

INFORMAÇÕES GERAIS DO TRABALHO

Título do Trabalho: Padronização do cultivo bacteriano de uma linhagem produtora de enzima com importância comercial

Autor (es): Alessandra Silva Teles, Maria Luíza de Assis Silva, Flávia de Faria Siqueira

Palavras-chave: Biotecnologia, Enzimas, Microbiologia

Campus: Betim

Área do Conhecimento (CNPq): Microbiologia

RESUMO

Juntamente com a Microbiologia, a Biotecnologia vem se destacando em suas operações por proporcionar inúmeros benefícios para a humanidade, tais como a inovação, o baixo custo e a preservação ambiental, podendo ser aplicadas em diversas áreas, como a médica, a alimentícia, a têxtil, a química, a de papel, a de celulose, entre outras. Nesse contexto, a empresa Phoneutria Biotecnologia desenvolveu um inovador antimicrobiano obtido através da ação de uma enzima bacteriana, permitindo sua aplicação em setores alimentícios, visto que atua tal produto atua como um conservante natural de alimentos. Entretanto, um desafio para a empresa foi gerar um sistema de produção que envolva todas as etapas de obtenção do antimicrobiano, porém em escala industrial. A partir de um projeto aprovado pela chamada 17/2014 do MEC/SETEC/CNPq, o Instituto Federal de Minas Gerais de Betim se encarregou de desenvolver métodos que tornem o cultivo mais eficiente e de monitorar e controlar alguns dos parâmetros que influencia o crescimento bacteriano, tais como: temperatura, o meio de cultura adequado a bactéria produtoras da enzima, além do acompanhamento da variação de pH, emissão de gases, nível da solução e turbidez no meio. Neste trabalho, serão apresentados resultados preliminares relacionados à padronização do cultivo, bem como a avaliação da atividade enzimática dos extratos produzidos. Foram avaliados se diferentes volumes de pré-inóculo para iniciar o cultivo microbiano influenciam na produção da enzima, além de mensurar a variação de pH durante a proliferação dessas bactérias. A atividade enzimática foi avaliada a partir da alteração da cor de uma solução contendo o substrato (tributirina), devido a mudança de pH do meio. Em conjunto com a equipe de automação, coordenados pelos professores Michelle Mendes e Virgil Almeida, foram feitos testes iniciais com sensores de temperatura, pH e turbidez (construído pela equipe) que demonstraram serem potenciais indicadores para o monitoramento desse processo fermentativo.

INTRODUÇÃO:

A Biotecnologia proporciona inovadoras possibilidades para a produção de substâncias e processos, apresentando soluções para atender à humanidade em suas mais diferentes necessidades (Pereira-Jr et al., 2008). Além disso, muitos processos e produtos biotecnológicos são capazes de superar tecnologias que poluam o ambiente ou que contribuam para a diminuição dos recursos naturais, sendo uma alternativa mais sustentável. Nesse contexto, as enzimas - além de sua importância biológica - tem ganhado um crescente alcance tecnológico, com aplicações em indústrias têxtil, de papel e celulose, de ração animal, de detergentes, de alimentos e bebidas, dentre outras. Essa maior compreensão possibilitou o uso dessas moléculas em processos industriais de diferentes áreas: médica, alimentícia, têxtil, química, de papel e celulose e muitas outras. Por serem naturais, não tóxicas, capazes reduzir a poluição ambiental e específicas para determinadas ações, é vantajoso utilizar enzimas na indústria (Mussatto et al. 2008).

Em relação à indústria de alimentos, um de seus desafios refere-se à preservação de seus produtos. Dados da OMS (Organização Mundial da Saúde) apontam que 20% dos alimentos produzidos são

perdidos por deterioração. As barreiras mais comumente utilizadas na conservação de alimentos são a temperatura (fator extrínseco), a atividade de água, a acidez, o potencial redox, os conservadores químicos e os microrganismos competidores, como bactérias ácido lácticas (fatores intrínsecos) (Silva, 2007). Tendo em vista as exigências comerciais, diversas empresas e universidades se prontificam a ampliar e aprimorar o campo biotecnológico na produção de alimentos.

