



Caracterização e otimização de condições de produção do pigmento prodigiosina por *Serratia marcescens*

Mariana Sequeira Lopes Rodrigues Fernandes

Orientadores

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado
Mestre Ana Rita Simões Ferraz

Relatório de atividades apresentado à Escola Superior Agrária de Castelo Branco do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à conclusão da Licenciatura em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e co-orientado pela Mestre Ana Rita Simões Ferraz, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Novembro, 2022

Agradecimentos

E assim termina mais uma etapa desta caminhada. É com enorme satisfação que agradeço a todos os que, de alguma forma, contribuíram para que este momento fosse possível.

À Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e ao Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco por me proporcionarem a realização deste estágio.

À professora Doutora Cristina Santos Pintado, enquanto orientadora de estágio.

À minha co-orientadora, Ana Rita Ferraz, um agradecimento especial pela dedicação, compreensão e apoio diário em laboratório.

À professora Doutora Ofélia dos Anjos, por todo o apoio disponibilizado no que diz respeito à componente química que suporta este trabalho.

À Engenheira Manuela Goulão, por todos os conhecimentos transmitidos ao longo deste período.

A todos que, de uma forma ou outra, se foram cruzando comigo. Engenheiros, pessoal docente e não docente da escola.

À minha mãe e aos meus avós por acreditarem sempre em mim.

A todos, um enorme obrigada!

Resumo

A prodigiosina é um pigmento natural de cor vermelha. Pode ser produzida por diversas bactérias, mas *Serratia marcescens* é a principal produtora. Trata-se de um metabolito secundário de produção intracelular com diversas características biológicas e, por isso, de bastante interesse.

Neste trabalho foram avaliadas as culturas bacterianas *Serratia marcescens* ESACB 596 e *Serratia marcescens* ESACB 734, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, tendo por objetivos estudar as condições ótimas de produção, a atividade antimicrobiana do pigmento prodigiosina, bem como efetuar a sua caracterização química. Foram realizados estudos em três meios de cultura Luria Bertani (LB), Caldo Nutritivo (CN) e Peptona Glicerol Fosfato (PGP), dois valores de pH (7,5 e 8,0), duas temperaturas diferentes (22 °C e 28 °C) e diferentes períodos (24, 48 e 72 horas).

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que foi alcançado um pico de produção de prodigiosina pela cultura *S. marcescens* ESACB 734, em meio de cultura LB, com pH 8,0, a 22 °C e após 48 h de incubação. Através da curva de crescimento realizada verificou-se que são necessários cerca de 43 minutos para que a cultura duplique. Os testes antimicrobianos possibilitaram verificar que, das 14 culturas avaliadas, a prodigiosina inibiu o crescimento de duas bactérias (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Pseudomonas fluorescens* ESACB 137) e uma levedura (*Candida zeylanoides*). Quanto à caracterização química do pigmento foi possível identificar picos através dos espectros FTIR-ART e FT-RAMAN, contudo através do espectro de FT-RAMAN que foi possível obter uma caracterização mais completa da prodigiosina.

Palavras chave

Atividade antimicrobiana, Pigmento de origem bacteriana, bioprodução, FTIR, RAMAN

Abstract

Prodigiosin is a natural red pigment. It can be produced by several bacteria, but *Serratia marcescens* is the main producer. It is an intracellularly produced secondary metabolite with several biological characteristics and therefore of great interest.

The bacterial cultures *Serratia marcescens* ESACB 596 and *Serratia marcescens* ESACB 734, belonging to the culture collection of the Microbiology Laboratory of the Escola Superior Agrária de Castelo Branco, were evaluated, aiming to study the optimal production conditions and the antimicrobial activity of prodigiosin, as well as to perform its chemical characterization. Studies were performed in three culture media Luria Bertani (LB), Nutrient Broth (CN) and Glycerol Phosphate Peptone (GPP), two pH values (7.5 and 8.0), two different temperatures (22 °C and 28 °C) and different periods (24, 48 and 72 hours).

Based on the results obtained, it was verified that a peak of prodigiosin production was reached by *S. marcescens* ESACB 734 culture, in LB culture medium, with pH 8.0, at 22 °C, and after 48 h of incubation. Through the growth curve performed, it was verified that it takes about 43 minutes for the culture to double. Based on the antimicrobial tests, it was possible to verify that, of the 14 cultures evaluated, prodigiosin inhibited the growth of two bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Pseudomonas fluorescens* ESACB 137) and one yeast (*Candida zeylanoides*). Regarding the chemical characterization of the pigment, it was possible to identify peaks through the FTIR-ART and FT-RAMAN spectra, however it is through the FT-RAMAN spectrum that it was possible to obtain a more complete characterization of prodigiosin.

