



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

ATIVIDADE ENZIMÁTICA EXTRACELULAR PROMOVIDA PELA LEVEDURA *MYRIANGIUM SP.* COLETADA NA ANTÁRTICA

Carolina Vidal Almeida¹; Abraão Brito Peixoto²

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: carolinavidala@outlook.com
2. Orientador, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: abraaopeixoto@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Hidrólise; enzima; amilase; celulase.

INTRODUÇÃO

A Antártica é uma região polar e de difícil permanência. Todavia, o Brasil tem interesse em investir recursos humanos e financeiros com a finalidade de angariar conhecimento e tecnologia. Em 1982, o Proantar (Programa Antártico Brasileiro) inseriu o país no grupo de 29 países que estudam os potenciais da Antártica e do Oceano Austral, trazendo a pesquisa científica como norteadora, com o fim de entender os fenômenos daquela região e as influências no território nacional.

Por este motivo, a bioprospecção em áreas com estas características pode denotar a existência de micro-organismos de interesse industrial, tanto na área farmacêutica como em áreas distintas como petrolífera, alimentícia e química.

Portanto, este trabalho pode demonstrar parte do potencial dessa região ainda pouco explorada e ampliar o portfólio de insumos produzidos por seres microbiológicos oriundos de biomas pouco explorados.

Neste sentido, o trabalho tem como objetivo estudar o potencial de indivíduos microbiológicos desta origem na produção de insumos industriais, pois, pode viabilizar a identificação de produção de enzimas, vacinas, aromas, ácidos graxos, dentre outros.

METODOLOGIA

Cepas produtoras de amilases e de celulases foram selecionadas a partir dos exemplares de *Myriangium sp.*, cedidos pelo Instituto de Ciências Biológicas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As colônias já isoladas foram repicadas em ágar inclinado (40 g/L dextrose, 10 g/L peptona, 20 g/L ágar e pH 5,6 – meio ágar sabouraud), incubados a 30 °C, até desenvolvimento das colônias, para posteriormente serem mantidas a 5 °C. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Qualidade de Alimentos.

As leveduras da cultura estoque foram ativadas em meio sabouraud (2,0 % glicose, 0,5 % extrato de levedura, 1,0 % de extrato de malte, 0,2 % fosfato de sódio monobásico e pH 5,5), contidos em frascos de Erlenmeyer e submetidos à agitação de 150 rpm por 24 h sob temperatura de 30 °C. A inoculação dos microrganismos foi feita

pela introdução de alça de repicagem flambada e resfriada diretamente dos tubos com a cultura e passagem para os Erlenmeyers.

As leveduras ativadas foram inoculadas em placas de Petri individuais devidamente identificadas com o código referente ao microrganismo em teste, o meio contido nas placas continha a seguinte composição: 40 g/L dextrose, 10 g/L peptona, 20 g/L ágar. Para a inoculação, precisou-se diluir o meio para que fosse possível a contagem dos microrganismos, sendo assim, foi colocado nas placas um volume de 200 µL do meio fermentado diluído em 500, 2,5x10⁵ e 2,5x10⁶ vezes, e posteriormente estas placas foram colocadas em câmaras de incubação sob temperatura de 30 °C por 48h para em seguida fazer a avaliação do crescimento das leveduras. Também foi feita a diluição em 10, 20, 40, 80, 160 e 320 vezes em relação a quantidade de meio para seguir o protocolo de contagem por densidade óptica, no qual foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm.

Os inóculos foram preparados em meio fermentativo idêntico àquele supracitado e mantidos sob agitação de 150 rpm em frascos de Erlenmeyer a 30 °C por 24 h. Os frascos contendo 50 mL de meio reacional foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 30°C mas nos tempos de 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36h, e posteriormente nas temperaturas de 26 °C e 34 °C com os mesmos tempos. Ao final de cada processo fermentativo foi observado, através de um microscópio, a existência de contaminação por bactérias. Em seguida, fez-se as diluições em 10 e 100 vezes em relação à quantidade de meio e, por fim, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm.

