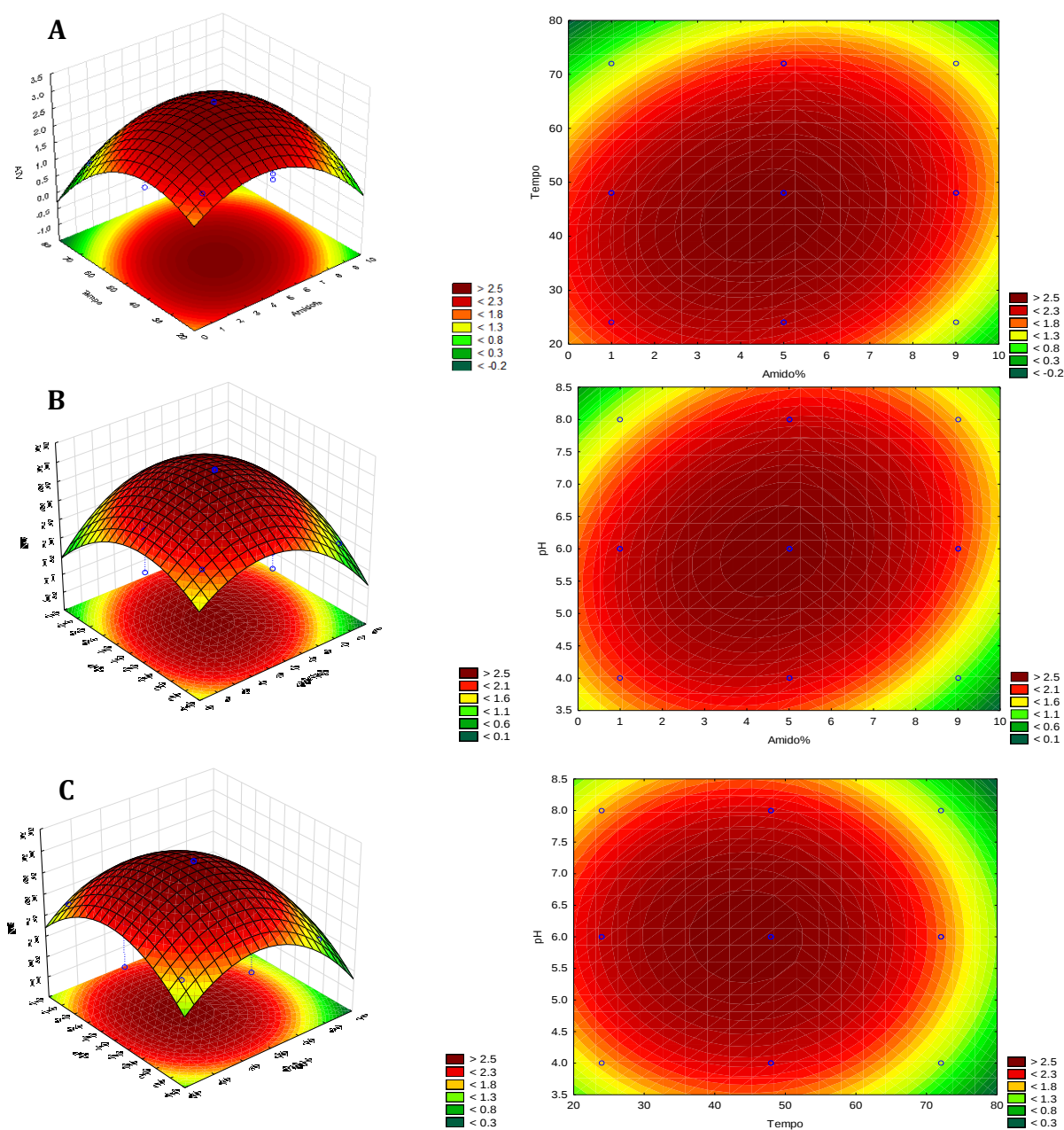
O delineamento Box-Behnken foi escolhido para o processo de otimização da produção de amilase, com o objetivo de delinear diferentes variáveis, a serem utilizadas como concentração de amido (1%, 5% e 9%), pH (4,0, 6,0 e 8,0) e tempo (24, 48 e 72 horas), buscando a melhor combinação para a produção das enzimas da SC 37. As condições dos pontos centrais foram estabelecidas a partir dos resultados obtidos do planejamento de mistura trabalhado por Gillet (2019) que serviu como elemento norteador para alcançar os resultados de forma mais simples. Os resultados obtidos da fermentação relacionada ao delineamento Box-Behnken estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Delineamento Box-Behnken realizado com diferentes variáveis para análise dos fatores concentração de amido, pH e tempo (h) e os respectivos valores da atividade enzimática de amilase alcançados nas fermentações do SC37.

| Ensaio | Fatores     |           |                               | Resposta                    |
|--------|-------------|-----------|-------------------------------|-----------------------------|
|        | Amido (CA%) | Tempo (h) | Potencial Hidrogeniônico (pH) | Atividade enzimática (U/mL) |
| 1      | 1,0         | 24        | 6                             | 2,12                        |
| 2      | 9,0         | 24        | 6                             | 1,17                        |
| 3      | 1,0         | 72        | 6                             | 1,01                        |
| 4      | 9,0         | 72        | 6                             | 1,30                        |
| 5      | 1,0         | 48        | 4                             | 2,01                        |
| 6      | 9,0         | 48        | 4                             | 1,18                        |
| 7      | 1,0         | 48        | 8                             | 1,30                        |
| 8      | 9,0         | 48        | 8                             | 1,64                        |
| 9      | 5,0         | 24        | 4                             | 1,70                        |
| 10     | 5,0         | 72        | 4                             | 1,28                        |
| 11     | 5,0         | 24        | 8                             | 1,85                        |
| 12     | 5,0         | 72        | 8                             | 1,40                        |

|    |     |    |   |      |
|----|-----|----|---|------|
| 13 | 5,0 | 48 | 6 | 2,97 |
| 14 | 5,0 | 48 | 6 | 2,99 |
| 15 | 5,0 | 48 | 6 | 2,96 |

A partir dos dados obtidos experimentalmente foi gerado o gráfico de superfície de resposta (Figura 2) com o objetivo de delinear a região ótima de produção enzimática.