Keywords

Antimicrobial activity, Pigment of bacterial origin, bioproduction, FTIR, RAMAN

Índice geral

I. Introdução	1
II. Revisão Bibliográfica	1
1. <i>Serratia marcescens</i>	1
2. Pigmentos naturais.....	3
2.1. Pigmentos de origem microbiana.....	3
2.2. Prodigiosina.....	5
2.2.1. Fatores que influenciam a produção de prodigiosina.....	6
2.2.2. Aplicações da prodigiosina.....	7
3. Defeitos de cor em queijo.....	8
III. Material e Métodos	9
1. Culturas bacterianas.....	9
2. Meios de cultura.....	11
3. Otimização das condições da produção de prodigiosina.....	11
4. Curva de crescimento e tempo de duplicação de <i>S. marcescens</i> ESACB 734	12
5. Extração, purificação e quantificação de prodigiosina.....	13
6. Atividade antimicrobiana da prodigiosina.....	13
7. Caracterização química.....	13
7.1. FTIR-ATR.....	13
7.2. FT-RAMAN.....	14
IV. Resultados e Discussão	14
1. Otimização da produção de prodigiosina.....	14
2. Condições ótimas de produção de prodigiosina.....	18
3. Curva de crescimento.....	21
4. Atividade antimicrobiana de prodigiosina.....	23
5. Caracterização química.....	24
5.1 FTIR-ATR.....	24
5.2. FT- RAMAN.....	25
V. Considerações Finais	26
VI. Referências Bibliográficas	27

Índice de figuras

Figura 1. Delineamento do ensaio.....	12
Figura 2. Influência do pH no crescimento de A-B, <i>Serratia marcescens</i> ESACB 596. C-D, <i>Serratia marcescens</i> ESACB 734 em Caldo Nutritivo (CN), Luria Bertani (LB), Peptona Glicerol Fosfato (PGP), à temperatura de 22 °C. A e C. pH 8,0. B e D. pH 7,5	15
Figura 3. Influência do pH na produção de prodigiosina. A-B, Prodigiosina produzida por <i>Serratia marcescens</i> ESACB 596. C-D, Prodigiosina produzida por <i>Serratia marcescens</i> ESACB 734 em Caldo Nutritivo (CN), Luria Bertani (LB), Peptona Glicerol Fosfato (PGP), à temperatura de 22 °C. A e C. pH 8,0. B e D. pH 7,5	16
Figura 4. Influência do pH no crescimento de A-B, <i>Serratia marcescens</i> ESACB 596. C-D, <i>Serratia marcescens</i> ESACB 734 em Caldo Nutritivo (CN), Luria Bertani (LB), Peptona Glicerol Fosfato (PGP), à temperatura de 28 °C. A e C. pH 8,0. B e D. pH 7,5	17
Figura 5. Influência do pH na produção de prodigiosina. A-B, prodigiosina produzida por <i>Serratia marcescens</i> ESACB 596. C-D, Prodigiosina produzida por <i>Serratia marcescens</i> ESACB 734 em Caldo Nutritivo (CN), Luria Bertani (LB), Peptona Glicerol Fosfato (PGP), à temperatura de 28 °C.....	18
Figura 6. Influência do pH, do meio LB na produção de prodigiosina a 28 °C.....	19
Figura 7. Influência do pH, do meio LB na produção de prodigiosina a 22 °C.....	19
Figura 8. Influência do tempo de incubação, na produção de prodigiosina a 22 °C, no meio LB pH 8,0.....	20
Figura 9. Curva de crescimento de <i>Serratia marcescens</i> ESACB 734 em LB, pH 8,0, 22 °C, 150 rpm.....	21
Figura 10. Relação empírica entre o Log UFC/mL e a densidade ótica a 600nm do crescimento de <i>Serratia marcescens</i> ESACB 734.....	22
Figura 11. Regressão linear para obtenção da equação da recta que retrata a evolução do crescimento de <i>S. marcescens</i> ESACB 734.....	23
Figura 12. Espetro de FTIR da prodigiosina.....	25

Figura 13. Espectro do pigmento prodigiosina produzida por *Serratia marcescens* ESACB 734 por FT-RAMAN.....26

Lista de tabelas

Tabela 1. Pigmentos naturais de origem microbiana.....	4
Tabela 2. Bactérias que produzem pigmentos usados nas diferentes indústrias.....	5
Tabela 3. Estirpes utilizadas para análise da atividade antimicrobiana.....	10
Tabela 4. Composição química dos meios de cultura líquidos testados na otimização de produção de prodigiosina.....	11
Tabela 5. Condições ótimas de produção de prodigiosina.....	20
Tabela 6. Atividade antimicrobiana.....	24