Ao fim da fermentação, 15 mL dos inóculos foi submetido à centrifugação de 4000 rpm por 20 min, na sequência foi descartado o sobrenadante e adicionou-se 15 mL de soro fisiológico, agitou novamente por 15 s, coletou uma alíquota de 5 mL e colocou em papel filtro para ser filtrada com o auxílio de uma bomba a vácuo e após a filtração o papel filtro foi colocado em placa Petri para determinação da massa celular úmida oriunda desta alíquota e depois submetida a secagem em estufa. A massa das placas foi medida a cada 8 h até massa constante após permanência em estufa com temperatura controlada a 70 °C. A massa seca final foi a diferença entre a massa medida do conjunto (placa, filtro e célula) em peso constante e a massa medida da placa vazia e do filtro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor comparar o crescimento celular entre as diferentes temperaturas, a concentração da massa úmida celular (MU) foi colocada em gráfico, em função do tempo, como pode ser observada na Figura 1 e 2.

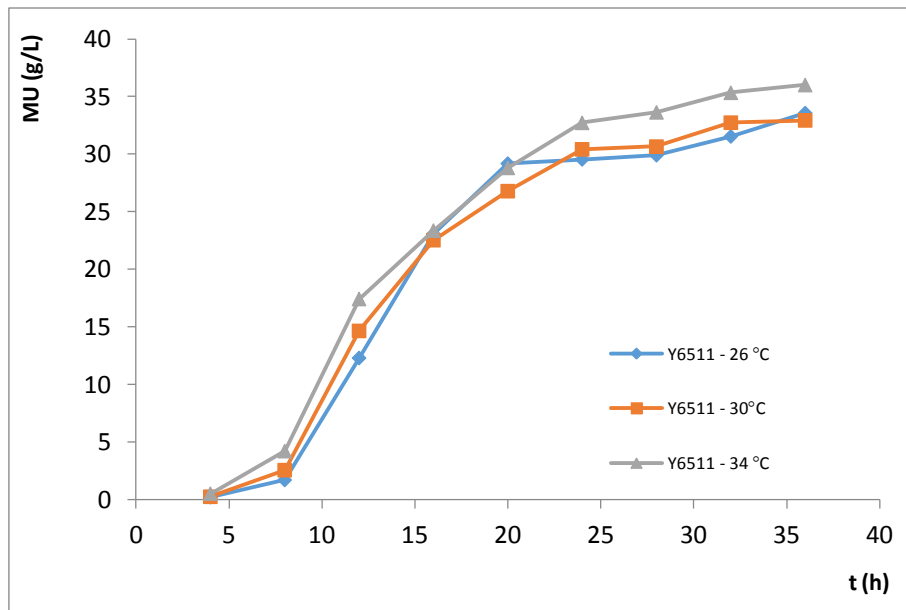


Figura 1: Crescimento da levedura *Myriangium sp.* (Y6511) em diferentes temperaturas.

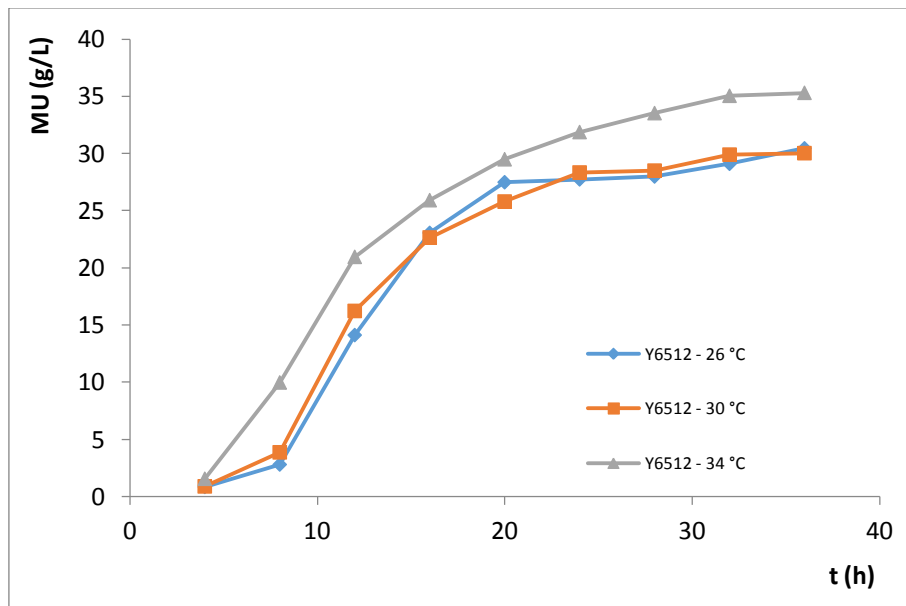


Figura 2: Crescimento da levedura *Myriangium sp.* (Y6512) em diferentes temperaturas.

