



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**FRANCISCO EWERTON DE SOUSA LIMA**

**IDENTIFICAÇÃO DE UMA ENZIMA AGAROLÍTICA DE MICRORGANISMO  
MARINHO ASSOCIADO A MACROALGA *Gracilaria birdiae***

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2018**

FRANCISCO EWERTON DE SOUSA LIMA

IDENTIFICAÇÃO DE UMA ENZIMA AGAROLÍTICA DE MICRORGANISMO  
MARINHO ASSOCIADO A MACROALGA *Gracilaria birdiae*

Monografia apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo

FORTALEZA - CEARÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L698i     Lima, Francisco Ewerton de Sousa.  
            Identificação de uma enzima agarolítica de microrganismo marinho associado a macroalga *Gracilaria birdiae* / Francisco Ewerton de Sousa Lima. – 2018.  
            58 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.

1. Bioprocesso. 2. Atividade agarolítica. 3. Bioprospecção. I. Título.

CDD 661

---

FRANCISCO EWERTON DE SOUSA LIMA

IDENTIFICAÇÃO DE UMA ENZIMA AGAROLÍTICA DE MICRORGANISMO  
MARINHO ASSOCIADO A MACROALGA *Gracilaria birdiae*

Monografia apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de ciências da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Tereza Sousa da Silva (*in memoriam*)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e graças em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Luis Filho e Maria Lúcia, que são os maiores responsáveis pelas minhas conquistas, e por sempre me darem suporte para continuar seguindo em frente meio as dificuldades. À minha irmã Mary Karoline, que sempre esteve comigo me apoiando.

Às amigas Janilly Késsia, Viviane Andrade, Larisse Cruz que sempre estiveram presentes na minha caminhada desde o ensino fundamental, e hoje, apesar do tempo, continuamos juntos.

À Professora Dra Márjory Lima Holanda Araújo, por me aceitar e me acolher no seu laboratório, e por toda disponibilidade, ajuda e excelente orientação durante o desenvolvimento do trabalho.

À Professora Dra Norma Maria Barros Benevides, pela parceria com nosso grupo de pesquisa e o acolhimento no Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec-DBBM UFC), no qual é coordenadora. E aos demais integrantes do CarboLec em especial Renata Line, Vitória Virgínia, Edna Cordeiro, Ingrid Holanda e Cirlânio Albuquerque.

A todos do Laboratório de Aplicações Biotecnológica de Algas e Plantas – BioAP (atualmente Laboratório de Biotecnologia de Algas e Processos), pela parceria, amizade incondicional e valorosa contribuição nesta conquista. Em especial aos amigos Adson Ávila, Andrea Costa, Adrienne Maia, Cristiane Nogueira, Caroline Landim, Acrisio Bastos, George Meredite, Ingrid Queiroz, Vilmara Farias, Neto Silva, Ticiania Lima, Lucas Lopes, Carolina Dantas, Prof Hermógenes David.

À toda a 5ª Turma do Bacharelado em Biotecnologia da UFC, ingressantes no ano de 2014, por termos iniciado essa caminhada juntos e apesar do tempo e cada um seguindo seu próprio caminho, sempre nos reencontramos quando podemos e trocamos conhecimentos sobre diversos assuntos.

A todos os professores que ministram aulas e contribuem com o Bacharelado em Biotecnologia, pelos seus ensinamentos durante minha permanência no curso.

À banca examinadora, composta pelos professores Profa. Dra. Daniele Bezerra e Prof. Dr. Hermógenes David pela disponibilidade e compreensão na avaliação desse trabalho, além do papel fundamental durante a graduação.

Aos amigos que fiz no curso, em especial Jonathan Santos e Matheus Girão que tiveram uma importante contribuição durante a graduação, principalmente na superação de obstáculos difíceis.

À Brenda Fontinele, Dayane Guerra, Letícia Cavalcante, Jackson Lima, Christina Veríssimo, Patrícia Gomes, Bruno Sousa pela amizade conquistada durante o curso de Biotecnologia.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela ajuda e amizade durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

À UFC, por meio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que disponibilizou o espaço físico para execução do referido trabalho.

À coordenação do Bacharelado em Biotecnologia da UFC, em nome da Profa. Dra. Cristina Paiva (coordenadora), Gilmar Ferreira (secretário) e Profa. Dra. Márjory (Vice coordenadora), que sempre incentivou o desenvolvimento os três pilares da universidade (ensino, pesquisa e extensão) no desenvolvimento dos alunos, buscando sempre a melhoria do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelas bolsas de iniciação científica concedidas durante minha graduação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

“A ciência nunca resolve um problema sem  
criar pelo menos outros dez.” (George B. Shaw)

## RESUMO

As algas marinhas são organismos ricos em biocompostos para vastas aplicações industriais. Com isso, várias pesquisas são realizadas no intuito de promover a utilização dessa biomassa para a geração de novos produtos e processos em benefício da sociedade. Agarases são enzimas que catalisam a reação de degradação do ágar gerando produtos principalmente de interesse cosmético, farmacêutico e alimentício. Neste trabalho a microbiota da macroalga *Gracilaria birdiae* foi estudada e possibilitou o isolamento de uma bactéria agarolítica (codificada de GB002), que apresentou elevado crescimento em meio de cultura salino de composição NaCl 2,5%, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5%, KCl 0,1%, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01%, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,002%, extrato de levedura 0,1% a 32 °C, pH 7,0 e ágar 0,1% como sua única fonte de carbono. Meios de cultura com variações nas fontes de carbono e nitrogênio orgânico (ágar comercial, peptona e biomassa de *Gracilaria birdiae*) foram testados e GB002 mostrou crescimento rápido e com um acúmulo de biomassa em todos. A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max} = 0,376 \text{ h}^{-1}$ ) de GB002 foi observada quando *G. birdiae* foi utilizada como fonte de nutrientes. Combinado com o crescimento o estudo da produção de agarase foi maior no meio contendo ágar comercial como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio em 6 h de cultivo ( $0,490 \pm 0,090 \text{ U mL}^{-1}$ ), todavia o meio preparado a partir 1% da biomassa fresca de *G. birdiae* apresentou a maior concentração microbiana de todos os meios estudados ( $1,82 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) e 95,9% da atividade enzimática máxima encontrada no meio anterior. O crescimento em ambos os meios de cultura apresentou uma fase *lag* baixa (< 4h) e o declínio das culturas iniciaram por volta de 24 h. Foi observada uma proteína com massa aproximada de 44 kDa por SDS-PAGE 12,5%, sendo revelada a atividade enzimática por zimografia. Com base nos experimentos foi possível a produção de um extrato proteico com atividade agarolítica de  $3,87 \text{ U mgP}^{-1}$  em  $15,86 \text{ mgP mL}^{-1}$  por fermentação descontínua o que abre caminhos para o desenvolvimento de processos e produtos derivados da biomassa de *Gracilaria birdiae*.

**Palavras-chave:** Bioprocesso. Atividade agarolítica. Bioprospecção.

## ABSTRACT

Seaweeds are organisms rich in biocomposites for vast industrial applications. Several researches are carried to promote the use of this biomass for the generation of new products and processes for the benefit of society. Agarases are enzymes that catalyze the degradation reaction of the agar, generating products primarily of cosmetic, pharmaceutical and food interest. In this work, the microbiota salinity resistant of the *Gracilaria birdiae* macroalgae was studied and allowed to isolate an agarolytic bacterium (encoded GB002), which showed high growth in saline culture medium with 2.5% NaCl, 0.5% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KCl 0.1%, 0.01% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.01% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.002% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% yeast extract at 32 °C, pH 7.0 and 0.1% agar as its sole source of carbon. Culture media with variations in carbon and organic nitrogen sources (commercial agar, peptone and biomass of *Gracilaria birdiae*) were tested and GB002 showed rapid growth and with a biomass accumulation in all medium. The maximum specific growth rate ( $\mu_{\max} = 0.376 \text{ h}^{-1}$ ) of GB002 was observed when *G. birdiae* was used as nutrients source. Combined with the growth, the study of agarase production was higher in the medium containing commercial agar as carbon source and peptone as a nitrogen source in 6 h culture ( $0.490 \pm 0.090 \text{ U mL}^{-1}$ ), however, the medium prepared from 1% of the fresh biomass of *G. birdiae* showed the highest microbial concentration of all studied media ( $1.82 \times 10^9 \text{ CFU mL}^{-1}$ ) and 95.9% of the maximum enzyme activity found in the previous medium. Growth in both culture media presented a low lag phase (<4 h) and the decline in cultures started around 24 h. A protein with approximate mass of 44 kDa was observed by 12.5% SDS-PAGE, and enzymatic activity was revealed by zymography. Based on the experiments, it was possible to produce a protein extract with  $3.87 \text{ U mgP}^{-1}$  agarolytic activity at  $15.86 \text{ mgP mL}^{-1}$  by discontinuous fermentation, which opens paths for the development of processes and products derived from the *Gracilaria birdiae* biomass.

**Keywords:** Bioprocess. Agarolytic activity. Bioprospecting.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação esquemática da hidrólise do polímero de agarose via química e enzimática mediada por $\alpha$ -agarase e $\beta$ -agarases.....	19
Figura 2	– Representação das unidades formadoras da agarose.....	20
Figura 3	– Estrutura química da agarpectina.....	20
Figura 4	– Mapeamento de especificidades do sub-sítio de ligação de várias enzimas agarolíticas pela combinação de caracterização bioquímica e dados da estrutura cristalina em 3D.....	24
Figura 5	– Exemplar de <i>Gracilaria birdiae</i> (PLASTINO; OLIVEIRA, 2002) coletada na praia de Flecheiras (Trairi - CE).....	31
Figura 6	- Crescimento microbiano associados a explantes de <i>Gracilaria birdiae</i> em meio ASP 12-NTA, 32 °C por 72 h e liquefação do meio de cultura.....	38
Figura 7	– Diversidade morfológica de colônias microbianas obtidas a partir da microbiota associada à macroalga <i>Gracilaria birdiae</i> .....	39
Figura 8	– Morfologia das colônias e coloração de Gram das bactérias isoladas de <i>G. birdiae</i> .....	39
Figura 9	– Revelação da degradação do ágar presente no meio de cultura de GB002 por meio da observação de halo em torno da colônia, após adição de Lugol 5%...	41
Figura 10	– Área das colônias de GB002 em 25 °C, 32 °C e 37 °C em meio SWL suplementado com peptona 0,5% e solidificado com ágar 0,8%.....	42
Figura 11	– Curvas de crescimento e velocidades instantâneas ( $V_X$ ) e específicas ( $\mu_X$ ) de crescimento de GB002 em diferentes meios de cultivo a 32 °C, 160 rpm por 30h.....	43
Figura 12	– Resultado da centrifugação para obtenção do extrato agarolítico produzido por GB002.....	48
Figura 13	– Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% e zimograma em gel de poliacrilamida com ágar 0,2 % das amostras FESS-I sete dias e 14 dias.....	49
Figura 14	– Cromatografia de troca iônica de FESS-I em matriz DEAE-celulose, pH 6,5.	50
Figura 15	– Produção enzimática de GB002 durante a fermentação em diferentes meios de cultivo.....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Principais glicosil-hidrolases que atuam na degradação de polissacarídeos produzidos por algas marinhas.....	18
Tabela 2	– Famílias e microrganismos produtores de agarases.....	22
Tabela 3	– Composição do meio de cultura definido ASP 12-NTA segundo Iwasaki (1961) e modificado por Yokoya (1996) .....	32
Tabela 4	– Composição dos meios de cultura utilizados na avaliação do crescimento de GB002.....	34
Tabela 5	– Parâmetros cinéticos do crescimento microbiano.....	35
Tabela 6	– Características culturais dos microrganismos isolados da microbiota associada a <i>G. birdiae</i> .....	38
Tabela 7	– Testes bioquímicos dos microrganismos isolados a partir da microbiota associada a macroalga <i>G. birdiae</i> .....	41

