

BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS MARINHOS QUE DEGRADAM AGAR E PRODUÇÃO DE EXTRATO COM ATIVIDADE AGAROLÍTICA

Francisco Ewerton de Sousa Lima; Marjory Lima Holanda Araújo

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular / Universidade Federal do Ceará
fco.ewerton.lima@alu.ufc.br
marjory99@yahoo.com

INTRODUÇÃO

As macroalgas marinhas vermelhas são organismos fotossintetizantes, produtoras primárias dos oceanos e fonte de biomoléculas de interesse industrial. Atualmente, os componentes mais utilizados das macroalgas são os polissacarídeos, os quais apresentam propriedades gelificantes, emulsificantes, estabilizantes que encontram aplicações desde a indústria de alimentos até a farmacêutica, cosmética, têxtil, química e de biocombustíveis.

A biomassa algal e seus carboidratos, por outro lado, podem gerar diversas moléculas derivadas e também servirem como substrato para processos microbiológicos industriais que visam a síntese de produtos de alto valor agregado, como enzimas e oligossacarídeos. Nessa vertente, várias pesquisas descrevem a importância da bioprospecção de enzimas capazes de degradar esses polímeros gerando assim produtos e novas aplicações. Um entrave para síntese de produtos *eco-friendly* baseados em hidrólise enzimática está no alto custo das enzimas utilizadas em larga escala.

O ágar é um polissacarídeo extraído de macroalgas marinhas vermelhas do gênero *Gelidium* e *Gracilaria* e é uma mistura heterogênea de dois tipos de polissacarídeos a agarose e a agaropectina. A agaropectina, fração não-geleificante, é um polissacarídeo sulfatado (3% a 10%) composto de agarose e porcentagens variadas de éster sulfato, ácido D-glucurônico e pequenas quantidades de ácido pirúvico. A agarose, fração geleificante, é uma molécula linear neutra, que consiste de cadeias repetidas de unidades alternadas D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose unidas por ligações dos tipos α -1,3 e β -1,4. Essas ligações glicosídicas são singulares e reconhecidas por enzimas produzidas por microrganismos marinhos, como as agarases. Elas são classificadas em α -agarase e β -agarase que clivam nas ligações α -1,3 e β -1,4, respectivamente. Essa clivagem gera como produtos uma gama de neo- e agarooligossacarídeos que possuem importância biológica, bioquímica, alimentícia e farmacêutica. Além disso as agarases podem ser aplicadas para a recuperação de DNA em gel de eletroforese, produção de protoplastos na cultura de tecidos de algas, sacarificação de meios de culturas a base de algas para fermentação, dentre outras.

Assim, o objetivo desse trabalho foi prospectar, isolar e caracterizar um microrganismo agarolítico, bem como obter um extrato enzimático a partir do seu cultivo em meio constituído de macroalga agarófita.

METODOLOGIA

Prospecção e isolamento do microrganismo agarolítico em meio sólido

Mudas de uma espécie de macroalga agarófita cultivada no litoral cearense foram colhidas e transportadas para a sala de Cultivo de Algas, anexo ao Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas (BioAP – UFC), e mantidas em água do mar suplementada com solução de Von Stosh $\frac{1}{2}$ e fotoperíodo de 12/12 (claro/escuro) com aeração constante.

Explantos da macroalga (1 cm) foram obtidos e posicionados sobre o meio ASP 12-NTA solidificado com ágar 0,8% em placa de Petri, as quais foram mantidas em câmara de germinação a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo 12:12 claro-escuro por 72h.

As colônias microbianas formadas em torno dos explantes que apresentaram liquefação do ágar foram utilizadas para o isolamento pelo método de esgotamento em meio contendo água do mar e ágar 0,8%. Após o isolamento do microrganismo, seu crescimento foi avaliado em meio sólido contendo alguns sais marinhos artificiais (em g L^{-1}): NaCl (24,6), KCl (0,67), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,36), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (6,29), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3,69), NaHCO_3 (0,18), NaNO_3 (0,20), denominado M001 e solidificado com ágar 1,0% como única fonte de carbono. (GUPTA *et al.*, 2013. adaptado).