Por meio da observação das figuras 1 e 2, verifica-se que as cepas da levedura *Myriangium sp.* cresceram com o aumento da temperatura do processo de fermentação. Na fase Lag ou fase de latência o crescimento celular é nulo devido à adaptação das células. Na fase Log ou exponencial, o período de maior crescimento a 26 °C para a cepa Y6511 (Figura 1) aconteceu nas 20h iniciais de fermentação, apresentando uma inclinação acentuada, após este período, houve um declínio da velocidade, mas de 20 a 36h ainda continuou havendo crescimento, correspondendo a fase estacionária. O comportamento da mesma cepa foi observado nas temperaturas de 30 e 34 °C, e o período de maior crescimento ocorreu nas primeiras 24h e após esse tempo também houve um declínio, mas continuou crescendo.

Na Figura 2, é apresentado o comportamento da cepa Y6512, em relação ao seu crescimento, na fase Lag houve maior crescimento a 26°C nas primeiras 20h e a 30 °C

aconteceu nas 24h iniciais, assim como ocorreu na cepa Y6511, e ambas continuaram crescendo após esse tempo só que em menor velocidade. Foi possível perceber um maior equilíbrio no crescimento e reprodução celular na temperatura de 26 °C que ocorreu na faixa entre 20h e 26h. Na temperatura de 34 °C a curva mostrou em crescimento contínuo e acelerado, não sendo possível definir as fases do crescimento da levedura. Apesar de a levedura *Myriangium sp.* ser originária da Antártica, donde se poderia inquirir metabolismo adaptado a temperaturas mais baixas, ela consegue crescer bem em temperaturas elevadas.

De acordo com Moritz (1998), o efeito da temperatura no qual a levedura se submete está relacionado diretamente a diversos fatores, tais como a respiração celular, metabolismo fermentativo, crescimento celular e tolerância ao etanol.

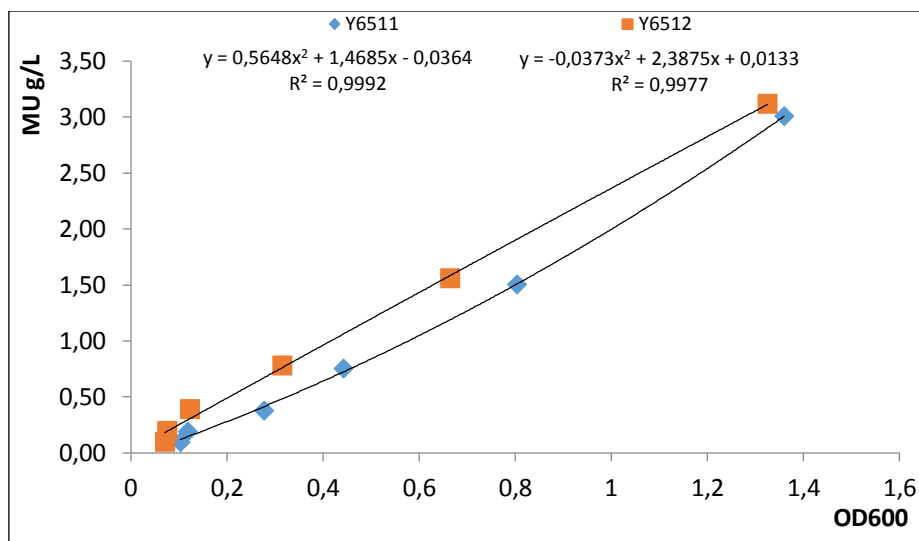


Figura 3: Relação entre a concentração da massa celular úmida da levedura *Myriangium sp.* e a densidade óptica (600nm)

