

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

ENZITEC 2016

Otimização da Produção de Enzimas Fibrinolíticas pela Microalga

Scenedesmus sp.

Ariadne Tennyle Vieira de Souza¹, Páblo Eugênio da Costa e Silva², Priscila Danielly Santos de Barros², Polyanna Nunes Herculano³, Ana Lúcia Figueiredo Porto³, Raquel Pedrosa Bezerra³

¹Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas – Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE,
Rua Dom Manuel Medeiros, s/n, Dois Irmãos- Recife- PE- E-mail: ariadne.tennyle@gmail.com

²Programa de Pós Graduação em Biologia Aplicada à Saúde- Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, Av.
Prof. Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária, Recife- PE

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE
Rua Dom Manuel Medeiros, s/n, Dois Irmãos- Recife- PE

RESUMO

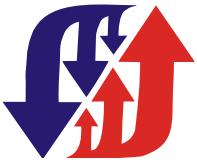
Microalgas possuem importância na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. A doença trombótica é considerada como uma das principais causas de morte em todo o mundo e sua terapia faz uso de enzimas geralmente caras e de baixa especificidade. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de enzimas fibrinolíticas a partir da microalga Scenedesmus sp. cultivada em meio suplementado com milhocina. A microalga foi cultivada nas condições autotrófica e mixotrófica e testou-se a atividade fibrinolítica com o extrato da biomassa obtida de ambas as condições. A condição livre de milhocina apresentou 311 U/mL de enzimas fibrinolíticas. A biomassa enriquecida com milhocina apresentou 338 U/mL de enzimas fibrinolíticas. A condição mixotrófica, se mostrou mais viável para a produção de enzimas fibrinolíticas.

Palavras-chave: Produção; enzimas fibrinolíticas; *Scenedesmus*; milhocina.

INTRODUÇÃO

As microalgas são utilizadas amplamente na alimentação animal, na extração de substâncias de importância farmacêutica, alimentícia, cosmética e industrial, além de servir como indicadores biológicos (Lourenço, 2006).

As proteínas possuem diversas funções, sejam estruturais, transportadoras, reguladoras, enzimáticas, dentre outras. Proteínas com funções enzimáticas são denominadas proteases (Nelson, 2004). As proteases podem ser oriundas de fontes vegetais, animais e de micro-organismos (NEVES, 2006). Proteases são utilizadas em diversas atividades industriais, tais como no processamento de alimentos, bebidas, formulação de detergentes, processamento do couro e de peles, no amaciamento de carne e formulação de medicamentos, entre outras. O uso dessas enzimas corresponde a 40% do mercado mundial de biocatalisadores, avaliado em um bilhão de dólares (NEVES, 2006).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

ENZITEC 2016

Na literatura há relatos da obtenção de proteases com atividade fibrinolítica a partir de fungos e microalgas (Inácio et al, 2013; Nascimento, 2014; Silva, 2013).

A milhocina é um subproduto da maceração do milho, contém grande quantidade de nitrogênio, aminoácidos, dentre outros nutrientes. Estudos estão sendo feitos para adicioná-la à processos fermentativos, como fonte de nutrientes para os micro-organismos (Zanotto, 2011). A milhocina vem sendo usada como substrato para produção de enzimas fibrinolíticas a partir de outros micro-organismos como bactérias e fungos (Nascimento, 2015).

O trombo ou coágulo forma-se quando as células sanguíneas são aprisionadas em uma proteína de matriz de fibrina. Uma enzima pode atuar na dissolução de coágulos. Este processo é conhecido como trombólise ou fibrinólise. Na circulação sanguínea dos mamíferos, a enzima responsável por este processo é a plasmina, uma protease presente no soro do tipo tripsina (Hernández et al., 2005).

É bem conhecido que a doença trombótica é considerada como uma das principais causas de morte em todo o mundo. Para combater as falhas homeostáticas e assim a formação do coágulo, faz-se necessário o uso de agentes trombolíticos. A terapia trombolítica ainda é a melhor maneira de conseguir reduzir essa doença (Venkatanagaraju et al., 2014).

Portanto, a busca por agentes trombolíticos seguros, mais baratos e de fontes renováveis tem ganho bastante destaque. A base do tratamento fibrinolítico faz uso de uma gama de enzimas fibrinolíticas ativadoras de plasminogênio e uroquinase, entretanto essas enzimas são caras e possuem baixa especificidade para fibrina, além de causar efeitos indesejáveis como hemorragia gastrointestinal e reações alérgicas (Simkhada, 2010; Hua et al, 2008; Venkatanagaraju et al., 2014).

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de enzimas fibrinolíticas a partir da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em meio suplementado com milhocina.