Prospecção de microrganismo agarolítico por fermentação natural da macroalga

O resíduo sólido gerado a partir da obtenção do extrato aquoso da macroalga foi utilizado como fonte de microrganismos agarolíticos. Assim, 80 g de resíduo úmido foi adicionado a 80 mL de água destilada e o homogenato foi mantido em agitador orbital a 150 rpm, 32°C por 7 dias. Após esse período, o fermentado foi centrifugado a 5000 xg, 4°C por 10min, o sobrenadante, denominado extrato enzimático S80/80. Uma parte das células, depositadas na parte superior do *pellet*, foi transferida para solução NaCl 0,9% da qual uma alíquota de 1 mL foi transferida para a placa de Petri contendo meio ATE (em g L^{-1} : ágar (10,0), tripton (5,0) e extrato de Levedura (2,5)) pH $7 \pm 0,2$ por *spread-plate*, então as colônias microbianas que apresentaram liquefação do ágar foram submetidas às etapas de isolamento como descritas no item anterior.

Uma parte do *pellet* foi submetido a um novo processo fermentativo ao adicionar água destilada (1:1) e mantido nas mesmas condições citadas anteriormente, por mais 7 dias. Então, foi

submetido ao procedimento de centrifugação e o sobrenadante (extrato enzimático 2S80/80) foi armazenado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Testes bioquímicos e caracterização morfológica das colônias microbianas isoladas

1. Fermentação de carboidratos: Utilizado meio ATE com substituição do agar por $1,0\text{ (g L}^{-1}\text{)}$ de glicose, galactose, sacarose, lactose ou maltose e verificado a formação de gás pelo tubo de Durham. Os tubos foram incubados por 48 h a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Triplo Açúcar e Ferro (TSI): foi inoculado em meio TSI solidificado com ágar 1,5% em camada alta e mantidos a 32°C por 18h.
3. Fenilalanina: foi inoculado em meio Agar Fenilalanina em camada alta e após 16h adicionado de FeCl_3 10% e após 5 min verificado se houve mudança na coloração.
4. MacConkey: Preparado em placa de Petri e avaliado o crescimento e acidificação do meio pela mudança de cor.

Para as características coloniais, os microrganismos foram crescidos em placa de Petri no meio ATE por 48h a 32°C , e observada em lupa de aumento.

Avaliação da atividade agarolítica dos extratos enzimáticos

A atividade agarolítica de S80/80 e 2S80/80 foi avaliada através de Zimograma, onde uma eletroforese no gel de poliacrilamida (10%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada, substituindo a água destilada por solução de ágar 0,2%. Os extratos enzimáticos foram adicionados no tampão de amostra sem aquecimento e corrido a 200V, 20mA por 1h. Após a corrida, o gel foi lavado com Triton X-100 1%, em seguida com tampão Tris-HCl 20mM pH 7,0 até a retirada do detergente e incubado no mesmo tampão por 1h a 40°C . A revelação foi feita com Lugol 2% no gel mantendo o contanto por 5min.

O perfil proteico e as massas moleculares das proteínas presentes nos extratos enzimáticos foram avaliados através de eletroforese SDS-PAGE (12,5%). Foram utilizados marcadores proteínas com massas moleculares definidas (kDa): Fosforilase b (97), Albumina (66), Ovalbumina (45), Anidrase carbônica (30), Inibidor de Tripsina (20,1) e α -lactalbumina (14,4).

A atividade enzimática do extrato (U/mL), definida pela geração de $1\text{ }\mu\text{mol}$ de açúcar redutor (galactose) por minuto, foi determinada pela aplicação de 0,5mL em Tris-HCl 20mM com ágar 0,1% e pH 7,0 por 15 min. O teste foi revelado pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por MILLER (1959).