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Algas marinhas como matéria prima renovável .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2</b>	<b>Biocatalisadores microbianos marinhos.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3</b>	<b>Glicosil-hidrolases (GH).....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Agarases .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.1.1</b>	<b><i>Famílias e diversidade de enzimas agarolíticas.....</i></b>	<b>21</b>
<b>1.3.1.2</b>	<b><i>Características de catálise .....</i></b>	<b>23</b>
<b>1.3.2</b>	<b><i>Aplicação das enzimas agarolíticas.....</i></b>	<b>25</b>
<b>1.3.2.1</b>	<b><i>Produção de oligossacarídeos derivados do ágar.....</i></b>	<b>25</b>
1.3.2.1.1	Aplicação como Prébióticos.....	25
1.3.2.1.2	Efeito fisiológicos.....	26
1.3.2.1.3	Bioatividade como ingrediente cosmético e anticariogênico .....	27
<b>1.3.2.2</b>	<b><i>Recuperação de DNA em gel de eletroforese .....</i></b>	<b>28</b>
<b>1.3.2.3</b>	<b><i>Degradação da parede celular das algas.....</i></b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Coleta e armazenamento do material.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Isolamento de microrganismos agarolíticos associados a <i>Gracilaria birdiae</i>....</b>	<b>32</b>
<b>3.3</b>	<b>Morfologia e testes bioquímicos dos microrganismos agarolíticos isolados de <i>G. birdiae</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>3.4</b>	<b>Qualificação e quantificação da atividade agarolítica .....</b>	<b>33</b>
<b>3.5</b>	<b>Cinética de crescimento do microrganismo agarolítico em diferentes meios de cultura .....</b>	<b>34</b>
<b>3.6</b>	<b>Fermentação descontínua para produção do extrato agarolítico.....</b>	<b>35</b>
<b>3.6.1</b>	<b><i>Preparo do inóculo.....</i></b>	<b>35</b>
<b>3.6.2</b>	<b><i>Fermentação descontínua .....</i></b>	<b>35</b>
<b>3.7</b>	<b>Purificação da enzima agarolítica presente no extrato FESS-I.....</b>	<b>35</b>
<b>3.7.1</b>	<b>Concentração .....</b>	<b>35</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Cromatografia de troca iônica.....</b>	<b>36</b>
<b>3.7.3</b>	<b><i>Quantificação de proteínas totais .....</i></b>	<b>36</b>

3.8	Caracterização da enzima agarolítica .....	36
3.8.1	<i>Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida</i> .....	36
3.8.2	Zimograma .....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
4.1	Isolamento e seleção de microrganismos agarolíticos associados a <i>Gracilaria birdiae</i> .....	38
4.2	Curva e cinética do crescimento de GB002 em diferentes meios de cultivo.....	42
4.3	Produção do extrato com atividade agarolítica.....	47
4.4	Caracterização da enzima agarolítica .....	48
5	CONCLUSÃO.....	53
6	PERSPECTIVAS.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Algas marinhas como matéria prima renovável

No contexto dos desafios atuais na busca de novas matérias primas renováveis para o desenvolvimento de processos mais *eco-friendly*, as algas marinhas (incluindo macroalgas e microalgas) são uma fonte renovável atraente para a produção de biocombustíveis, químicos e outros produtos de alto valor econômico, com muitas vantagens sobre a biomassa de alimentos ou materiais celulósicos. As algas incluem uma ampla variedade de organismos fotossintéticos que vivem em muitos ambientes diversos e presentes em todos os ecossistemas existentes na Terra (adaptado de NIGAM; SINGH, 2011).

Em condições normais, as algas usam luz solar, com alta eficiência na conversão de fótons influenciando um alto aumento de biomassa, juntamente com a assimilação de nutrientes inorgânicos como o dióxido de carbono, mostrando uma alta fixação em comparação com a biomassa terrestre, apresentando um grande potencial de remediação do excesso de dióxido de carbono da atmosfera para assimilação na forma de carboidratos lipídios e outras biomoléculas com vantagens para aplicações na produção de energia renovável e biomateriais relacionados (GAO; MCKINLEY, 1994; JOHN et al., 2011; SUBHADRA; EDWARDS, 2010). Além disso, as algas não possuem hemicelulose e lignina, que são essenciais para o suporte estrutural na maioria das plantas terrestres e, portanto, sua biomassa pode ser despolimerizadas com relativa facilidade em comparação com a biomassa lignocelulósica (JOHN et al., 2011; WARGACKI et al., 2012). Finalmente, as algas marinhas não requerem terra arável e podem ser cultivadas em uma variedade de ambientes marinhos, incluindo água doce, água salgada ou águas residuais municipais. A capacidade de as algas crescerem na água salgada ou a água residual é fundamental para a produção sustentável de biocombustíveis, a fim de evitar a competição com culturas alimentares que requerem água doce e terras cultiváveis (JOHN et al., 2011).

Muitas espécies de algas têm sido utilizadas na indústria principalmente para a extração de ficocolóides (alginato, carragenana e ágar) e como fonte de substâncias farmacêuticas. Também são utilizados como fitoterápicos, fertilizantes, fungicidas, herbicidas e também para uso direto na nutrição humana. Algas marinhas são conhecidas como alimentos altamente nutritivos em relação a vitaminas, proteínas, minerais, teores de fibras e ácidos graxos essenciais. As algas vermelhas e marrons são utilizadas principalmente como fontes alimentares humanas e são tradicionalmente usados na dieta chinesa, japonesa e coreana desde tempos antigos (AGUILERA-MORALES et al., 2005; CARDOZO et al., 2007; DAWCZYNSKI;

SCHUBERT; JAHREIS, 2007; ORTIZ et al., 2006).

Sendo assim, macroalgas marinhas apresentam um potencial como substrato nas fermentações industriais, por fornecerem nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos principalmente para a produção de bioetanol (JOHN et al., 2011) e também a biomassa das macroalgas marinhas já são comparáveis às lignocelulósicas no atual estágio da tecnologia de produção de ácido láctico (HWANG et al., 2011).

## **1.2 Biocatalisadores microbianos marinhos**

Recursos biológicos marinhos, incluindo peixes e algas, têm sido usados desde o início da história da humanidade. O uso desses recursos continua em andamento e se concentra em microrganismos, esponjas, fungos, algas, leveduras e bactérias com um enorme potencial para aplicações biotecnológicas, uso farmacêutico, bem como o desenvolvimento de outros produtos valiosos, como enzimas, nutracêuticos e cosméticos (IMHOFF; LABES; WIESE, 2011).

Em 2010 importantes pesquisas sobre o tema da biocatálise já haviam sido divulgadas na literatura científica. De um modo geral, alguns tópicos específicos em biocatálise adquiriram grande renome ao longo dos anos e um dos tópicos básicos, que permanece, é a busca de novos biocatalisadores, uma atividade de pesquisa e bioprospecção que não foi completamente substituída, mas incorporou em si o novo sistema tecnológico de conhecimento de diferentes campos, adquirindo um novo patamar dentro das pesquisas (TRINCONE, 2010).

O habitat marinho tem sido, e continua a ser, uma fonte de produtos naturais únicos utilizados como fármacos ou que possuam características úteis para aplicações biotecnológicas. Enzimas estão entre esses produtos e a fonte marinha pode ser considerada quase inexplorada em relação à presença de atividades enzimáticas que podem ser encontradas. Essas enzimas podem oferecer propriedades relacionadas ao habitat que são muito apreciadas sob uma perspectiva biotecnológica geral. Porém, a novidade trazida pelas enzimas marinhas é mais difusa, onde novas características podem ser descobertas no nível molecular da catálise, especialmente no que diz respeito ao aspecto estereoquímico dos produtos. A análise dos bioprocessos marinhos a partir de pontos de vista químicos e estereoespecificidade da catálise poderia revelar melhor o potencial das fontes marinhas na biocatálise. Os microrganismos marinhos, no geral, podem ser considerados a principal fonte de enzimas, incluindo microrganismos simbióticos, de profundidade, microalgas e extremófilos (PANE et al., 1998; TRINCONE, 2010).

Informações de bancos de dados sobre atividades enzimáticas e estereoquímica têm sido de grande ajuda no desenvolvimento de protocolos de biocatálise para enzimas novas e já conhecidas. A singularidade dos biocatalizadores marinhos é caracterizada por seus bioprocessos incorporando propriedades como tolerância a salinidade, hipertermoestabilidade, barofilicidade, adaptabilidade ao frio, que são características relacionadas ao habitat natural das proteínas isoladas. Além disso, uma enzima marinha pode conter mais, e novas, propriedades químicas e estereoquímicas. Essa “biodiversidade química” aumenta o interesse nesse campo. De fato, a especificidade do substrato e a afinidade desempenham papéis de liderança em que ambas são propriedades evoluídas ligadas às suas funções metabólicas e ecológicas no ambiente (TRINCONE, 2010; WACKETT, 2004).

### 1.3 Glicosil-hidrolases (GH)

Os carboidratos apresentam ampla variação estereoquímica e podem ser montados em tantas formas diferentes que existem mais de  $10^{12}$  isômeros possíveis para um hexassacarídeo redutor. Os organismos vivos aproveitam essa diversidade usando oligossacarídeos e polissacarídeos para uma infinidade de funções biológicas, do armazenamento e estrutura à funções de sinalização altamente específicas. A hidrólise seletiva de ligações glicosídicas é, portanto, crucial para a captação de energia, expansão e degradação da parede celular e renovação de moléculas de sinalização. Como consequência da diversidade de sacarídeos, há grande variedade entre as enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

Segundo a plataforma virtual que contém informações sobre enzimas que atuam sobre carboidratos (*Carbohydrate-Active Enzymes database* – CAZy), as glicosil-hidrolases (EC 3.2.1.x) são um grupo disseminado de enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre uma porção de carboidrato e não-carboidrato. A nomenclatura enzimática das GHs da *International Union of Biochemistry And Molecular Biology* (IUBMB) baseia-se na especificidade do seu substrato e, ocasionalmente, no seu mecanismo molecular; tal classificação não reflete (e não se destinava) às características estruturais dessas enzimas (LOMBARD et al., 2014; CAZy; <http://www.cazy.org/>).

Na maioria dos casos, a hidrólise da ligação glicosídica é catalisada por dois resíduos de aminoácidos da enzima: um ácido geral (doador de prótons) e um nucleófilo/base (DAVIES; HENRISSAT, 1995). Dependendo da posição espacial destes resíduos catalíticos, a hidrólise ocorre através da retenção global ou inversão global da configuração anomérica. Em

alguns casos, o nucleófilo catalítico não é suportado pela enzima e é substituído pelo grupo acetamido em C-2 do substrato (TERWISSCHA VAN SCHELTINGA et al., 1995). Um mecanismo completamente não relacionado foi demonstrado recentemente para duas famílias de glicosidases utilizando  $\text{NAD}^+$  como cofator (RAJAN et al., 2004).

