



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

HIDRÓLISE DA BIOMASSA POR ENZIMAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR LEVEDURAS EM MEIOS FERMENTATIVOS SUBMERSOS

Tainá Dandara Luna Farias¹; Abraão Brito Peixoto²; Carolina Vidal Almeida³

1. Voluntária PEVIC, Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: taina.dlf@gmail.com
2. Orientador, Departamento de nome, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: abraaopeixoto@uefs.br
3. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: carolinavidala@outlook.com

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, visto que, segundo Koblitz (2008), as enzimas são catalisadores biológicos que atuam em condições amenas de reações, altamente específicas, proporcionando um ambiente reacional não agressivo ao meio ambiente, devido sua biodegradabilidade, além de serem de alta eficiência catalítica, demonstrando o notório e amplo potencial da utilização de microrganismos para obtenção de produtos biotecnológicos.

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 *Nakazawaka Peltata* cedidos pelo Instituto de Ciências Biológicas do

Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que foram inicialmente testadas em meio seletivo, preparado em placas de Petri com a seguinte composição: amido solúvel (ou celulose), 20 g/L; peptona, 10 g/L; extrato de levedura, 10 g/L e agar, 20 g/L, mantidas em câmaras de incubação sob temperatura de 30 °C por 48h.

Após evidenciar a capacidade de produção das enzimas, a levedura produtora foi isolada, através da alça de repicagem em ágar inclinado composto de amido solúvel, 20 g/L; peptona, 10 g/L e extrato de levedura, 10 g/L, com pH ajustado para 5,6 com HCl. O inóculo foi preparado em meios fermentativos idênticos àquele supracitado e mantidos sob agitação de 100 rpm em frascos de Erlenmeyer a 30 °C por 24 h. A adição do inóculo foi realizada na proporção de 1:10 e os frascos com meio reacional foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36h, e posteriormente nas temperaturas de 26°C e 34°C com os mesmos tempos. Verificando ao final de cada processo fermentativo possíveis contaminações por bactérias através de um microscópio.

Seguidamente, foram feitas as diluições em 10 e 100 vezes em relação à quantidade de meio e por fim foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600nm, 12, 24, 36 e 48h, para avaliação do crescimento das leveduras. Através das diluições de cada cepa, foi adicionado 200 µL de cada diluição em placas de petri contendo a seguinte composição: 40 g/L dextrose, 10 g/L peptona, 20 g/L ágar, em triplicata. 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.

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 15s, 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/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

O estudo cinético do processo fermentativo das cepas da levedura *Nakazawaka Peltata* respaldou-se na análise da evolução dos valores de concentração em função do tempo de fermentação, em comparações quantitativas entre as diferentes temperaturas de análise em agitação adequada, como observada nas Figuras 1 e 2.