RESULTADOS

Prospecção e isolamento do microrganismo agarolítico em meio sólido

Houve crescimento de microrganismos que degradaram ágar nos explantes da macroalga como pode ser observado na Figura 1.

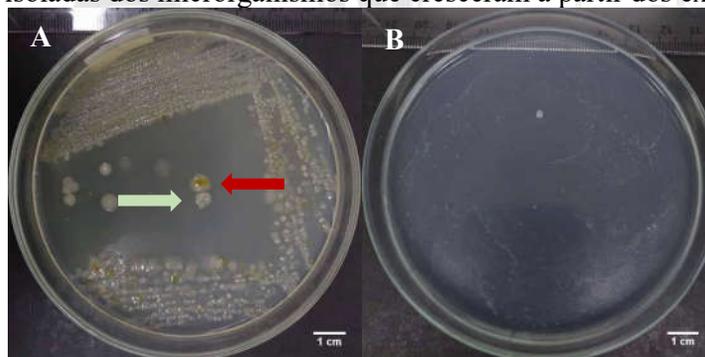
Figura 1 – Crescimento microbiano associado aos explantes da macroalga com uma degradação do ágar presente no meio de cultura.



Formação de colônias provindas do explante de *G. birdiae*. Pode-se perceber a heterogeneidade do tamanho, formas e cores das colônias formadas, indicando variados microrganismos. Liquefação bem evidente do meio de cultura. (Fonte: Elaborado pelo autor)

A partir dessas colônias foi possível o isolamento de dois microrganismos (GB001 e GB002) agarolíticos em meio ATE (Figura 2).

Figura 2 - Colônias isoladas dos microrganismos que cresceram a partir dos explantes de *G. birdiae*



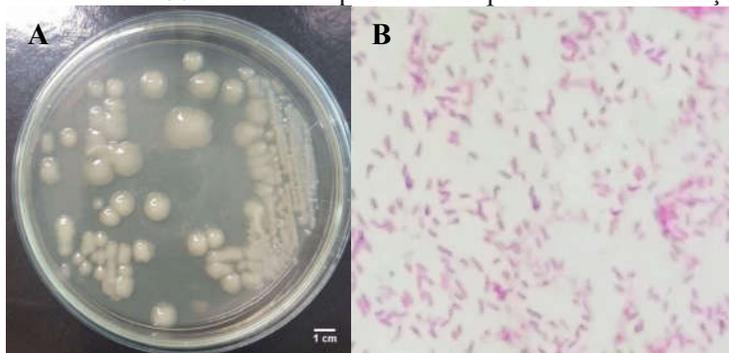
Em **A** predomínio de duas colônias (seta vermelha: GB001 e seta verde: GB002) no meio ATE. Em **B** as colônias uniformes que cresceram no meio M001, de forma translúcida, mas quando transferido para placa ATE caracteriza-se como GB002. (Fonte: Elaborado pelo autor)

O resultado em **B** mostra que além de utilizar o ágar como sua fonte de carbono sugere que essa bactéria também pode ser capaz de fixar nitrogênio, uma vez que nesse meio o nitrogênio é escasso o que comprometeu o crescimento, mas não o impediu. Assim, GB002 foi utilizado para estudos posteriores, além do fato de ele ser o principal agente colonizador da alga quando realizado a fermentação natural em que o crescimento em placa foi predominante (Figura 3A).

GB002 apresentou a seguinte morfologia: forma circular, grande, borda lisa, elevação convexa, branco tênue, opaca brilhante, mucilaginosa e tamanho 2 mm em 24h.

Como mostrado na Figura 3B, após realizado o procedimento de coloração de Gram o resultado foi a morfologia baciforme Gram-negativo. E testes bioquímicos (Tabela 1).