O ecossistema marinho pode ser considerado uma fonte bastante inexplorada de material biológico e também uma fonte surpreendente de enzimas que transportam novas e interessantes atividades catalíticas para serem aplicadas em biocatálise. O uso de GHs de ambientes marinhos remonta ao final da década de 1960 e foi focado no desenvolvimento de métodos hidrolíticos sensíveis e confiáveis para a análise de cadeias de açúcar (GIORDANO et al., 2006). Atualmente foram descritas 153 famílias de GH, onde abrigam 502.414 cadastros de enzimas hidrolíticas e mais 8.866 GH ainda não classificadas (CAZy; <http://www.cazy.org/>).

Entre as principais glicosil-hidrolases que atuam na degradação de polissacarídeos presentes nas macroalgas marinhas, destacam-se as enzimas apresentadas na TABELA 1.

Tabela 1 – Principais glicosil-hidrolases que atuam na degradação de polissacarídeos produzidos por algas marinhas

	Substrato	Enzimas
<b>Xilanases</b>	Xilana, polímero linear composto por unidades $\beta$ -D-xilopiranosil ligadas por ligações glicosídicas (1 $\rightarrow$ 4)	endo-1,4- $\beta$ -xylanase and $\beta$ -xylosidase
<b>Quitinases</b>	Quitina, polímero insolúvel composto por N-acetilglicosamina ligados por ligações $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4	Quitinases e N-acetilglicosaminidases
<b>Agarases</b>	Agar, polímero linear formado pela alternância de $\beta$ -D-galactose unidos por ligações $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 a resíduos de $\alpha$ -L-3,6-anidro-L-galactose com ligações $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3 podendo ter vários substitutos.	$\alpha$ - e $\beta$ -agarases
<b>Carragenase</b>	Carragenana, polímero sulfatado apresentando ligações $\beta$ -D-galactose com resíduos de galactose com éteres de sulfato como substituintes.	$\kappa$ - $\iota$ - $\lambda$ -carragenases
<b>Laminariase</b>	Laminarina é um polímero solúvel que consiste de 20-30 $\beta$ -D-glucose unidas por ligações $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 com 5% de ligações $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6.	$\beta$ -1,3-Glucanases
<b>Fucoidanases</b>	Fucoidanas são famílias de homo- e hetero-polissacarídeos sulfatados.	Fucoidana-hidrolase, sulfatase, glicosil-hidrolases
<b>Mananases</b>	Manana é constituído por manose com ligações $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 com outros carboidratos ou por substituição ácida.	Endo $\beta$ -1,4-mannanases $\beta$ -mannanases hidrolase

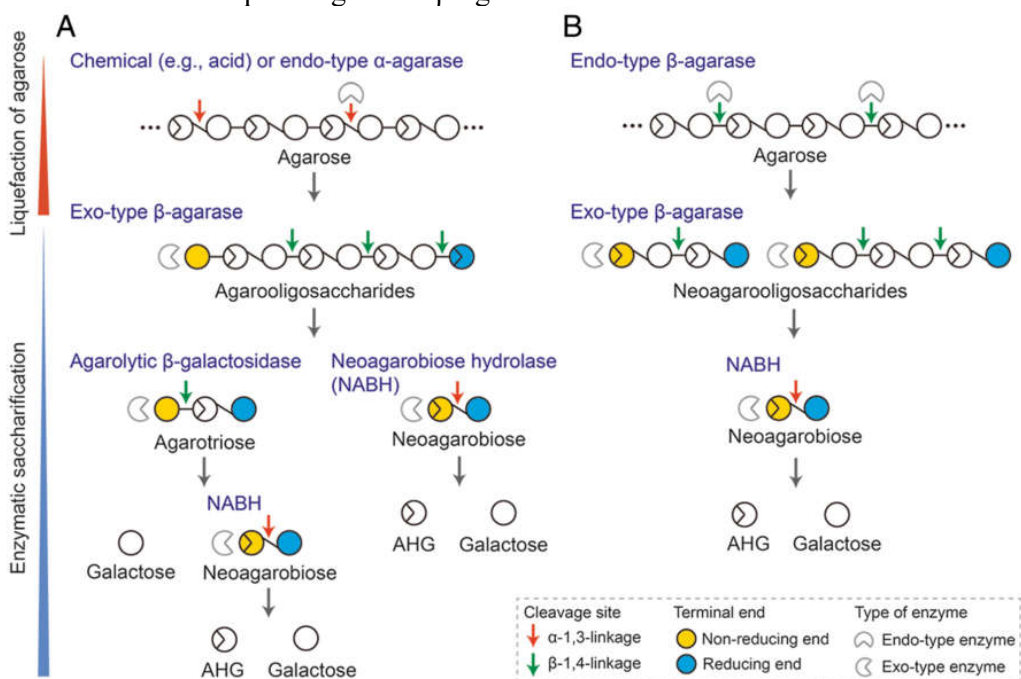
Fonte: adaptado de GIORDANO et al., 2006

### 1.3.1 Agarases

As agarases são importantes enzimas classificadas como  $\alpha$ -agarase (E.C 3.2.1.158) e  $\beta$ -agarases (3.2.1.81) de acordo com a ligação glicosídica quebrada, produzindo dois tipos

diferentes de moléculas. A hidrólise da agarose nas ligações  $\alpha$ -1,3, produz agarooligossacarídeos que possuem resíduos 3,6-anidro-L-galactose nas suas extremidades redutoras. O outro tipo hidrolisa a agarose nas ligações  $\beta$ -1,4 e produz neoagarooligossacarídeos com resíduos de D-galactose nas extremidades redutoras, como mostrado na FIGURA 1 (TRINONE, 2018).

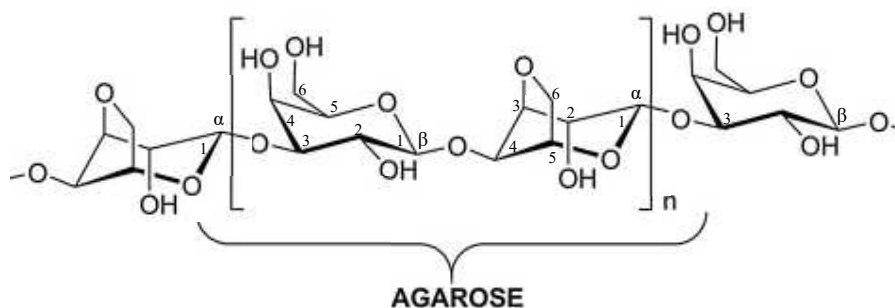
Figura 1 – Representação esquemática da hidrólise do polímero de agarose via química e enzimática mediada por  $\alpha$ -agarase e  $\beta$ -agarases



**A:** Liquefação da agarose por via química (ácido, por exemplo) ou por uma endo- $\alpha$ -agarase e enzimática sacarificação utilizando exo- $\beta$ -agarase,  $\beta$ -galactosidase agarolítica, e neoagarobiose hidrolase (NABH). **B:** Liquefação e sacarificação enzimática utilizando endo- $\beta$ -agarase, exo- $\beta$ -agarase e NABH. Fonte YUN; YU; KIM, 2017

O ágar, foi o primeiro ficocolóide usado como aditivo alimentar em nossa civilização, tendo sido empregado no Extremo Oriente há mais de 300 anos e é formado por uma mistura de agarose e agaropectina (ARAKI, 1956). A agarose, o constituinte principal do ágar, consiste da repetição alternada de dissacarídeos unidos por ligações  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)  $\beta$ -D-galactopiranosose ligado a 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactopiranosose por ligações  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) (FIGURA 2) (ARAKI, 1956).

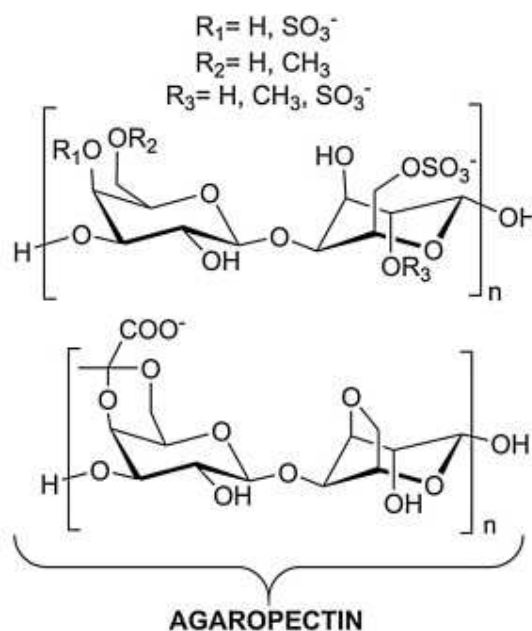
Figura 2 – Representação das unidades formadoras da agarose



Estrutura química dos dissacarídeos que formam a estrutura da agarose. Galactose (G) e 3,6 anidro-galactose (AHG) unidos por ligações  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 (setas vermelhas)  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 3 (setas azuis) Fonte: BERTASA et al., 2017, adaptado

Agaroses são as frações de ágar que essencialmente gelificam. Eles têm alto peso molecular acima de 100.000 Daltons e frequentemente ultrapassam 150.000 Daltons, como um baixo teor de sulfato, geralmente abaixo de 0,15% (ARMISEN; GALATAS, 1987). Por outro lado, a agarpectina são frações restantes do ágar que não gelificam. Elas têm um peso molecular menor que a agarose, geralmente abaixo de 20.000 Daltons, tipicamente 14.000 Daltons (FIGURA 3). Os sulfatos estão em um conteúdo mais alto que na agarose, registrando de 5% a 8% (WANG et al., 2001).

Figura 3 – estrutura química da agarpectina



Possível unidades de repetição de dissacarídeos que compõem a agarpectina com diferentes substituintes (hidroxi, metoxi, sulfoxi, piruvato acetal). Fonte: BERTASA et al., 2017

### 1.3.1.1 Famílias e diversidade de enzimas agarolíticas

A primeira enzima relatada para a degradação do ágar foi descrita no início dos anos setenta como uma  $\beta$ -agarase (DAY; YAPHE, 1975; GROLEAU; YAPHE, 1977). Enzimas que executam esta reação foram encontradas em diferentes famílias (com base nas semelhanças de sequência de aminoácidos, pois existe uma relação direta entre sequência e semelhanças de dobramento) que são GH16, GH50, GH86 e GH118 (MICHEL et al., 2006), em 2017 uma  $\beta$ -agarase foi descrita pertencente a família GH39 (JUNG et al., 2017).  $\alpha$ -agarases são mais raras e apenas duas da família GH96 foram caracterizadas até o momento (FLAMENT et al., 2007; SEOK et al., 2012) e, mais recentemente, várias exo- $\alpha$ -galactosidases atuantes foram descritas. Essas enzimas pertencem a uma nova família GH de origem marinha (família GH117) que inclui um grupo enzimático, envolvido nas etapas terminais do catabolismo do ágar (HA et al., 2011; HEHEMANN et al., 2012; REBUFFET et al., 2011). A TABELA 2 mostra as famílias, organismos e genes (ou proteínas) até agora relatados no banco de dados CAZy.