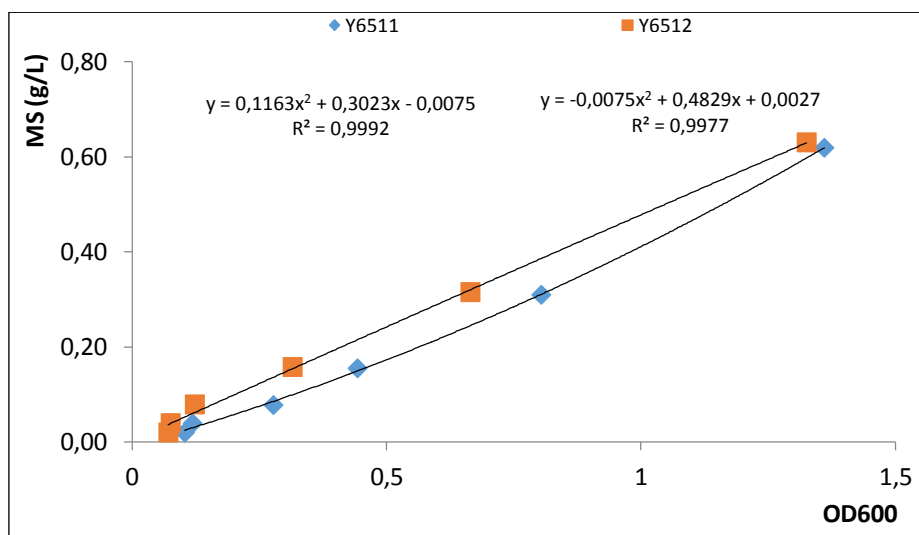


Figura 4: Relação gráfica entre a concentração da massa celular seca da levedura *Myriangium sp.* e a densidade óptica (600nm)

A partir da análise das Figuras 3 e 4, foi possível perceber que com o mesmo comprimento de onda, há uma proporcionalidade entre a densidade óptica e a

concentração celular. À medida que aumenta a OD, maior a concentração das cepas. No que tange ao coeficiente de correlação (R^2), é uma medida de ajuste de um modelo estatístico linear de maneira generalizada, quanto maior for o valor deste coeficiente, mais explicativo é o modelo linear, ou seja, melhor ele se ajusta à condição. O ajuste dos dados mostra um polinômio de grau 2, ou seja, uma parábola de 2º grau dos dados experimentais. Portanto, os coeficientes de correlação não variaram com relação a concentração de massa celular úmida e massa seca. Segundo Albiero *et al.* (2013) para suspensões celulares muito concentrados deixam de haver uma relação linear entre a OD da cultura e o número de células na suspensão celular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Verificou-se que as cepas cresceram com o aumento da temperatura, mesmo a levedura em estudo originar da Antártica, ela consegue crescer bem em temperaturas elevadas. No mesmo comprimento de onda, houve uma proporcionalidade entre a densidade óptica e a concentração celular, de ambas as cepas. À medida que aumenta a OD, maior a concentração das cepas. O ajuste dos dados mostra um polinômio de grau 2, ou seja, uma parábola de 2º grau dos dados experimentais. Todavia, os coeficientes de correlação não variaram com relação a concentração de massa celular úmida e massa seca. Com todas as atividades executadas, este trabalho pôde demonstrar parte do potencial dessa região ainda pouco explorada.

REFERÊNCIAS

ALBIERO, A., STREMELE, D. P., GOMES, L. F. S., KULKAMP, G. A., & PEREIRA, D. R. (2013). Avaliação de diferentes rotas de produção de etanol biocombustível a partir de resíduos de indústrias lácteas. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, 2(1), 2013.

GOPINATH, S. C. B. et al. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed research international**, 2017.

MORITZ, D. E. (1998). Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas. Dissertação (**Mestrado em Biotecnologia**), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 1998.

PEIXOTO, A. B. Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil. Campinas, Dissertação (**Mestrado em Engenharia de Alimentos**) – UNICAMP, 2006.