MATERIAIS E MÉTODOS

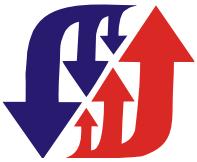
Isolamento da microalga: O isolamento da microalga foi realizado utilizando-se o método de plaqueamento, proposto por Kugrens et al. (2000). Os micro-organismos que apresentaram crescimentos diferenciados foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio BG-11 líquido e foram feitas tentativas para retirar uma “unidade algal”, representada por uma célula, uma colônia ou um filamento. Repicagens sucessivas foram feitas com alça de platina esterilizada para novas placas, com o propósito de obter culturas unialgais. Foram feitas repicagens sucessivas para a obtenção de isolados.

Cultivo de *Scenedesmus* sp.: O meio padrão utilizado foi BG-11 (Stanier et al., 1971).

Condições de cultivo: Inicialmente a microalga foi cultivada em frascos de Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 400 mL do meio de cultivo, aerado com uma bomba de ar, à temperatura de 30 °C e iluminância de 42 µmol fótons m⁻² s⁻¹. As células foram recolhidas por centrifugação na final da fase exponencial, com uma concentração celular inicial de 50 mg L⁻¹ (Pelizer et al., 2003), nas mesmas condições descritas acima. Ar filtrado em membrana 0,22 µm foi adicionado durante o crescimento celular para homogeneização celular e fornecimento de CO₂ providos do ar atmosférico. No cultivo mixotrófico foram adicionados ao meio de cultura padrão milhocina previamente tratada, para potencializar a produção de enzimas fibrinolíticas baseados de acordo com Mahboob et al., (2012)..O tratamento da milhocina segue a metodologia descrita por Liggett e Koffler (1998).

Determinação da concentração celular: A concentração celular foi determinada por turbidimetria a 665nm (Chen et al., 2013).

Extração da enzima fibrinolítica por homogenização: Foi utilizado a metodologia de Matsubara et al (2000), que consiste na homogeneização da biomassa microalgal,



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

ENZITEC 2016

lioofilizada, utilizando tampão fosfato (PB), pH 7.0 a 0.1 M durante 30 minutos e temperatura ambiente. Em seguida o homogeneizado é centrifugado a 15.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para a avaliação da atividade fibrinolítica;

Determinação da atividade fibrinolítica: A atividade fibrinolítica foi avaliada de acordo com a metodologia de espectofotometria, descrita por Wang, (2011). A atividade fibrinolítica foi avaliada de acordo com a metodologia da placa de fibrina, descrita por Astrup e Mullertz (1952), modificada. As modificações consistem na utilização de: 0,45% de fibrinogênio, 2% de agarose e 200 µL de CaCl₂.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A condição autotrófica apresentou 311 U/mL de enzimas fibrinolíticas e a biomassa enriquecida com milhocina apresentou 338 U/mL de enzimas fibrinolíticas.

Vijayaraghavan e Vincent, (2015), ao avaliarem a produção de enzimas fibrinolíticas a partir de *Shewanella* sp. fermentada em diferentes substratos encontraram 453 U/mL de enzimas com o fermentado em esterco de vaca, 48 U/mL em casca de banana, 312 U/mL em casca de grama verde, 170 U/mL em farelo de arroz, 221 U/mL em farelo de trigo.

A produção de enzimas obtidas em nosso trabalho foi próximo ao valor máximo obtido por Vijayaraghavan e Vincent, (2015) e superior em relação aos demais substratos testados pelo mesmo. O substrato milhocina mostrou-se eficaz para produção de enzimas fibrinolíticas utilizando a microalga *Scenedesmus* sp.

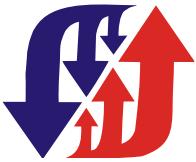
A condição autotrófica apresentou valores de atividades enzimáticas semelhantes quando comparadas aos cultivos mixotróficos. Acredita-se que a produção elevada de protease da *Scenedesmus* sp. nas condições autotróficas se deve a adaptação ao local de onde foi isolada, na qual é rica em compostos orgânicos. Mahajan (2012), relata que o ambiente marinho fornece micro-organismos e condições que auxiliam na produção de metabólitos não encontradas no ambiente terrestre ou *in vitro*.

Os halos encontrados pelos extratos foram de 69 mm² para o cultivo livre de milhocina e 82 mm² para o cultivo fermentado com milhocina. Resultado superior aos encontrados para a espécie de alga *Codium fragile*, que apresentou 79 mm² e inferior a espécie *Codium intricatum*, macroalga, que apresentou 346 mm² (Matsubara, 1998).