Tabela 2 – Famílias e microrganismos produtores de agarases

Família	Organismo	Gene/proteína
$\alpha$ -agarases		
GH96	<i>Alteromonas agarilytica</i> GJ1B	AgaA
	<i>Thalassomonas</i> sp. LD5	AgaD
	<i>Thalassotalea agarivorans</i> JAMB A33	AgaA33
$\beta$ -agarase		
GH16	<i>Agarivorans albus</i> YKW-34	AgaB34
	<i>Agarivorans</i> sp. JA-1 / HZ105 / LQ48	AgaJA3, Hz4, AgaA
	<i>Alteromonas</i> sp. GNUM-1	AgaG1, Orf1 (extracelular)
	<i>Bacteroides plebeius</i> DSM 17135	BACPLE_01670
	<i>Catenovulum agarivorans</i> YM01	YM01-1, YM01-3
	<i>Flammeovirga</i> sp. OC4 / SJP92	Aga4436, AgaB
	<i>Flammeovirga yaeyamensis</i> MY04 / YT	AgaG4, AgaYT
	<i>Janthinobacterium</i> sp. SY12	AgaY (extracelular)
	<i>Microbulbifer agarilyticus</i> JAMB-A3	AgaA3
	<i>Microbulbifer elongatus</i> JAMB-A7	AgaA7
	<i>Microbulbifer thermotolerans</i> JAMB-A94	AgaA, MtAgaA
	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> ATCC 19262	$\beta$ -agarase I
	<i>Pseudoalteromonas gracilis</i> B9	AagA
	<i>Pseudoalteromonas hodoensis</i> H7	AgaH71

	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. AG4 / AG52 / CY24 / JT-6	AgaA, AgaA (extracellular), AgaA6
	<i>Pseudomonas</i> sp. ND137	$\beta$ -agarase
	<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	endo- $\beta$ -agarase I / B (AgaB, Sde_1175)
	<i>Saccharophagus</i> sp. AG21	Agy1, AgaY1
	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	DagA, SCO3471
	Bactérias não cultiváveis	AguF, AguB, AguD, AguK, AguH
	<i>Vibrio</i> sp. PO-303 / V134	AgaA, AgaD, AgaV
	<i>Zobellia galactanivorans</i> DsijT	AgaA;zobellia_4203, AgaB;zobellia_3573, AgaD;zobellia_4243
GH39	<i>Gayadomonas joobiniege</i> G7	AgaJ9
GH50	<i>Agarivorans albus</i> YKW-34	AgaA34 (fragmento de peptídeo)
	<i>Agarivorans gilvus</i> WH0801	AgWH50C, AgWH50A (exo)
	<i>Agarivorans</i> sp. AG17 / HZ105 / JA-1 / JAMB-A11 / QM38	AgrA-agarase Hz2, Hz1;HZ-a;HZ-b;HZ-c, AgaA11
	<i>Alteromonas</i> sp. E-1	$\beta$ -agarase
	<i>Paenibacillus agarexedens</i> BCRC 16000	AgaB-4
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. NJ21	Aga21
	<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	exo- $\beta$ -agarase A (AgaA;Sde_1176), exo- $\beta$ -agarase D (AgaD;Sde_2644)
	<i>Saccharophagus</i> sp. AG21	AgaY2
	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3	DagB;Sco3487
	<i>Thalassotalea agarivorans</i> BCRC17492 / TMA1 / JCM 13379	AgaB1
GH86	<i>Vibrio</i> sp. CN41 / JT0107 / JT0107 / PO-303	Aga41A, AgaA, AgaB (exo), AgaB, AgaE
	<i>Cellvibrio</i> sp. OA-2007	AgaA, Aga86
	<i>Flammeovirga pacifica</i> WPAGA1	Aga4383
	<i>Microbulbifer thermotolerans</i> JAMB-A94	AgaO
	<i>Paenibacillus</i> sp. SSG-1	Aga1 (exo)
	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> T6c	AgrA;Patl_2341
GH118	<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	AgaE;Sde_2655, AgaC;Sde_2650 (endo)
	<i>Catenovulum</i> sp. X3	AgaXa
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CY24	AgaB
	<i>Vibrio</i> sp. PO-303	AgaC

Fonte: Carbohydrates Active-Enzymes CaZY (<http://www.cazy.org>).

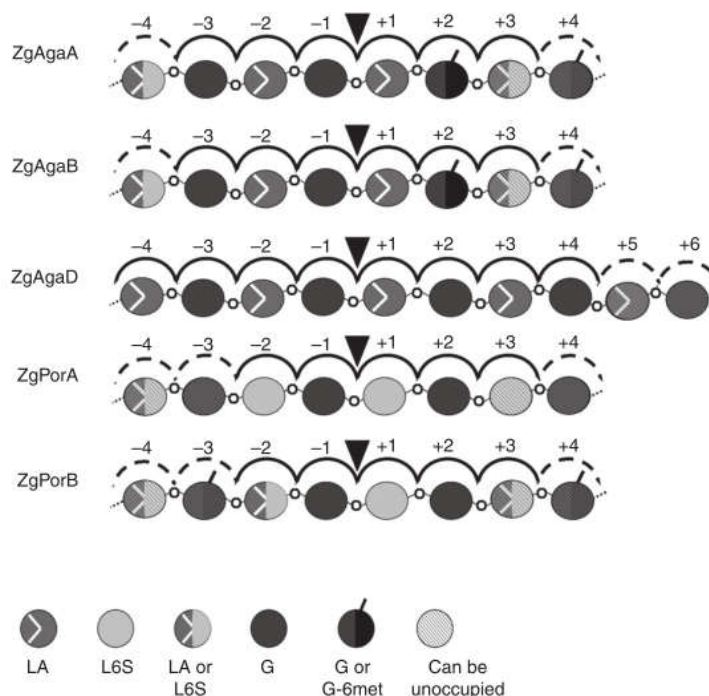
A família a qual as  $\beta$ -agarases pertencem com mais frequência é GH16; mais de 100 genes  $\beta$ -agarases anotados são encontrados pela pesquisa BLAST e 25 deles foram realmente caracterizados como sendo  $\beta$ -agarases (<http://www.cazy.org>). Além disso, o GH16 é uma família de enzimas poliespecíficas com aproximadamente 2400 membros, contendo

também carragenases, laminariases e outras enzimas específicas para polissacarídeos terrestres (MICHEL et al., 2006). As  $\beta$ -agarases pertencentes às outras famílias de GH são menos frequentes, com cerca de 100 membros na família GH50, 40 em GH86 e 6 sequências pertencentes a GH118 (<http://www.cazy.org>). Em geral, todas estas famílias contêm quase exclusivamente  $\beta$ -agarases identificadas de vários procariotos (MICHEL; CZJZEK, 2013).

#### ***1.3.1.2 Características de catálise***

A descrição e o nível de caracterização das várias  $\beta$ -agarases isoladas podem ser altamente variáveis, e a detecção de atividade agarolítica é restrita a um ensaio qualitativo (digestão de um gel de agarose, produção de neoagaro-oligossacarídeos) e até mesmo outros foram caracterizados apenas no nível da sequência primária. Em contraste, muitas  $\beta$ -agarases pertencentes à família GH16, foram submetidos a uma profunda caracterização bioquímica, incluindo a determinação da estrutura cristalina 3D isolada ou em complexo com moléculas de substrato, permitindo assim o mapeamento dos requisitos de substrato para essas enzimas da família GH16, descrevendo sua especificidade precisa, mostrado na FIGURA 4 (MICHEL; CZJZEK, 2013).

Figura 4 - Mapeamento de especificidades do sub-sítio de ligação de várias enzimas agarolíticas pela combinação de caracterização bioquímica e dados da estrutura cristalina em 3D



As linhas em negrito que delimitam os sub-sítios de ligação correspondem à presença de pelo menos um aminoácido que apresenta uma distância próxima (inferior a 4 Å) à unidade de açúcar ligado. As linhas descontinuas que delimitam alguns sítios externos de sub-ligação projetam aquelas que parecem desempenhar um papel ao analisar o padrão de degradação bioquímica, mas para as quais nenhuma delimitação estrutural evidente pode ser estabelecida. As unidades de açúcar em cinza indicam as posições que podem permanecer desocupadas e a enzima ainda exibe atividade hidrolítica. Todas as enzimas pertencem à família GH16 e foram clonadas de *Zobellia galactanivorans*. LA: 3,6-L-anidrogallactose; L6S: L-gallactose-6-sulfato; G: D-gallactose e G-6met: 6-metil-gallactose.

Fonte: MICHEL; CZJZEK, 2013

Em 2004, todas as  $\beta$ -agarases da família GH16 exibem um modo de atividade endo, clivando aleatoriamente as cadeias de polissacarídeos numa mistura de produtos finais, principalmente constituídos por neoagarotetroses e neoagarohexoses com quantidades menores de neoagarobiose. Em ágar natural ou agaropectina, a mistura do produto pode ser muito mais complexa devido ao caráter híbrido das cadeias de polissacarídeos e à tolerância de certos locais de sub-ligação para reconhecimento de carboidratos, como metilação ou sulfatações, refletidas pelas diversas tolerâncias nos diferentes sub-sítios de ligação (CORREC et al., 2011; HEHEMANN et al., 2012; JAM et al., 2005). Apesar dessa observação geral realizada principalmente em substrato solúvel, vale ressaltar que ZgAgaA apresenta atividade significativamente maior em géis de agarose do que outras  $\beta$ -agarases (JAM et al., 2005). Isso tem sido atribuído à presença de um sítio de ligação de agarose na superfície da enzima, além

do local ativo do sulco da enzima e uma ação mais processiva é assumida na fase gel (ALLOUCH et al., 2004).

Apesar desses inúmeros estudos, muitas questões relativas à caracterização bioquímica dessas famílias de enzimas ainda estão abertas já que não há informações sobre os sítios de catálise das enzimas pertencentes as famílias GH50, GH86 e GH118. Em um estudo muito recente, a chamada “plataforma de degradação de agarose”, constituindo uma endo- $\beta$ -agarase de GH16, uma enzima exolítica produtora de neoagarobiose (GH50) juntamente com AghA, a  $\alpha$ -agarobiohidrolase exolítica, foi usado como um "coquetel" enzimático para converter completamente a agarose em seus monossacarídeos para posterior fermentação (KIM et al., 2012). Embora os resultados deste estudo sejam promissores, a questão sobre a conversão da agarose em unidades de 3,6-anidro-L-galactose, responsável por 50% do polissacarídeo, permanece sem solução, já que a maioria das enzimas encontradas não sacarificam completamente a agarose (MICHEL; CZJZEK, 2013).

### ***1.3.2 Aplicação das enzimas agarolíticas***

#### ***1.3.2.1 Produção de oligossacarídeos derivados do ágar***

As agarases têm sido usadas para produção de oligossacarídeos derivados de ágar. Em comparação com o método tradicional de degradação ácida, o método de degradação enzimática tem muitas vantagens notáveis, como condição de reação brandas, excelente eficiência, produtos controláveis, instalações simples, baixo custo de energia, pouca poluição ambiental.

Os oligossacarídeos derivados do ágar incluem agaro-oligossacarídeos (AOS) e neoagaro-oligossacarídeos (NAOS) e possuem diversas aplicações, dentre elas:

##### ***1.3.2.1.1 Aplicação como Prébióticos***

O termo prébióticos tem sido tipicamente usado em referência a compostos não digeríveis que supostamente atingem o intestino grosso e são metabolizados por microrganismos do intestino, assim modulando a composição e/ou atividade da microbiota intestinal. Além disso, os prébióticos podem ter atividades biológicas não relacionadas aos seus efeitos sobre a microbiota intestinal, como a exclusão de patógenos ou a imunomodulação direta (BINDELS et al., 2015).