Baseando-se nisso, a Phoneutria Biotecnologia desenvolveu um inovador antimicrobiano natural devidamente patentado (protocolo INPI nº 014120002967) denominado PHT436. A partir da realização de testes, foi demonstrada atividade antimicrobiana com grande potencial para ser utilizada na indústria de alimentos, sendo que já atrai o interesse do setor industrial, como pode ser comprovado pela parceria com o SENAI (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial) para testes no setor de panificação. Para a obtenção desse antimicrobiano, é necessário obter uma lipase - capaz de transformar triglicerídeos em glicerol e em ácidos graxos – a partir do cultivo de uma linhagem bacteriana, também denominada PHT436. O produto obtido a partir da ação dessa enzima agirá diretamente como um preventivo à proliferação de microrganismos indesejados durante o armazenamento de alimentos, conseqüentemente, sua implantação trará ao comerciante a possibilidade de prolongar a vida útil de seus alimentos.

No intuito de otimizar a obtenção dessa enzima é necessário fornecer ao microrganismo em questão condições favoráveis, almejando sua proliferação. Sendo assim, a partir de um projeto aprovado pela chamada 17/2014 do MEC/SETEC/CNPq, o IFMG campus Betim se encarregou de desenvolver métodos que tornem o cultivo mais eficiente e de monitorar e controlar alguns dos parâmetros que influencia o crescimento bacteriano, tais como: pH, temperatura, emissão de gases, nível e turbidez. O presente trabalho foi originado a partir dessa demanda e foi aprovado pelo edital interno do campus Betim nº 22/2017. Aos longos dos 5 meses de desenvolvimento desse projeto, alguns experimentos foram realizados, com o objetivo de obter maiores informações a respeito das condições de cultivo dessa bactéria. Dentre eles, pode-se citar: o desenvolvimento de meios de cultura alternativos, temperatura, volume de pré-inóculo usados e variação de pH durante a proliferação bacteriana. Para que o presente projeto fosse instaurado, os integrantes realizaram pesquisas bibliográficas e laboratoriais. Publicações científicas foram conciliadas às informações fornecidas pela Phounetria Biotecnologia, e partindo disso, foi possibilitada o desenvolvimento do trabalho.

METODOLOGIA:

Garantindo que os resultados fossem compatíveis e para a segurança dos laboratoristas, é imprescindível destacar que houve uma atenção especial à esterilização dos equipamentos e ao manuseio das vidrarias. Sendo assim, todas as vidrarias foram devidamente autoclavadas e mantidas em locais e condições seguras de contaminação. Antes do manuseio de qualquer objeto, foi realizada uma lavagem com água destilada. O descarte das substâncias e soluções contendo microrganismos ou qualquer outro rejeito que possa causar algum dano ambiental foi devidamente descartado em locais e condições ideais, certificando-se que não ocasionariam nenhum malefício ao ambiente nem aos laboratoristas.

Ainda nesse contexto de precaução contra a contaminação das amostras a serem analisadas, a capela de fluxo laminar foi um equipamento relevante para o presente estudo, visto que através dela foi

possível manusear meios de cultura e outras substâncias em seu interior sem que deixassem de estar estéreis. A refrigeração – armazenamento a curtos períodos de culturas bacterianas – (Tortora, 2012) auxiliou na preservação da cultura bacteriana, permitindo sua utilização por um período mais prolongado.

O meio de cultura utilizado, 2xYT, substância a qual possibilita um crescimento bacteriano favorável, foi preparado com 16g de peptona; 10g de extrato de levedura; 5g de cloreto de sódio e 1L de água destilada. Partindo dessa formulação, o meio foi mantido – após esterilizado em autoclave - em constante refrigeração em geladeira. A primeira condição de cultivo a ser testada foi a quantidade de pré-inóculo utilizado na cultura. Para isso, foi iniciado o crescimento microbiano através do preparo de um pré-inóculo comum com uma alíquota liofilizada da bactéria PHT436 em 10mL de meio de cultura 2xYT. Os tubos foram mantidos no shaker em uma constante agitação aliada a temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas. Feito isso, foram transferidas alíquotas de 10 μ L, 50 μ L e 100 μ L desse pré-inóculo para três frascos Erlenmeyer, contendo 100ml de meio 2xYT, os quais novamente foram mantidos sob agitação e temperatura ambiente durante 16 horas no shaker. Após serem retirados, os cultivos foram centrifugados a 6000 RPM durante 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos frascos, sendo filtrado na capela de fluxo laminar com o auxílio de uma seringa descartável de 20mL e um filtro também descartável.

De forma a avaliar a atividade enzimática, foi empregada a técnica de aferição do pH de uma solução através do monitoramento da alteração da coloração. Sendo assim, 500 μ L de cada extrato obtido no experimento anterior (10 μ L, 50 μ L e 100 μ L) foram adicionados a uma solução contendo 60 μ L de tributirina 20%; 640 μ L de solução tampão (Tris) 20 μ L de uma solução indicadora de pH. Ademais, um controle negativo composto por água estéril e um controle positivo utilizando uma lipase comercial foram produzidos nas mesmas condições para fins de comparações. A mudança do pH, que representa a ação enzimática, foi monitorada pela alteração de cor na solução presente no tubo de ensaio desde o tempo zero até a leitura final do experimento.

