

ANAIS

EICTI 2017

6° Encontro de
Iniciação Científica

2° Encontro de Iniciação
ao Desenvolvimento
Tecnológico e Inovação

4 a 6 de outubro de 2017

Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA)
Av. Tarquínio Joslin dos Santos, nº 1000
Foz do Iguaçu, Paraná – Brasil



Realização:



Apoio:



AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASE E PROTEASE POR BACTÉRIAS DE AMBIENTES EXTREMOS

BATISTA, Eliziane

Estudante do Curso de Biotecnologia bolsista (IC) - ILACVN – UNILA

E-mail: eliziane.batista@aluno.unila.edu.br

PASSARINI, Michel Rodrigo Zambrano

Docente/pesquisador do curso de Biotecnologia – ILACVN – UNILA

E-mail: michel.passarini@unila.edu.br

1 INTRODUÇÃO

A flexibilidade enzimática atribuída à micro-organismos psicrófilos, é uma característica adaptativa de grande aplicabilidade em diversos setores industriais e com promissor interesse científico para aplicações voltadas a indústria biotecnológica. As amostras marinhas e de sedimentos do solo Antártico, possuem um alto potencial de conterem micro-organismos com características únicas no que se refere a adaptação microbiana em ambientes extremos, o que torna estas comunidades microbianas promissoras na obtenção de produtos metabólicos diferenciados dos já encontrados a partir de células originárias de ambientes com temperaturas amenas. Neste sentido, o presente estudo objetivou a busca das enzimas amilases e proteases produzidas por bactérias associadas a ambientes de baixa temperatura bem como a avaliação das estruturas morfológicas destas linhagens proporcionando a estruturação de um acervo de linhagens bacterianas com potencial aplicação biotecnológica.

2 METODOLOGIA

Foi realizado uma triagem enzimática inicial utilizando 100 bactérias preservadas em método de ultracongelamento nas dependências laboratoriais da Universidade Federal da Integração Latina-Americana (UNILA), Campus Jardim Universitário. A enzima amilase foi triada de acordo com o método proposto por Anduaem & Gessesse (2013). Os isolados foram inoculados no meio SPYA (1% de amido solúvel, 0.5% de peptona, 1.5% de extrato de levedura e 1.5% de ágar), sendo as placas incubadas a 4 °C por duas semanas. Após crescimento microbiano, a solução (1% de iodo em 2% de iodeto de potássio) foi adicionada na superfície dos meios de cultivo. As colônias que apresentaram a formação de um halo/zona clara (cerca de 10 mm de diâmetro), foram selecionadas como isolados produtores putativos de amilase. Os experimentos foram realizados em triplicata. A enzima protease foi triada de acordo com método proposto por Wang et al. (2007), modificado. Os isolados foram inoculados no meio LPDA (3% de leite desnatado, 1.0% de glicose, 1.5% de ágar em caldo de batata), sendo as placas incubadas a 4 °C por duas semanas. As colônias que apresentaram a formação de um halo/zona clara (cerca de 10 mm de diâmetro), foram selecionadas como isolados produtores putativos de protease. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A caracterização morfológica dos isolados produtores das enzimas foi realizada, cultivando as linhagens em meio de cultivo NA (ágar nutriente), sendo incubadas a uma temperatura de 4 °C durante 15 dias. A caracterização morfológica dos isolados foi realizada pela técnica de coloração de Gram.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os ambientes extremos possuem uma variedade de condições complexas de caráter físico-químico, distintas dos demais ambientes como a temperatura, concentrações variadas do pH, maior pressão osmótica, além das limitações nutricionais. Micro-organismos psicrófilicos estabelecem adaptações que permitem seu desenvolvimento em baixas temperaturas e pouca exigência nutricional as quais, permitem que estas células tenham a capacidade de produzir metabólitos que são constantemente associados à aplicações biotecnológicas tais como enzimas e metabólitos secundários. Enzimas microbianas marinhas, apresentam capacidade

catalítica em condições extremas e abrangendo uma imensa diversidade bioquímica (Beygmoradi, A., & Homaei, A., 2017).