Um modo simples de preparar diversos neoagaro-oligossacarídeos foi estabelecido utilizando AgaA e AgaB, recombinante, clonados a partir de *Pseudoaltermonas* sp. CY24, no qual a agarose foi hidrolisada em neoagarotetroses (NA4), neoagarohexoses (NA6), neoagaroctoses (NA8), neoagarodecose (NA10) e neoagarododecose (NA12) (LI et al., 2007). Esses NAOSs mostraram efeitos prébióticos. Quando suplementado com caldo de MRS, os NAOS estimularam significativamente o crescimento celular de bifidobactérias e lactobacilos tais como *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703, *B. bifidum* ATCC 29521, *B. longum* SMU 27001, *Lactobacillus acidophilus* AMU 28001 e *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* 1.1480. Especificamente, NAOS com tamanho de cadeia principalmente de 8, 10 e 12 sacarídeos revelaram efeitos prébióticos mais altos do que aqueles menores, principalmente de 4 e 6 sacarídeos (HU et al., 2006)

Além disso, os AOS com números ímpares e pares foram relatados por ter efeitos prébióticos. Quando AOS de número ímpar preparados pela pré-hidrólise ácida de agarose, foram suplementados como fontes de carbono para quatro cepas diferentes de bifidobactérias, entre elas *B. adolescentis* 1.2190 e *B. infantis* 1.2202, a agarotriose foi degradada após 192 h de cultura a 37 °C. Além disso, quando AOS com numeração par eram fornecidos a camundongos alimentados com dieta rica em gordura, que apresentavam disbiose intestinal e tumorigênese do cólon, a microbiota intestinal dos camundongos mudava com uma abundância aumentada de bactérias na ordem Lactobacillales e uma diminuição da abundância de *Clostridium*. (HIGASHIMURA et al., 2016; LI et al., 2014)

No entanto, estes estudos anteriores têm uma grande desvantagem na medida em que não examinaram as fermentabilidades de NAOS e AOS por microrganismos intestinais tais como bifidobactérias. Além disso, os componentes-chave desses oligossacarídeos que atuam como prébióticos e os principais fatores genéticos envolvidos no metabolismo de prébióticos na microbiota intestinal precisam ser identificados futuramente (YUN; YU; KIM, 2017).

Além disso há relatos de efeitos desses oligossacarídeos na inibição do crescimento de bactérias, retardo da degradação do amido e usado como aditivos de baixa caloria para melhorar as qualidades dos alimentos (GIORDANO et al., 2006).

#### 1.3.2.1.2 Efeito fisiológicos

Os AOS foram relatados como possuidores de várias atividades fisiológicas, tais como atividades anti-inflamatórias, carcinostáticas, antioxidantes, hepatoprotetoras e inibidoras da  $\alpha$ -glicosidase (CHEN et al., 2006; ENOKI et al., 2010; HIGASHIMURA et al., 2013).

Em um modelo de camundongo, os AOS suprimiram a indução do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e induziram a heme oxigenase-1, que foi considerada como uma resposta celular adaptativa contra a resposta inflamatória e a lesão oxidativa, podendo ser úteis como estratégia terapêutica para doença inflamatória intestinal (ENOKI et al., 2010; HIGASHIMURA et al., 2013).

Presumiu-se que as atividades fisiológicas dos AOS resultaram principalmente da presença do açúcar 3,6-anidro-galactose onde foi submetido à sua atividade anti-inflamatória *in vitro*, utilizando macrófagos da linhagem RAW 264.7, mostrando, com o isômero L, a maior atividade anti-inflamatória pela supressão da produção de nitrito quando comparado com outros açúcares presentes nas algas (YUN et al., 2013).

A mistura de oligossacarídeos apresenta atividade antioxidante na remoção de radicais livres de hidroxil, remoção do radical do ânion superóxido e inibição da peroxidação lipídica. Os oligossacarídeos com o grupo sulfato ou com massas moleculares mais altas apresentam atividades antioxidantes mais fortes do que aqueles sem o grupo sulfato ou com massas moleculares menores (WANG et al., 2004). Em estudo posterior, a mistura de produtos contendo NA4 e NA6, que foi digerida do polissacarídeo de algas por agarase da cepa MA103, mostrou propriedades antioxidantes altas por cinco métodos *in vitro* (WU; PAN, 2004; WU; WEN; PAN, 2005).

#### 1.3.2.1.3 Bioatividade como ingrediente cosmético e anticariogênico

3,6-anidro-L-galactose e neoagarobiose tem um potencial uso como agentes cosméticos para clareamento de pele em melanomas, pois quando os mesmos foram aplicados a células de melanoma murino (B16-F10), suprimiram significativamente a produção de melanina com atividade de clareamento maior do que a da arbutina, um dos agentes mais utilizados para clareamento (KOBAYASHI et al., 1997; YUN et al., 2013). Neoagarotetrose produzida por endo- $\beta$ -agarase de *Agarivorans* sp. JA-1 obteve uma atividade no clareamento de pele *in vitro* semelhante à do ácido kójico e da arbutina (JANG et al., 2009). Esses açúcares possuem atividade hidratante observada quando aplicados aos queratinócitos humanos. 3,6-anidro-L-galactose induziu a expressão de hialuronano sintetase 2, que é uma proteína chave para a síntese de ácido hialurônico hidratante (KIM et al., 2013; KOBAYASHI et al., 1997).

Quanto a atividade anticariogênica, 3,6-anidro-L-galactose foi efetivo no controle do crescimento e produção de ácido láctico pela bactéria *Streptococcus mutans*, que é o microrganismo primário causador da cárie dentária, com uma quantidade 3 vezes menor que a

utilizada atualmente com xilitol, sendo assim fortemente indicado como um novo açúcar anticariogênico substituto para prevenir a cárie dentária como uma alternativa ao xilitol (YUN et al., 2017).

Para o uso industrial desses açúcares, devem ser estabelecidos processos econômicos viáveis uma vez que a produção é baseada na sacarificação do polímero de agarose, então processos com altos rendimentos, bem como melhoramento nas estratégias de recuperação dos produtos são necessários.

#### *1.3.2.2 Recuperação de DNA em gel de eletroforese*

As agarases têm sido amplamente utilizadas para recuperar bandas de DNA no gel de agarose. São ferramentas indispensáveis utilizadas no campo da pesquisa biológica (FU; KIM, 2010).

A Takara Company produz o kit de purificação de DNA em gel de agarose usando uma  $\beta$ -agarase com estabilidade térmica de até 60 °C (TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit product protocol). A agarase produzida por *Vibrio* sp. JT0107 recuperou 60% do DNA aplicado do gel aquecendo a 65 °C durante 5 min (SUGANO et al., 1993). Gold relatou o uso de uma nova preparação de enzima digestora de gel, GELase™, que fornece um método fácil, rápido e conveniente para recuperar o DNA amplificado por PCR a partir de géis de agarose de baixo ponto de fusão (GOLD, 1992).

#### *1.3.2.3 Degradação da parede celular das algas*

Agarases têm potencial de aplicação na degradação da parede celular de algas vermelhas agarófitas para extração de proteínas e outras substâncias lábeis com atividades biológicas como ácidos graxos insaturados, vitaminas e carotenoides.

Yaphe usou a agarase de *Pseudomonas atlantica* na identificação de ágar em algas marinhas (Rhodophyceae) (MORRICE et al., 1983; YAPHE, 1957).

As agarases também foram usadas para preparar protoplastos de algas marinhas que são materiais experimentais úteis para estudos fisiológicos e citológicos e excelentes ferramentas para o melhoramento de plantas por fusão celular e manipulação genética (CARLSON, 1973). Araki conseguiu isolar os protoplastos de *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta) usando agarase de *Vibrio* sp. PO303 juntamente com  $\beta$ -1,4-mananase e  $\beta$ -1,3-xilanase (ARAKI; LU.; MORISHITA, 1998). Os genes rAgaA, rAgaC e rAgaD clonados de

*Vibrio* sp. PO303 foram relatados por hidrolisar não só agarose e agar, mas também porfirana (DONG et al., 2006).

Em um estudo sobre a otimização da produção de protoplastos de *Gracilaria dura* e *Gracilaria verrucosa*, obteve uma quantidade ótima de utilização de enzimas 100 U agarase juntamente 4% celulase Onozuka R-10, 2% macerozima R-10, 0,5% pectoliase (GUPTA et al., 2011).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Bioprospectar microrganismos agarolíticos e estabelecer um processo produtivo da enzima por fermentação descontínua.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Isolar um ou mais microrganismo que produza enzimas agarolítica da macroalga marinha *Gracilaria birdiae*;
- Caracterizar os microrganismos isolados quanto a morfologia e metabolismo;
- Obter os parâmetros cinéticos de crescimento bacteriano em meios definidos e semidefinidos;
- Acompanhar a produção enzimática durante o crescimento bacteriano;

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta e armazenamento do material

A macroalga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* E.M. Plastino & E.C.Oliveira (FIGURA 5) foi coletada em cultivo no mar localizado aproximadamente 200 metros da costa, na praia de Flecheiras (03°13'06" S – 39°16'47" W), município de Trairi, a 130 km de Fortaleza, no litoral Oeste do Estado do Ceará, Brasil, onde são mantidas pela Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG) em parceria com o Laboratório de Biotecnologia de Algas e Processos (BioAP) e o Laboratório de Lectinas e Carboidratos (CARBOLEC), ambos localizados na Universidade Federal do Ceará (UFC) - Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM). A espécie está depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará sob o código EAC0040781.

Figura 6 – Exemplar de *Gracilaria birdiae* (PLASTINO; OLIVEIRA, 2002) coletada na praia de Flecheiras (Trairi - CE)

Classificação	
Domínio	<u>Eukaryota</u>
Reino	<u>Plantae</u>
Sub-reino	<u>Biliphyta</u>
Filo	<u>Rhodophyta</u>
Sub-filo	<u>Eurhodophytina</u>
Classe	<u>Florideophyceae</u>
Subclasse	<u>Rhodymeniophycidae</u>
Ordem	<u>Gracilariales</u>
Família	<u>Gracilariaceae</u>
Gênero	<u>Gracilaria</u>
Espécie	<i>Gracilaria birdiae</i>



Foto: Ana Christina Verissimo Oliveira

Classificação Taxonômica da macroalga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* E.M. Plastino & E.C.Oliveira (AlgaeBase). Fonte: Elaborado pelo autor

A macroalga foi transportada para a sala de cultivo de algas (anexa ao laboratório de Algas e Processos), lavada para a remoção de areia e epífitas e mantida em recipientes com água do mar filtrada (salinidade ajustada para  $36 \pm 1$  UPS) por 7 dias a temperatura de  $26 \pm 2$  °C, fotoperíodo 12-12 claro-escuro. Uma parte da alga coletada, após a lavagem, foi triturada

em processador de alimentos (Philips Walita RI7762). A biomassa triturada (*Gb*) foi mantida congelada em freezer a - 20 °C por dois dias.

### 3.2 Isolamento de microrganismos agarolíticos associados a *Gracilaria birdiae*

Explantos de aproximadamente 1 cm foram obtidos de talos de *G. birdiae* e cultivados em placa de Petri (5 explantes por placa) com 20 mL de meio ASP 12-NTA (TABELA 3) solidificado com ágar 0,8 % e mantidos em câmara de germinação a  $26 \pm 2$  °C com fotoperíodo 12:12 claro-escuro por 72 h.