Em um outro momento, foram preparados 500ml de cultura dessa linhagem bacteriana com o objetivo de avaliar se havia a mudança de pH do meio a partir do crescimento microbiano. Alíquotas foram retiradas dessa cultura em diferentes intervalos de tempo, e o pH foi aferido em pHmetro devidamente calibrado. Os valores obtidos foram registrado para posteriores análises. Por fim, juntamente com colaboradores da área de automação, coordenados pelos professores Michelle Mendes e Virgil Almeida, foram realizados testes preliminares com sensores de temperatura e pH, adquiridos no comércio, além de um sensor de turbidez construído pela própria equipe.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

De forma a possibilitar o estudo de um determinado microrganismo, se faz necessário o estabelecimento de condições favoráveis para que o mesmo consiga crescer de forma saudável, tornando imprescindível a produção e utilização dos chamados meios de cultura. Esses são substâncias compostas de extratos animais, vegetais, sintéticos e/ou leveduras que possuem nutrientes favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos (PELCZAR, 1997). Sendo assim, a fim de permitir a produção da

enzima lipase através do processo fermentativo da linhagem bacteriana PHT436, primeiramente foi realizado um preparo da solução 2xYT.

Com o intuito de verificar se a quantidade de bactéria adicionada possui influência na eficácia da produção da enzima de interesse, foi preparado uma cultura a partir de diferentes volumes de um mesmo pré-inóculo (10 μ L, 50 μ L e 100 μ L). Esses extratos bacterianos, contendo a lipase, foram submetidos a uma avaliação da atividade enzimática, partindo da aferição de pH empregando uma solução indicadora. De acordo com esse método, é previsto que ao ocorrer a ação lipolítica, o pH da solução tenderá a ficar ácido devido a hidrólise do substrato presente na solução (tributirina), visto que durante esse processo são liberadas moléculas de ácido graxo. Para vias de aferição, o indicador adicionado anteriormente permitiu a observação de uma alteração na coloração, demonstrando a mudança de pH.

Pode-se constatar que houveram mudanças na coloração em relação ao tempo inicial nos tubos de 10 μ L, 50 μ L e 100 μ L, sem haver alterações nos controles negativo e positivo (Figura 1). Entretanto, não foram observadas diferenças drásticas em relação ao tempo zero, o que deve ser averiguado posteriormente. Uma melhor padronização das condições testadas deve ser feita, como por exemplo, reduzindo a quantidade de substrato e aumentando a quantidade de enzima. Sendo assim, a similaridade dos resultados da ação enzimática nos extratos avaliados impossibilitou a conclusão de que diferentes quantidades de pré-inóculo podem gerar um maior rendimento enzimático.

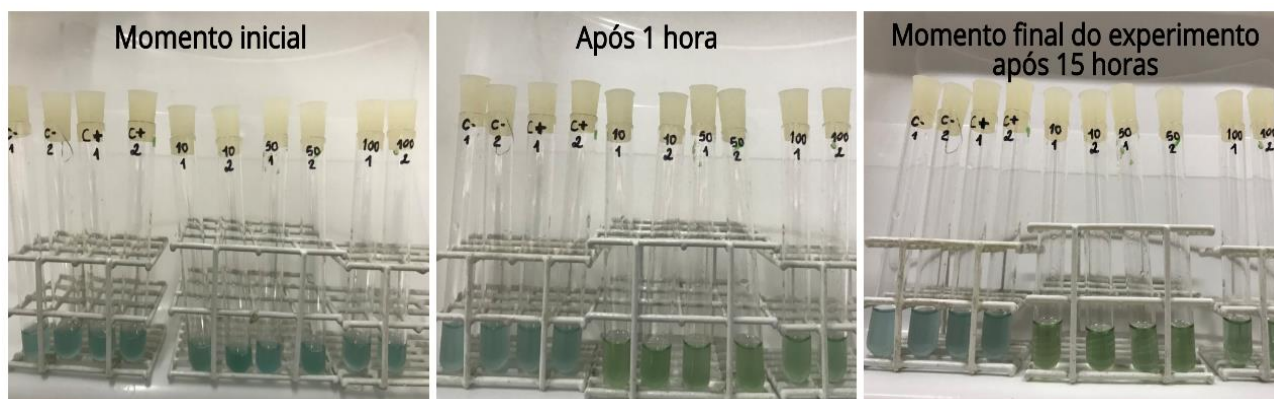


Figura 1: Avaliação da atividade enzimática através da observação da alteração do pH utilizando uma solução indicadora no momento inicial, após 1 hora e após 15 horas de experimento.