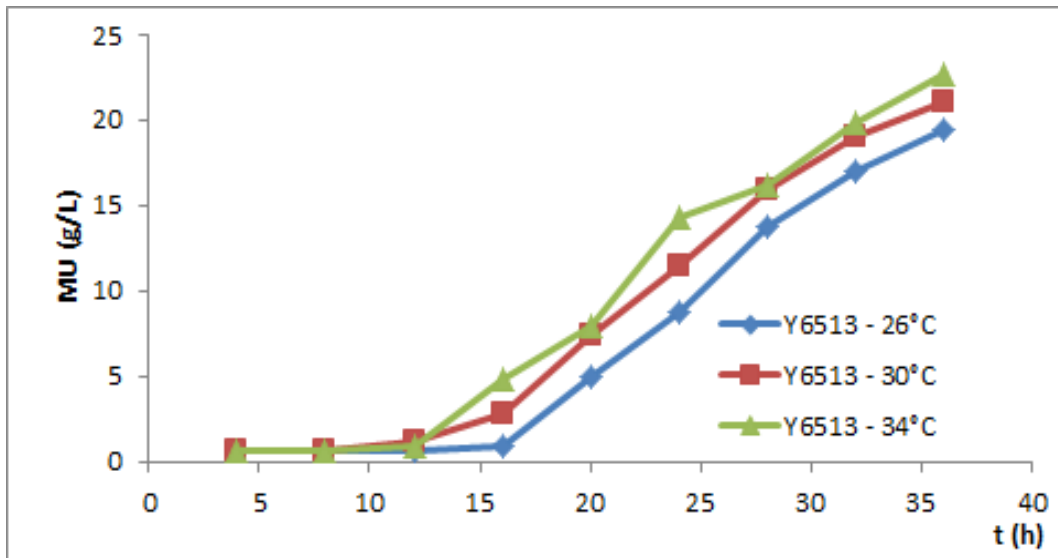


Figura 1: Crescimento da levedura *Nakazawaka Peltata* – Cepa Y6513

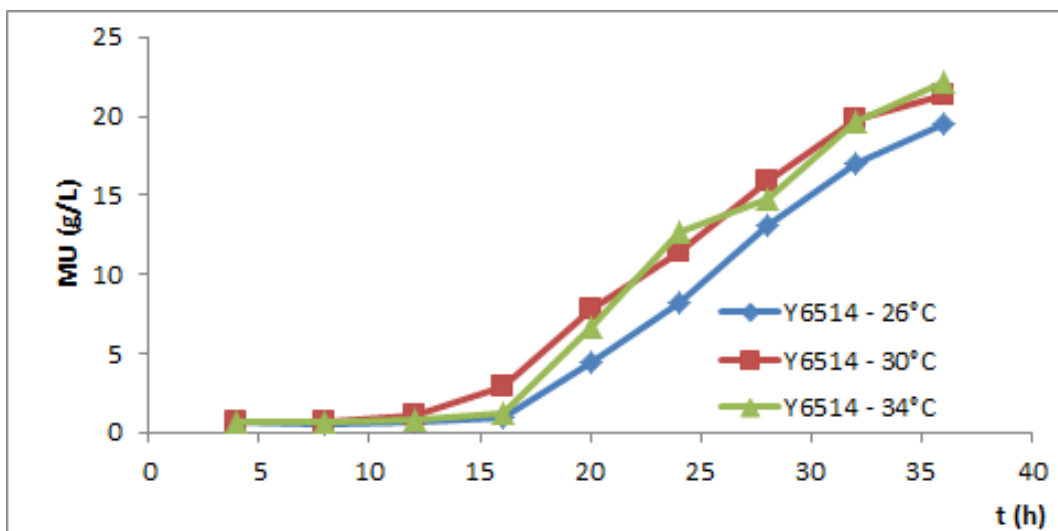


Figura 2: Crescimento da levedura *Nakazawaka Peltata* – Cepa Y6514

Através das curvas de crescimento das cepas da levedura expostas acima, pode-se observar a cinética de crescimento microbiano, comparando-a com o modelo proposto por Schmidell et al. (2011), notando algumas das suas correspondentes fases, como a primeira, conhecida como fase “lag” ou de latência, um período de adaptação, seguida da fase exponencial de crescimento, onde se observa o aumento da taxa de reprodução microbiana e da velocidade específica de crescimento, sendo observado em ambas as cepas em todas as faixas de temperatura estudadas no período de 16 h até o final do tempo de estudado, quando os dados demonstram o início da fase estacionária.

Com relação à dependência da temperatura, observou-se que o crescimento das cepas estudadas é diretamente proporcional a este parâmetro de processo, desde 26 °C até 34 °C, tal como observado na Figura 1, cepa Y6513. Ademais, na Figura 2, relativa à cepa Y6514, o crescimento é diretamente proporcional à temperatura especificamente quando a temperatura de crescimento foi alterada de 26 para 30 °C. Todavia, na faixa de 30 a 34 °C observa-se melhor adaptação à temperatura de 30 °C, situação em que a fase exponencial de crescimento inicia-se mais cedo, antes de 15 h de processo.

Apesar de uma avaliação inicial de crescimento ter sido concluída, seria importante o estudo em outras temperaturas, mais precisamente a 22 °C e 38 °C, de modo tornar mais enfática a relação do crescimento com a temperatura de processo. Nesta situação, ter-se-ia composição de condições para uma análise estatística permissiva à obtenção da condição ótima de processo.

Os resultados obtidos durante o ensaio foram ainda empregados para avaliar, de forma indireta, a relação entre a densidade óptica e a concentração da biomassa em seu estado seco e úmido, cujos coeficientes de correlação (R^2) foram acima de 0,9, indicando uma forte correlação entre as variáveis em estudo, bem como uma efetiva concordância entre os dados e o modelo proposto, tal como pode ser visto nas Figuras 3 e 4