Após o período, colônias microbianas crescidas e imersas em halo liquefeito em torno dos explantes foram transferidas para placas contendo o meio de cultura SWL – composto de NaCl 2,5%, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5%, KCl 0,1%, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,01%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01%, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,002%, extrato de levedura 0,1% (adaptado de FU; LIN; KIM, 2009) –, peptona 0,5% e ágar 0,8% utilizando o método de semeadura por esgotamento em estrias. As placas foram incubadas em câmara de germinação a  $30 \pm 2$  °C por um período de 96 h e as colônias isoladas foram novamente transferidas para novas placas contendo o mesmo meio estéril.

Tabela 3 – Composição do meio de cultura definido ASP 12-NTA segundo Iwasaki (1961) e modificado por Yokoya (1996).

Componentes	Quantidade para 1 L de meio
NaCl	28,0 g
KCl	0,7 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,0 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	4,0 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,5 g
NaNO <sub>3</sub>	0,1 g
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10,0 mg
Na <sub>2</sub> -glicerofosfato.xH <sub>2</sub> O	10,0 mg
Ácido nitrilotriacético (NTA)	0,1 g
TRIS	1,0g
Tiamina.HCl	100,0 µg
Biotina	1,0 µg
Cianocobalamina	1,0 µg
Metais-Traço PII	1 mL
Metais-Traço SII	1 mL

Fonte: HOLANDA, 2016

### 3.3 Morfologia e testes bioquímicos dos microrganismos agarolíticos isolados de *G. birdiae*

A morfologia das colônias isoladas foi avaliada quanto a forma, por observação em

com lupa. Já as células obtidas das colônias isoladas e crescidas a  $32 \pm 2$  °C por 48 h foram transferidas para 20 µL de NaCl 0,9% em uma lâmina de microscopia e feito o esfregão seguido de secagem e fixação em chama do bico de Bunsen para coloração de Gram. Utilizou-se Cristal Violeta 1 % como corante primário, Lugol 2% como modentete, Etanol-Propanona (1:1 v/v) como solução descorante e Fucsina básica 0,07 % como corante secundário. A observação foi realizada em microscópio ótico, imediatamente após a coloração, na objetiva de 100x na presença de óleo de imersão. (adaptado de GRAM, 1884).

Para os testes bioquímicos uma colônia isolada de cada cepa foi transferida para meios de cultura MacConkey Agar (w/ 0.15% Bile salts, CV and NaCl), TSI Agar, Phenilalanine Agar para avaliação do consumo de carboidratos, produção de H<sub>2</sub>S, tolerância a sais biliares e produção da fenilalanina desaminase. Tamanho de colônia foi avaliado pelo crescimento em placa com meio SWL, peptona 0,5 % e ágar 0,8% por 48 h e então medida o diâmetro da colônia com o auxílio do software Fiji (ImageJ). Todos os meios citados foram obtidos de HiMEDIA Laboratories (Mumbai, India). Todos os ensaios foram realizados em placas de Petri contendo os meios de cultura esterilizados em autoclave 121 °C, 1,0 atm por 15 min, as quais foram incubadas em estufa bacteriológica a 32 °C, por períodos de 16-48 h de acordo com o crescimento microbiano em cada teste.

### 3.4 Qualificação e quantificação da atividade agarolítica

Qualitativamente, solução de Lugol 5% é usada para visualizar a atividade da agarase em placa. Ele colore o polissacarídeo de ágar em uma cor marrom escuro, enquanto não colore os oligossacarídeos degradados do ágar (FU; KIM, 2010).

A unidade de atividade enzimática (U) foi definida pela geração de 1 µmol de produto por minuto (NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY, 1979). Para a determinação da atividade enzimática alíquotas das culturas bacterianas foram centrifugadas a 10000x g a 4 °C por 20 min e 40 µL do sobrenadante adicionado a 160 µL de uma solução agarose 0,1% em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0, homogeneizado e incubado a 37 °C por 20 min. A atividade enzimática foi medida pela liberação de equivalente redutores (ART) usando o método Somogyi-Nelson (NELSON, 1944) utilizando uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de D-galactose como padrão redutor, então, as leituras das absorbâncias foram realizadas a 540 nm em espectrofotômetro. As leituras foram realizadas em triplicata e os valores mostrados em média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.5 Cinética de crescimento do microrganismo agarolítico em diferentes meios de cultura

O microrganismo isolado que apresentou atividade agarolítica e o maior crescimento em placas de Petri, chamado GB002, foi utilizado para o estudo da cinética de crescimento microbiano em diferentes meios de cultura. Para tanto, o pré-inóculo foi obtido pela transferência de uma colônia bacteriana crescida em placa para o meio SWL suplementado com ágar 0,1% e mantidos em incubadora com agitação orbital a 120 rpm, 32 °C por 20 h. Após o período, uma alíquota encerrando 10 % do volume final do meio de fermentação (100 mL), com concentração celular de aproximadamente  $2,4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, transferida para quatro meios de cultura de composições diferentes, como descritos na TABELA 5. Para avaliação do crescimento microbiano os frascos foram mantidos a 160 rpm, 32 °C por 30 h e alíquotas de 2,0 mL foram retiradas a cada 2h, por um período total de 30 h.

Tabela 4 – Composição dos meios de cultura utilizados na avaliação do crescimento de GB002

Código	Composição do meio
BP <sub>A</sub>	SWL + ágar 0,1%
BP <sub>F</sub>	SWL + <i>Gb</i> seca 0,1%
BP <sub>P</sub>	SWL + ágar 0,1% + peptona 0,5%
BP <sub>G</sub> *	SWL + <i>Gb</i> fresca triturada 1%

\*Meio de cultura pasteurizado HTST, 80 °C por 25 s de acordo com *International Dairy Foods Association*.

Fonte: Elaborado pelo autor

As alíquotas foram analisadas quanto a contagem de células viáveis pelo método *drop-plate* (HOBEN; SOMASEGARAN, 1982). Foram realizadas s diluições das amostras até  $10^{-7}$  e as placas foram incubadas a  $33 \pm 0,5$  °C em estufa bacteriológica por 10 h para posterior contagem. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram mostrados em gráficos gerados com auxílio do software MicrosoftExcel v. 16.0. Os parâmetros cinéticos de crescimento microbiano foram calculados segundo as equações mostradas na TABELA 5. 500 mL das alíquotas retiradas foram utilizadas para a verificação da atividade enzimática, como descrito na seção 3.4.

Tabela 5 – Parâmetros cinéticos do crescimento microbiano.

Número	Equação	Descrição
1	$v = \Delta X / \Delta t$	Velocidade de crescimento microbiano para um ponto específico, onde $\Delta X$ ( $X_0 - X$ ) é o n° de células (UFC mL <sup>-1</sup> ) e t é o tempo (h).
2	$\max_{0 \leq X \leq 30} X$	Concentração máxima de células durante o processo (UFC mL <sup>-1</sup> ).
3	$\mu = \frac{dX(\Delta X)}{dt(\Delta t)} \times 1/X$ $= V_x/X$	Velocidade de crescimento específico (1/UFC).

Fonte: (NAJAFPOUR, 2015; SHULER; KARGI, 2002)

### 3.6 Fermentação descontínua para produção do extrato agarolítico

#### 3.6.1 Preparo do inóculo

GB002 foi selecionada e utilizada para preparo do inóculo. Colônias crescidas em placa de Petri, contendo o meio SWL sólido, foram transferidas para o meio SWL líquido (100 mL) contendo ágar 0,1% e mantidas em incubadora com agitação orbital (120 rpm) por 24 h a 32 °C finalizando com uma concentração de 1,7x10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>

#### 3.6.2 Fermentação descontínua

O meio de fermentação constituído de SWL contendo 100 g de *G. birdiae* triturada foi pasteurizado a 84 °C por 25 s e em seguida foi inoculado na proporção de 10% do volume final (300 mL) do meio de fermentação. O bioprocesso foi conduzido em erlenmeyers de 500 mL sob agitação constante de 175 rpm a 32 °C por sete dias. Após o período o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 10000x g a 4 °C por 20 min e o sobrenadante foi dialisado (*cut off* 12 kDa) contra água destilada e nomeado de FESS-I.

### 3.7 Purificação da enzima agarolítica presente no extrato FESS-I

#### 3.7.1 Concentração

O extrato agarolítico (FESS-I) foi congelado, descongelado e centrifugado 12000x g, 4 °C por 20 min para a remoção de carboidratos. Posteriormente, foi adicionado 5 mL de água destilada no *pellet*, homogeneizado, centrifugado nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante adicionado ao FESS-I, seguido de filtração pelo sistema de Vivaspin® 100 e 10

kDa MWCO (GE Healthcare) 1500x g, 20 min a 4 °C. A fase retida foi coletada e testada para atividade enzimática.

### **3.7.2 Cromatografia de troca iônica**

FESS-I foi submetida à cromatografia de troca aniônica em resina DEAE-Celulose, previamente equilibrada com Tampão Tris-HCl 25 mM pH 6,5. Foram aplicados 6 mL de FESS-I (0,93 mgP mL<sup>-1</sup>) em 115 mL de matriz em coluna de 12 cm de altura e 3,5 cm de diâmetro. O pico retido foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio, contendo NaCl na concentração de 1,0 M. A cromatografia foi realizada sob um fluxo constante de 1,0 mL/min, coletando frações de 3 mL/tubo, as quais foram avaliadas quanto às absorbâncias a 280 nm (espectrofotômetro Armersham Biosciences Ultrospec 2100 pro). A atividade agarolítica das frações coletadas (10 µL de amostra) foi acompanhada pelo teste qualitativo da degradação da agarose em placa de Petri.

### **3.7.3 Quantificação de proteínas totais**

A determinação da concentração de proteína solúvel no extrato bruto proteico e em todas as etapas pertinentes descritas nesse trabalho foi realizada de acordo com a metodologia descrita por BRADFORD, 1976 utilizando uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). Para o ensaio, 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados a alíquotas de 100 µL das soluções proteicas e agitadas. Após 10 minutos, as leituras das absorbâncias foram realizadas a 595 nm em espectrofotômetro (Armersham Biosciences Ultrospec 2100 pro).

## **3.8 Caracterização da enzima agarolítica**

### **3.8.1 Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida**

Eletroforese unidimensional em condições desnaturantes (PAGE-SDS) foi utilizada nesse estudo para avaliar o perfil das proteínas solúveis no extrato agarolítico. Foram utilizados géis de eletroforese de poliacrilamida 12,5%, em placas de 10 x 8 cm (adaptado de LAEMMLI, 1970). As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo 1,0% de SDS, 20% de glicerol e 0,02% de Azul de Bromofenol) em uma

proporção de 4:1. Para a estimativa da massa molecular foram utilizados, como padrão, proteínas com massas moleculares conhecidas: fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica (67,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica bovina (29,0 kDa), inibidor de tripsina da soja do tipo Kunitz (20,1 kDa) e a  $\alpha$ -lactalbumina (14,2 kDa). A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical e submetidos a uma diferença de potencial de 200 V e corrente de 20 mA, por um período de aproximadamente 2 horas, a 25 °C, utilizando a solução de Tris 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e 0,1% de SDS como tampão de corrida. Após o término da eletroforese, foi utilizada a solução corante 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% de metanol, 10% de ácido acético e água destilada para a revelação das bandas proteicas. Para evidenciar as bandas proteicas e descorar o gel de separação foi utilizada uma solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético e água destilada). As massas moleculares aparentes das bandas proteicas foram mensuradas utilizando-se o software GelAnalyzer 2010 (LAZAR, 2010).