Ainda objetivando a averiguação das condições favoráveis ao processo fermentativo, foi realizada a aferição do pH da solução contendo o meio de cultura e as bactérias em proliferação. Como resultado, foi possível elaborar o gráfico (Figura 2), relacionando os valores de pH pelo tempo decorrido. De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que o pH se manteve em uma faixa considerada neutra durante o tempo inicial de crescimento microbiano (primeiras 3 horas de cultivo), se alterando somente após cerca de 18 horas de cultura (tempo 5), tendo um aumento no valor do pH. Com isso, espera-se que o monitoramento usando sensores de pH no meio de cultura poderão ser úteis para acompanhar a multiplicação da linhagem PHT436 e, conseqüentemente, a produção da lipase de interesse.

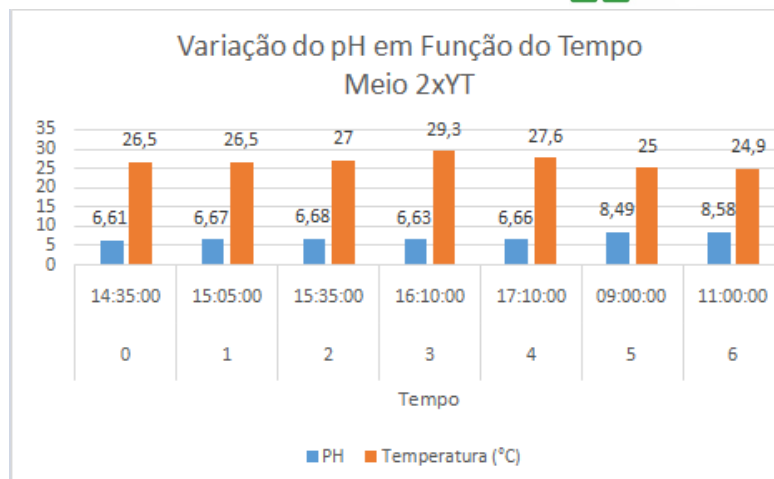


Figura 2: Gráfico de variação do pH do meio 2xYT em função do tempo juntamente com a temperatura.

Conforme já mencionado, o presente projeto surgiu como uma demanda vinda do setor privado, para construção de um sistema de monitoramento e controle automatizado do processo fermentativo. Sendo assim, para fins de testar uma possível forma de se monitorar a temperatura, a turbidez e o pH ocorrente em todo processo de fermentação, foi realizada a implantação de sensores ao meio, de forma que esses instrumentos pudessem monitorar os dados por cerca de 24 horas. Esse teste preliminar, usando medidores comerciais (pH e temperatura) e construído pela equipe do projeto (turbidez) geraram resultados promissores (dados não mostrados) que deverão ser melhor calibrados para, assim, serem utilizados rotineiramente nos cultivos da linhagem PHT 436. Sendo assim, novos experimentos deverão ser efetuados junto à equipe de automação que compõe o projeto.

CONCLUSÕES:

Os resultados apresentados nesse resumo indicam que o conhecimento sobre todas as etapas do processos tornam-se imprescindíveis para alcançar o objetivo proposto. Sendo assim, os dados apresentados neste resumo são resultados preliminares, mas que certamente serão utilizados nas etapas posteriores de execução do projeto. O estudo inicial com os sensores - conduzidos junto a equipe de automação - contribuiu para o alinhamento do conhecimento do processo e da execução do projeto, visto que este tem um caráter interdisciplinar, envolvendo docentes e discentes de áreas como Automação, Biologia e Química.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos professores Michelle Mendes Santos e Virgil Almeida, bem como os discentes Vitor Hugo Laia de Oliveira, Pierre Victor Silva Sousa e Arian Alves Ferreira Gonçalves, da área de Automação do IFMG Betim. Os autores agradecem também ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao IFMG campus Betim, pelo apoio financeiro. Agradecimentos à Phoneutria Biotecnologia e Serviços pela colaboração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

MUSSATTO, SI. FERNANDES, M., MILAGRES, A.M.F. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n.242, 2007;

PELCZAR, M, CHAEL et al. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. Volume I, 2ª Ed. São Paulo: Editora Pearson, 1997.

PEREIRA JR., N.; BON, E.P.S., FERRARA, M.A. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 63p.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.