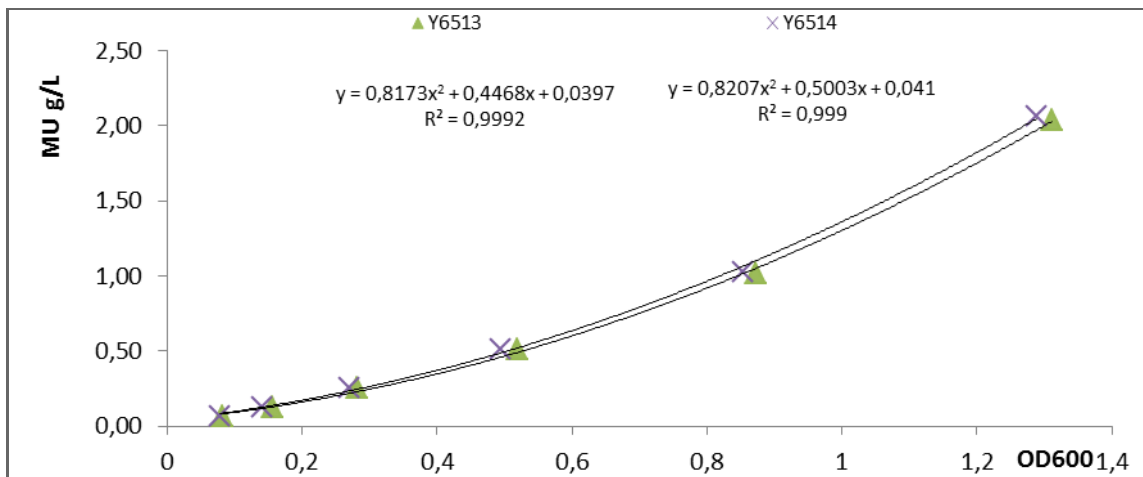


Figura 3: Concentração da massa celular úmida versus Densidade óptica (600nm)

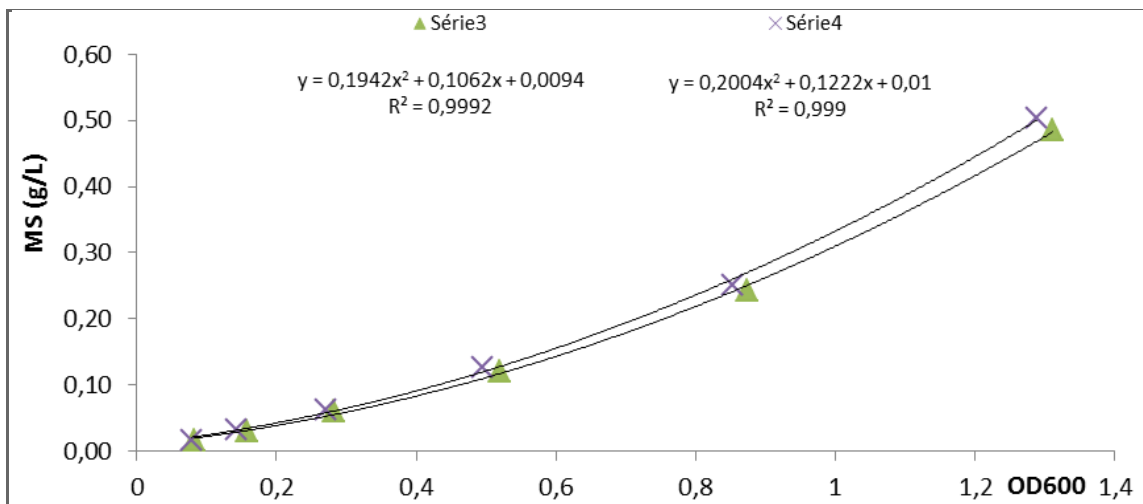


Figura 4: Concentração da massa celular úmida versus Densidade óptica (600nm)

O uso da densidade óptica na avaliação do crescimento das cepas em questão baseia-se na obstrução física da luz pelas células, logo, quanto mais células estiverem presentes na amostra, maior será a absorção de luz (absorbância) e menor será a passagem de luz pela amostra (transmitância). Dessa forma, observa-se uma quantificação maior no material úmido, bem como no material seco para a cepa Y6514.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foi possível acompanhar o crescimento inicial dos exemplares de *Nakazawaka peltata*, constatando sua contínua capacidade de crescimento aos 34°C, ou seja, a eficiência de reprodução em condições distintas daquelas relativas à sua origem, permitindo concluir que estas cepas de levedura apresentam comportamentos similares à *Saccharomyces cerevisiae*, inferindo boa capacidade de adaptação industrial, cujos equipamentos não demandariam alterações de grande monta para proporcionar a estas novas cepas condições de produção em larga escala. Todavia, novos estudos, relativos aos insumos produzidos pelas cepas estudadas, são fundamentais, sobretudo com relação ao potencial de produção de enzimas, biopolímeros, ácidos graxos, corantes, aromas, dentre outros.

REFERÊNCIAS

SCHMIDELL, W. (Coord.) **Biotecnologia industrial** – Engenharia Bioquímica/ Willibaldo Schmidell – outros coordenadores: Walter Borzani, Urgel de Almeida Lima, Eugênio Aquarone-- v.2 São Paulo: Blucher, 2001.

KOBLITZ, M. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.