### **3.8.2 Zimograma**

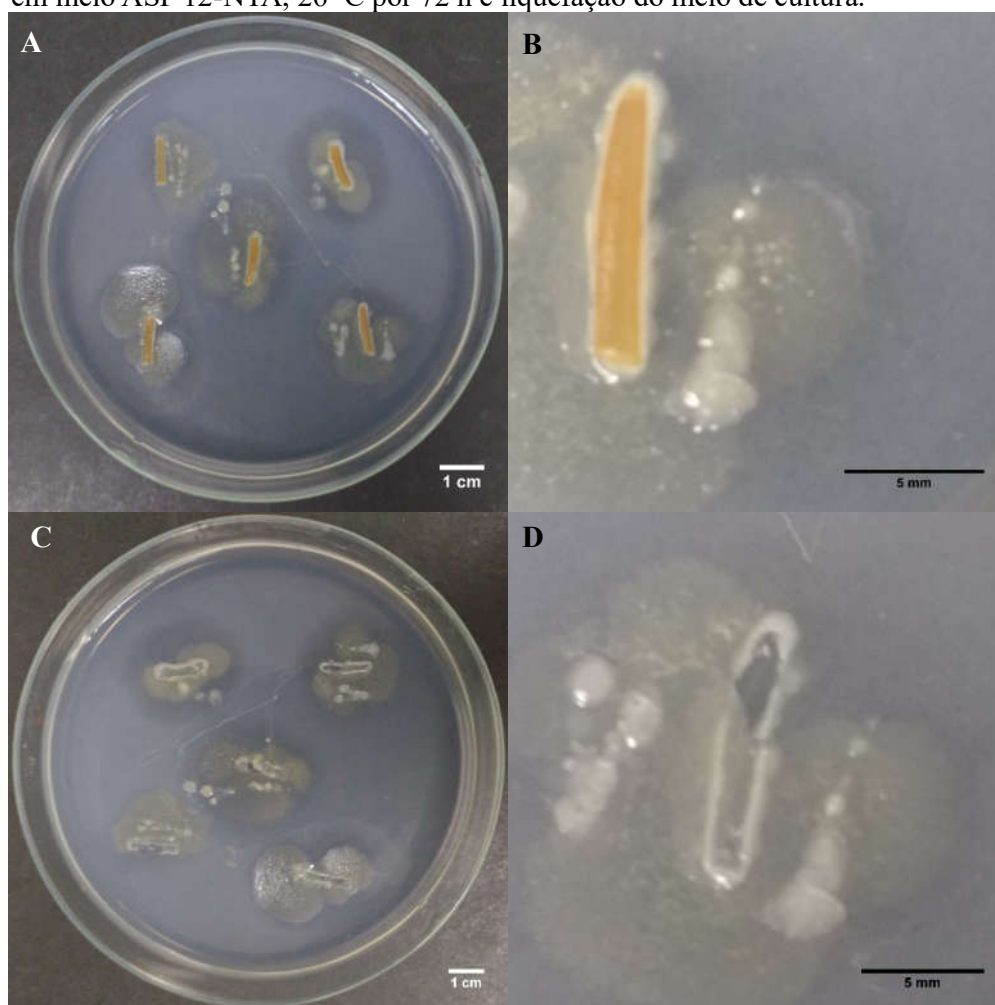
Soluções de amostra proteicas (aproximadamente 15  $\mu$ g/poço) foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com agarose 0,2 % para detectar a atividade agarolítica. Os mesmos parâmetros do item 3.6.3 foram aplicados, e após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em agitação, três vezes, por 10 min com o Triton-X 100 1 % para a remoção do SDS e lavado duas vezes com TRIS-HCl 20 mM, pH 6,5 a 25 °C. Para detecção da atividade, o gel foi incubado a 37 °C durante 4 h e então corado com Lugol (5% I<sub>2</sub> e 10% KI) e a massa molecular foi determinada comparando com o gel da eletroforese SDS-PAGE.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento e seleção de microrganismos agarolíticos associados a *Gracilaria birdiae*

A microbiota associada a macroalga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* apresentou grande diversidade morfológica, bem como a liquefação do meio de cultura em torno do explante (FIGURA 6), mostrando o seu potencial de degradação do ágar, um dos carboidratos que compõe a matriz celular da alga *G. birdiae*.

Figura 6 – Crescimento microbiano associados a explantes de *Gracilaria birdiae* em meio ASP 12-NTA, 26 °C por 72 h e liquefação do meio de cultura.

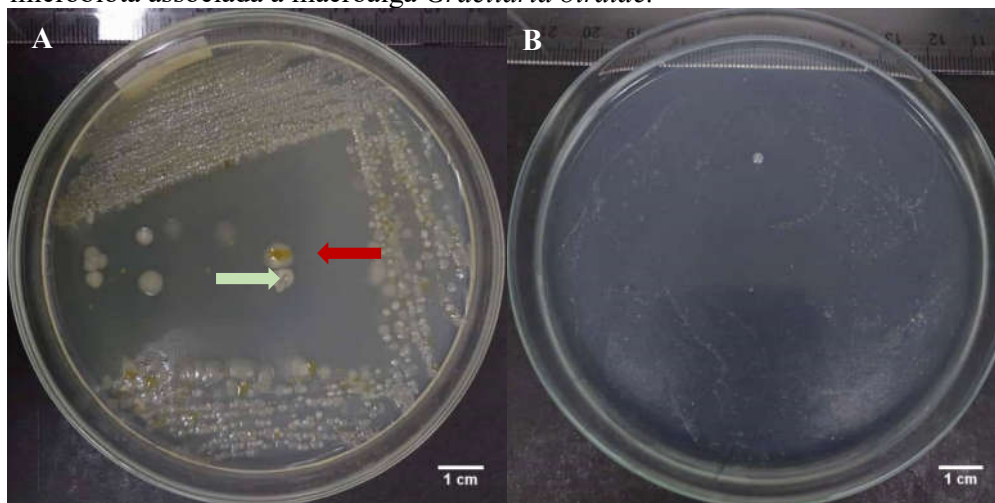


(A e B) Heterogeneidade do tamanho e formas das colônias (C e D) Formação de halos liquefeitos no meio de cultura em torno das colônias microbianas. Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao transferir assepticamente parte do meio de cultura liquefeito formado em torno do explante da alga para placas de Petri pelo método de esgotamento, foi possível observar mais

claramente o crescimento de várias colônias microbianas de características morfológicas diferentes (FIGURA 7), com predominância de duas específicas uma branca e leitosa e outra amarela e translúcida.

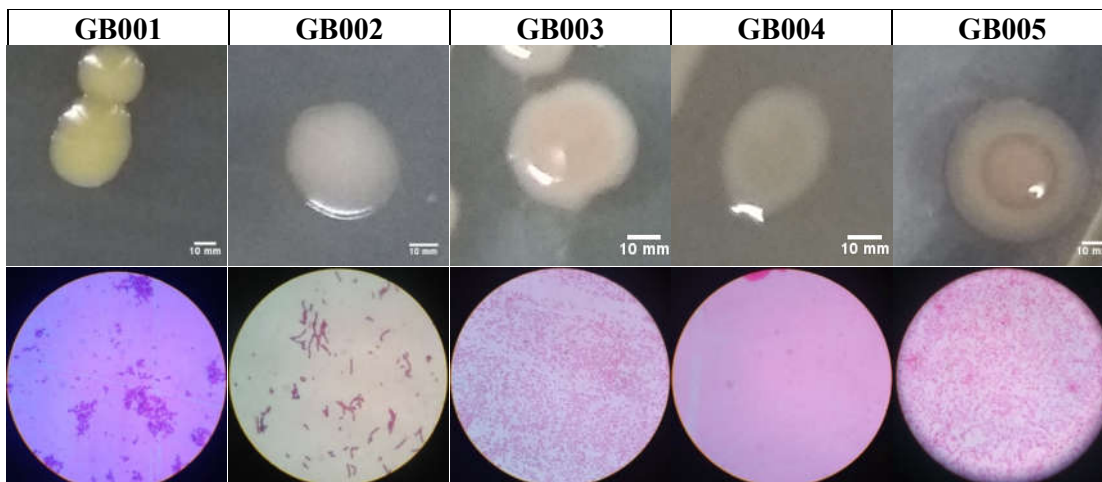
Figura 7 - Diversidade morfológica de colônias microbianas obtidas a partir da microbiota associada à macroalga *Gracilaria birdiae*.



(A) predomínio de duas colônias microbianas (seta vermelha, seta verde) crescidas no meio de cultura composto de água do mar + ágar 0,8%. (B) Colônias uniformes crescidas no meio SWL (sem extrato de levedura) + ágar 0,8%, apresentando característica translúcida. Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dessas colônias foi possível o isolamento de 5 microrganismos agarolíticos diferentes, os quais foram nomeados de **GB001**, **GB002**, **GB003**, **GB004** e **GB005** e apresentaram características culturais diferentes em meio SWL com peptona 0,5 % solidificado com ágar 0,8% (FIGURA 8).

Figura 8 – Morfologia das colônias e coloração de Gram de bactérias isoladas de *G. birdiae*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A TABELA 6 mostra as características culturais dos microrganismos isolados de *G. birdiae*.

Tabela 6 – Características culturais dos microrganismos isolados da microbiota associada a *G. birdiae*.

Característica Cultural	Microrganismos isolados de <i>G. birdiae</i>				
	GB001	GB002	GB003	GB004	GB005
Forma	circular	circular	circular	fusiforme	circular
Elevação	convexa	convexa	umbonada	plana	umbonada
Borda	ondulada	inteira	inteira	inteira	inteira
Cromogênese/ Detalhes Ópticos	Amarela/opaca	Branca/ brilhante	Alaranjada/ translúcida	Branca/ transparente	Centro amarelo/ brilhante
Odor	presente	ausente	ausente	ausente	presente
Superfície	seca	mucoide	mucoide	lisa	lisa
Morfologia celular/Coloração de Gram	Cocos Gram- positivos	Diplobacilos Gram- negativos	Bacilos Gram- negativos	Cocos Gram- negativos	Bacilos gram- negativos

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como resultado dos testes metabólicos realizados todos os microrganismos apresentaram crescimento na salinidade dos meios propostos (0,9 % e 3,6 %), todavia GB001, GB002 e GB005 apresentaram um crescimento maior na salinidade 3,6 %.

No meio MacConkey, meio seletivo para bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae*, não houve crescimento para nenhum dos testados. Com exceção de GB002, nenhuma das bactérias produziu a enzima fenilalanina desaminase que é uma enzima presente nos gêneros de enterobactérias *Proteus* e *Providencia*. O resultado já era esperado, uma vez que não houve crescimento no meio MacConkey para enterobactérias e o resultado positivo de GB002 supõe que seja um organismo produtor dessa enzima fora da família *Enterobacteriaceae* uma vez que já foi relatado essa enzima em outros organismos, halófilos inclusive, como em três espécies do gênero *Halomonas* (MARTÍNEZ-CÁNOVAS et al., 2004).

GB001 e GB004 foram positivos para a produção de H<sub>2</sub>S e negativos para a produção de ácido pela fermentação de glicose juntamente com GB003. GB001 e GB004 também não formaram ácido pela fermentação da lactose e/ou sacarose. Os resultados são mostrados na TABELA 7.