As microalgas apresentam vantagens na produção de compostos, em relação as plantas, visto que apresentam uniformidade do organismo, além de requerer menor investimento monetário para sua produção, utilização de solos destinados a agropecuária ou outras culturas, embora cresçam em meio aquoso, consomem menos água do que plantas terrestres e a água residual pode ser reutilizada no processo, reduzindo o consumo global de água doce, os nutrientes para seu cultivo podem ser obtidos a partir de águas residuais e resíduos agroindustriais, podem ser cultivados o ano inteiro, independente de safra, podem ser cultivadas em fotobioreator compacto, reduzindo as áreas de cultivos e também participar da captura do dióxido de carbono proveniente de uma fonte poluidora (Lemos, 2012; Hakalin 2014).

CONCLUSÕES

A concentração de 0,25% de milhocina proporcionou um crescimento celular significativo e produção de 338 U/mL de enzimas fibrinolíticas. Embora a condição autotrófica tenha apresentado valores relevantes, acredita-se que seja apenas momentâneo, frente a adaptação do meio onde a cepa foi coletada. A condição mixotrófica, enriquecida com milhocina se mostrou a mais viável para produção de enzimas fibrinolíticas, sendo necessária a continuidade dos experimentos, a fim de purificar e caracterizar a enzima.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

ENZITEC 2016

REFERÊNCIAS

- MAHAJAN, P. M. et al., Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Volume 113, Issue 3, March 2012, Pages 307–314.
- LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: principios e aplicações. Editora: Rima, 2006.
- NELSON, D.L; COX, M.M. Lehninger Principios de bioquímica. 4. ed. SaoPaulo: Editora Sarvier, 2004.
- ASTRUP, T. e MULLERTZ, S. The fibrin Plate method for estimating fibrinolytic activity.Dinamarca, 1952.
- CHEN, L. et al, Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system. *Bioresource Technology*. Pages 9–15. 2013.
- HAKALIN, N., L., S. Otimização das condições de cultivo da Microalga *scenedesmus* sp. Para a produção de biodiesel. Brasília, 2014.
- HERNÁNDEZ, L. MARRERO, M.A. *Estreptoquinasa: a propósito de un agente trombolítico patentado en Cuba*. 2005.
- HUA, Y. et al. Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus* sp. nov. SK006 Isolated from an Asian Traditional Fermented Shrimp Paste.Canadá. 2008.
- LEMOS, S., J. Desenvolvimento de sistema de tratamento e reciclagem de meio de cultivo de microalgas para produção de biodiesel; Curitiba, 2012.
- LIGGETT, R. W. e KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. 1998.
- MAHABOOB, S.; RAUF, A.; ASHEF; SULTANA, T.; SULTANA, S.; JABEEN, F.; RAJOKA, M.I.; AL-BALAWI, H.F.A.; AL-GJANIM, K.A. High-density growth and crude protein productivity of a thermotolerant *Chlorella vulgaris*: production kinetics and thermodynamics. *Aquaculture International*, v. 20, 455-466, 2012.
- MATSUBARA, K et al., Purification and Characterization of Two Fibrinolytic Enzymes from a Marine Green Alga, *Codium intricatum*. *Comparative Biochemical Physiology B Biochemical Molecular Biology*,1998.
- MATSUBARA, K. et al., Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codiumdivaricatum*. *Comparative Biochemical Physiology B Biochemical Molecular Biology*, v. 125, p. 137–143, 2000.
- NASCIMENTO,R., A. L. et al. Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *aspergillus niger* (ucp/wfcc 1261) Use of corn steep liquor for bioactives compounds production by *Aspergillus niger* (ucp/wfcc 1261).2015.
- NASCIMENTO, T., P. Produção de proteases com atividade fibrinolítica por fungos Filamentosos de solos da caatinga utilizando fermentação em estado sólido. 2014.
- NEVES, K. C. S. et al. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. UFAM. 2006.
- SIMKHADA, J. R. et al., A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684. *Process Biochemistry*. Volume 45, Issue 1, January 2010, Pages 88–93.
- Pelizer, L.H.; Danesi, E.D.G.; Rangel, C.O.; Sassano, C.E.N.; Carvalho, J.C.M.; Sato, S.; Moraes, I.O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *J Food Eng*, 56, 371-375, 2003.
- SILVA, P. E. C. Produção de enzima fibrinolítica a partir da microalga *Chorella vulgaris* UTILIZANDO resíduos industriais. 2013.
- STAINER, R. Y., R. KUNISAVA, M. MANDEL & G. COHEN-BAZIRE, 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bact. Rev.* 35: 171–205.
- VENKATANAGARAJU, E. et al, overview onfibrinolytic proteases purification strategies. *International Journal of Pharmacy Research & Science*. 2014
- VIJAYARAGHAVAN, P. e VINCENT, S.G.P., A low cost fermentation medium for potential fibrinolytic enzyme production by a newly isolated marine bacterium,*Shewanella* sp. IND20. *Biotechnology Reports* Volume 7, September 2015, Pages 135–142.
- WANG, S. et al., A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. Volumme 159, (2011), 18–25.