Figura 3 - Colônias GB002 isoladas a partir do bioprocesso em condições naturais



Em A estão as colônias isoladas e B o resultado do procedimento de coloração de Gram. (Fonte: Elaborado pelo autor)

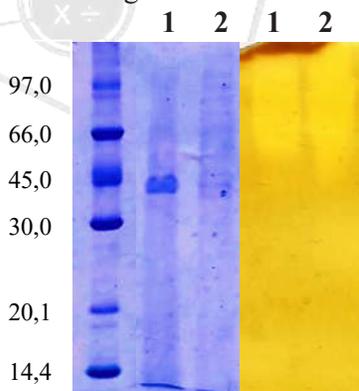
Tabela 1 – Resultados dos testes bioquímicos realizados com o microrganismo GB002

Fermentação de carboidratos	Positivo para maltose, glicose, sacarose, lactose e galactose
TSI	Camada alta amarela: Fermentação de lactose e/ou sacarose Coloração do fundo amarela: Fermentação glicose Negativo para bolhas, quebras no meio e produção de H ₂ S
MacConkey	Crescimento: indicação de enterobactéria Alteração do meio para amarelo: acidificação.
Fenilalanina	Sem mudança de cor: sem produção da enzima fenilalanina desaminase

Avaliação proteica e da atividade agarolítica de S80/80 e 2S80/80

Com a realização da eletroforese (SDS-PAGE) foi observado o perfil mostrado na Figura 7.

Figura 7 – Perfil eletroforético e zimografia das amostras S80/80 (1) e 2S80/80 (2)



No gel de eletroforese (azul) é evidenciada uma banda predominante na altura aproximada de 40kDa, enquanto no zimograma (amarelo) houve a degradação do gel até a altura das bandas proteicas. (Fonte: Elaborado pelo autor)

A figura acima mostra um perfil semelhante para as duas amostras sendo que o perfil proteico apresenta uma Massa Molecular relativa de aproximadamente 40kDa, enquanto no zimograma houve a degradação do gel de ágar mesmo na presença de SDS 10% (agente desnaturante proteico) mostrando que a enzima resiste a esse tipo de condição química.

Uma vez verificada essa degradação qualitativa em gel, o ensaio enzimático, com S80/80 realizado também mostrou uma atividade enzimática de 1,22 U/ml.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados, foi possível isolar e caracterizar a morfologia da colônia de um microrganismo agarolítico, produtor de uma agarase e passível de cultivo em condições estabelecidas em laboratório para obtenção de um extrato enzimático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOZAL, N.; TUDELA, E.; ROSSELLÓ-MORA, R.; LALUCAT, J.; GUINEA J. *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., Isolated from an Antarctic Coastal Environment. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 47, n. 2, p. 345, 1997

FENG, Z. and LI, M. Purification and characterization of agarase from *Rhodococcus* sp. Q5, a novel agarolytic bacterium isolated from printing and dyeing wastewater. **Aquaculture**. p. 74-79, 2013.

MORRICE, L.M.; McLEAN, M.W.; Williamson, F.B.; Long, W.F. beta-agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*. Purifications and some properties. **Eur. J. Biochem**. p. 553-558, 1983

SHIEH, W.Y.; SIMIDU, U.; MARUYAMA, Y. Nitrogen fixation by marine agar-degrading bacteria. **Journal of General Microbiology**. p. 1821-1825, 1988

SORKHOH, N.A.; AL-AWADHI, H.; AL-MAILEM, D.M.; KANSOUR, M.K.; KHANAFER, M.; RADWAN, S.S. Agarolytic bacteria with hydrocarbon-utilization potential in fouling material from the Arabian Gulf coast. **International Biodeterioration and Biodegradation** 64, 554-559, 2010

FU, X.T; KIM, S.M. Agarase: Review of Major Sources, Categories, Purification Method, Enzyme Characteristics and Applications. **Marine drugs**. v. 8, p. 200-218, 2010

VERA, J.; ALVAREZ, R.; MURANO, E.; SLEBE, J.C.; LEON, O. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 4378-4383. 1998