Representando 60% das enzimas aplicada em processos industriais, a protease é sem dúvida uma das enzimas mais importantes. As proteases possuem aplicações em distintas áreas industriais, como indústria têxtil (processamento do couro e degomagem da seda), indústria farmacêutica (atividade digestivas, nutracêutica e inflamatória), alcoólica (cerveja), alimentícia (alimentos, produtos lácteos, processos de cozimentos), extração da prata a partir de filmes de raios-x, processamento de resíduos (tratamento de água e esgoto), além da aplicação bioenergética. A alta aplicabilidade das proteases e o alto potencial dos micro-organismos de nichos frios e rigorosos, são áreas que indiscutivelmente, necessitam ser mais exploradas (Joshi, S., & Satyanarayana, T., 2013).

Assim como as proteases, as amilases têm um papel fundamental no mercado de enzimas, atendendo as demandas industriais, em alimentos panificados, fermentações, detergentes, liquefação de amido, indústrias têxteis e de papel, a utilização de enzimas ativas a frio possibilita várias aplicações benéficas. Existem poucas amilases com atividade abaixo de 15°C e em pH alcalino, enfatizando a importância da bioprospecção em ambientes pouco explorados (Vester, J. K., Glaring, M. A., & Stougaard, P., 2015).

4 RESULTADOS

No total cerca de 100 bactérias isoladas de ambiente frio foram triadas. Entretanto, 62 isolados apresentaram crescimento nos dois meios de cultivo utilizados nos experimentos (3% de leite – triagem da enzima protease e 1% de amido – triagem da enzima amilase), sendo que 13 linhagens foram capazes de apresentar produção enzimática, devido a formação de halo/zona clara no meio de cultivo. Dez e cinco isolados foram considerados putativos produtores da enzima protease e amilase, respectivamente. A linhagem 494 foi a melhor produtora enzimática, pois foi possível observar a formação de halo para este isolado nos dois meios de cultivos distintos.

Dentre as linhagens produtoras das enzimas testadas, sete foram caracterizadas como bactérias Gram positivas e duas Gram negativas. Quatro

isolados produtores enzimáticos estavam contaminados, o que torna os resultados para estes isolados insatisfatórios. As colorações das colônias bacterianas variaram entre as cores: creme (n=4), amarelo (n=1), amarelo claro (n=1), amarelo escuro (n=1), branca (n=1) e incolor (n=1).

5 CONCLUSÕES

Os resultados atingidos foram satisfatórios, uma vez que foi possível a identificação de bactérias que apresentaram produção das enzimas amilase e protease investigadas nos experimentos. Assim, podemos destacar a importância da realização de estudos voltados a micro-organismos psicrófilos de ambientes extremos, como o continente Antártico, encorajando estudos posteriores, empregando métodos de otimização e purificação das enzimas bacterianas para possível aplicação nos diversos setores industriais.

6 PRINCIPAIS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anduaem, B. Isolation and screening of amylase producing thermophilic spore forming Bacilli from starch rich soil and characterization of their amylase activities using submerged fermentation. *International Food Research Journal* 21, 831-837, 2014.

Beygmoradi, A., & Homaei, A. Marine Microbes as a valuable resource for brand new industrial biocatalysts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* . 11, 131-152, 2017.

Joshi, S., & Satyanarayana, T. Biotechnology of cold-active proteases. *Biology*, 2 (2), 755-783, 2013.

Vester, J. K., Glaring, M. A., & Stougaard, P. An exceptionally cold-adapted alpha-amylase from a metagenomic library of a cold and alkaline environment. *Applied Microbiology and biotechnology*, 99 (2), 717-727, 2015.

Wang, HY; Liu, DM; Liu, Y; Cheng, CF; Ma, QY; Huang, Q; Zhang, YZ. Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease for dehairing. *Letters in Applied Microbiology* 44, 1–6, 2007, crystallization and preliminary X-ray diffraction of the OleC protein from *Stenotrophomonas*.