**Figura 2.** Superfície de resposta e contorno construídos a partir dos efeitos das variáveis: A) Tempo x Amido %; B) pH x Amido % e C) Tempo x pH para a produção da amilase pela SC 37.

Levando em consideração o gráfico de superfície de resposta, é possível visualizar o efeito do tempo, pH e a concentração de amido na reação enzimática. Para o pH, as melhores respostas encontradas foram em pH ácidos, variando de 5,4 a 6,5, sendo o pH 6,0 escolhido para a produção enzimática. Já na influência da concentração de amido sobre a atividade da enzima, foi possível observar que a enzima teve uma melhor região de atividade entre 3,2% e 6%, sendo a concentração de amido escolhida de 5% para a produção da enzima. E o tempo foi fixado a 48 horas. Além disso estes resultados são bastantes promissores, uma vez que foi possível produzir enzimas amilolíticas usando uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* isolada de dornas de cachaçaria, indicando que leveduras do gênero *Saccharomyces* que já são bastante conhecidas e utilizadas nos mais diversos ramos industriais apresentam potencial para produção de enzimas extracelulares.

#### 4. CONCLUSÃO

A levedura SC37 demonstrou um potencial significativo para a produção de amilases, com a máxima atividade enzimática observada após 48 horas, em pH 6 e com uma concentração de amido de 5%. A aplicação de ferramentas estatísticas para analisar a interação dos fatores físico-químicos envolvidos provou ser eficaz, resultando em um aumento substancial tanto na produção quanto na atividade enzimática, o que, por sua vez, levou a melhores rendimentos finais. No entanto, mais estudos são necessários para caracterizar completamente as propriedades dessa enzima, o que pode abrir novas possibilidades para aplicações industriais.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa e à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pelo apoio financeiro (073.11014.2022.0003271-26).

#### 6. REFERÊNCIAS

- AGHAEI, H. et al. Efficient hydrolysis of starch by  $\alpha$ -amylase immobilized on cloisite 30B and modified forms of cloisite 30B by adsorption and covalent methods. **Food Chemistry**, v. 373, p. 131425, 2022.
- ASHWINI, K. et al. Optimization, production and partial purification of extracellular  $\alpha$  amylase from *Bacillus sp. marini*. **Archives of Applied Science Research**, v. 3, n. 1, p. 33–42, 2011.
- BANOTH, L. et al. Screening, isolation and selection of a potent lipase producing microorganism and its use in the kinetic resolution of drug intermediates. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 98, n. 10, p. 100143, 2021.
- CHI, Z. et al. Enhanced conversion of soluble starch to trehalose by a mutant of *Saccharomycopsis fibuligera* sdu. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 135–141, 2003.
- DE MOT, R.; VERACHTERT, H. Purification and Characterization of Extracellular Amylolytic Enzymes from the Yeast *Filobasidium capsuligenum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1474–1482, 1985.
- ELGARAHY, A. M., ELOFFY, M. G., ALENGEBAWY, A., EL-SHERIF, D. M., GABALLAH, M. S., ELWAKEEL, K. Z., & EL-QELISH, M. Sustainable management of food



"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

waste; pre-treatment strategies, techno-economic assessment, bibliometric analysis, and potential utilizations: A systematic review. **Environmental Research**, 225, 115558. 2023

FAROOQ, M. A., ALI, S., HASSAN, A., TAHIR, H. M., MUMTAZ, S., & MUMTAZ, S. Biosynthesis and industrial applications of  $\alpha$ -amylase: A review. **Archives of Microbiology**, 203, 1281-1292. 2021

FIGUEIRÊDO, A. F. Seleção de leveduras e produção de cerveja artesanal suplementada com selênio. **Dissertação de doutorado**—UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA: [s.n.], 2017.

GILLET, S. A. Prospecção e análise de amilases fúngicas com potencial para aplicação em indústria de alimentos. **Dissertação de Mestrado**—UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ (UESC): [s.n.], 2009.

JIN, W. et al. Effect of linear charge density of polysaccharides on interactions with  $\alpha$ -amylase: Self-Assembling behavior and application in enzyme immobilization. **Food Chemistry**, v. 331, p. 127320, 2020.

OTTONI, J. R. et al. Characterization of amylase produced by cold-adapted bacteria from Antarctic samples. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101452, jan. 2020.

SINGH, R. et al. An overview on microbial  $\alpha$ -amylase and recent biotechnological developments. **Current Biotechnology**, v. 11, 28 mar. 2022.

SILVA, A. F. Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações espontâneas de cachaças de alambique da Bahia. **Dissertação de Mestrado**—UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA: [s.n.], 2009.

TAMANG, J. P., WATANABE, K., & HOLZAPFEL, W. H. Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in microbiology*, 7, 377. 2016.

VIJAYALAKSHMI, K. et al. Isolation and Characterization of *Bacillus Subtilis* KC3 for Amylolytic Activity. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, n. 5, p. 336–341, 2012.