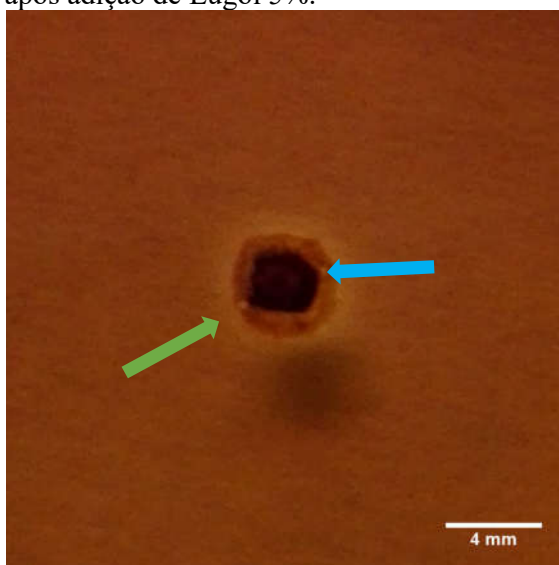
Tabela 7 – Testes bioquímicos dos microrganismos isolados a partir da microbiota associada a macroalga *G. birdiae*.

Teste bioquímico	Microrganismos isolados de <i>G. birdiae</i>				
	GB001	GB002	GB003	GB004	GB005
<i>Crescimento em meio hiposalino 0,9%</i>	+	++	++	+++	++
<i>Crescimento em meio hipersalino 3,6%</i>	+++	+++	++	+	+++
<i>Crescimento em meio MacConkey</i>	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
<i>Fermentação de glicose com produção de ácido</i>	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo
<i>Fermentação de Lactose e/ou sacarose com produção de ácido</i>	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo
<i>Produção de fenilalanina desaminase</i>	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
<i>Produção de H<sub>2</sub>S</i>	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo

Fonte: Elaborado pelo autor

O crescimento de GB002 em meio de cultura contendo apenas ágar como fonte de carbono sugere a produção e a liberação de enzimas agarolíticas. A produção e a secreção dessas enzimas por GB002 foram comprovadas pela aplicação de Lugol 5% no meio de cultura contendo a colônia e imediata observação de halo em torno da colônia, mostrado na FIGURA 9.

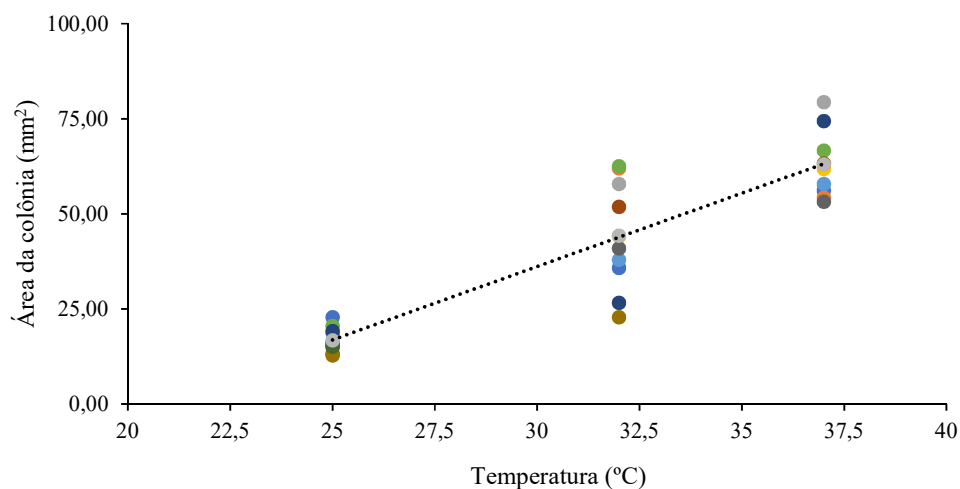
Figura 9 – Revelação da degradação do ágar presente no meio de cultura de GB002 por meio da observação de halo em torno da colônia, após adição de Lugol 5%.



Seta verde: halo de degradação do polímero de ágar; Seta azul: biofilme formado durante o crescimento microbiano. Fonte: Elaborado pelo autor.

Além dos resultados obtidos, GB002 também apresentou um crescimento rápido em temperaturas que variaram de 25 a 37 °C, com colônias que alcançaram até 75 mm<sup>2</sup> de área a temperatura de 37 °C (FIGURA 10).

Figura 10 – Área das colônias de GB002 em 25 °C, 32 °C e 37 °C em meio SWL suplementado com peptona 0,5% e solidificado com ágar 0,8%.



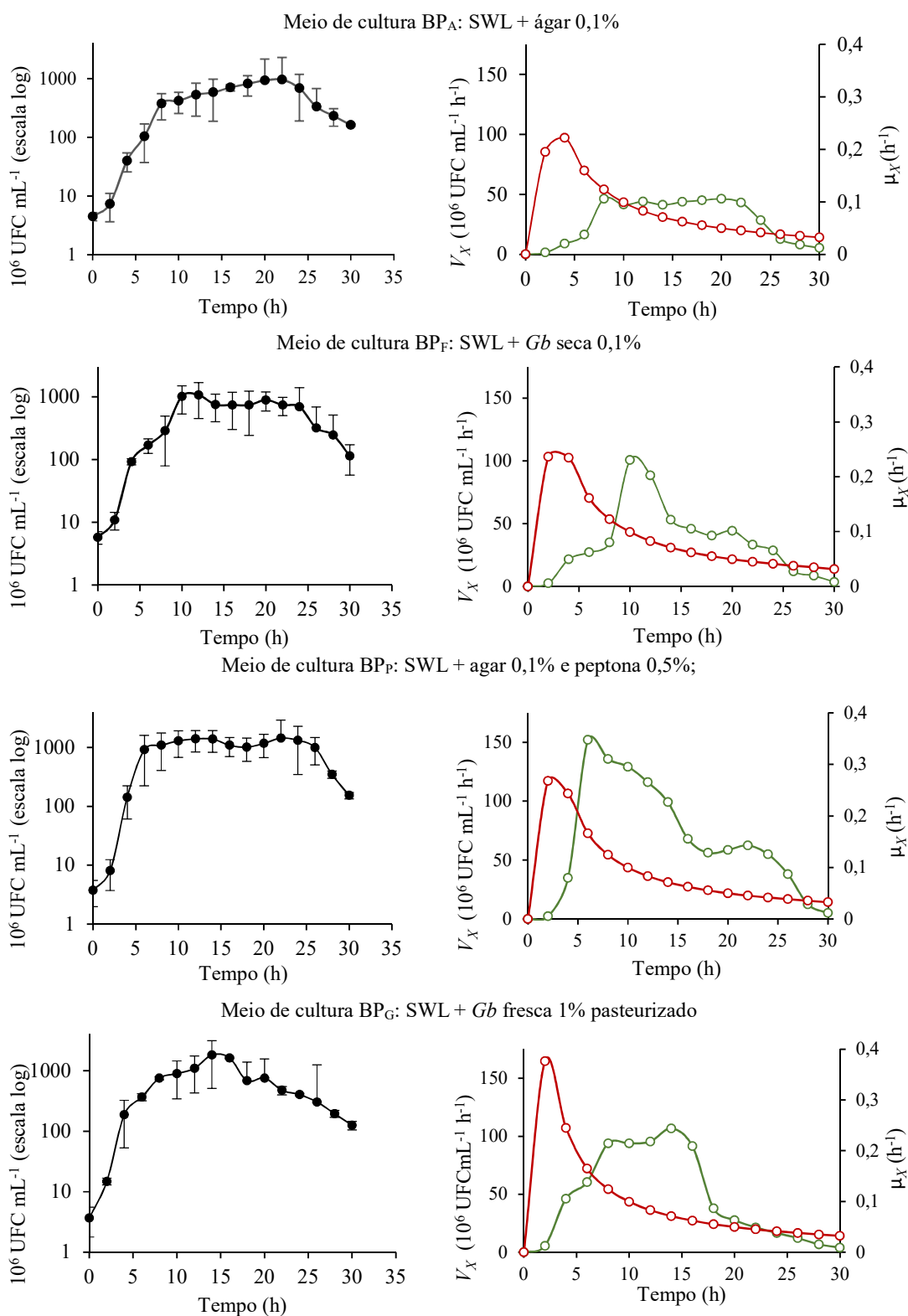
Fonte: Elaborado pelo autor.

Diante dos resultados obtidos para GB002, os quais corroboraram com as características ideais de um microrganismo de aplicação industrial apresentando baixa exigência cultural, rápido crescimento em temperaturas próximas a temperatura ambiente e excreção da enzima agarolítica associada ao crescimento, ele foi selecionado para dar continuidade ao trabalho com o estabelecimento do bioprocessamento de produção da enzima agarolítica.

#### 4.2 Curva e cinética do crescimento de GB002 em diferentes meios de cultivo

As curvas de crescimento e os parâmetros cinéticos de crescimento da bactéria GB002 em diferentes meios de cultura estão mostrados na FIGURA 11. O crescimento microbiano mostrou um rápido aumento de biomassa em um período inferior a 4 horas.

Figura 11 – Curvas de crescimento e velocidades instantâneas ( $V_X$ ) e específicas ( $\mu_X$ ) de crescimento de GB002 em diferentes meios de cultivo a 32 °C, 160 rpm por 30h.



O gráfico BP<sub>A</sub> da FIGURA 11 mostra um crescimento rápido e um ciclo de vida celular curto, onde em aproximadamente em 26 h, GB002 completa todas as fases de crescimento.

De acordo com a velocidade de crescimento ( $V_X$ ) mostrada na FIGURA 11 para BP<sub>A</sub>, foi observado que do tempo 0 a 2 h a velocidade de crescimento mostrou-se quase nula representando a fase de latência ou fase *lag* que, na maioria das vezes, é uma fase curta que não ocorre um crescimento significativo, ou muito baixo, dependendo da composição e condições de cultivo em que o inóculo se encontra. Nesse processo, a composição do inóculo foi similar ao meio em que foi inoculado, o que fez com que GB002 estivesse pré-adaptada ao processo, o que é mostrado no aumento de biomassa baixo, mas perceptível, no mesmo período em BP<sub>A</sub>. Em relação ao crescimento específico, as células apresentaram o  $\mu_{\max} = 0,2218 \text{ h}^{-1}$  em 4 h de cultivo. De 2 a 8 h o crescimento entrou na fase exponencial, ou fase *log*, que mostrou um crescimento rápido e uma velocidade máxima de crescimento de  $V_{\max} = 4,63 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . De 8 a 22 h a cultura entrou em fase estacionária, onde a velocidade do crescimento é proporcional a velocidade de morte celular, e após 22 h as células entram em estágio de morte (fase de declínio) onde a morte celular é mais acentuada que o crescimento e graficamente é percebido pelo decréscimo da curva no crescimento e na velocidade. Nesse meio de cultura a concentração máxima de células foi  $\max_{0 \leq X \leq 30} X = 9,52 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$  em 22 h.

O meio de cultura BP<sub>F</sub>, acrescido de *Gracilaria birdiae* seca como fonte de nutrientes, continha um teor de  $573,6 \pm 2,20 \text{ mg}$  de carboidratos totais e  $137,2 \pm 0,9 \text{ mg}$  de proteínas em 1 g de alga seca triturada. A curva de crescimento mostra uma pequena diferença significativa quando comparada à BP<sub>A</sub> pois seu  $\mu_{\max} = 0,236 \text{ h}^{-1}$  ocorre em 2 h de cultivo. Mesmo assim em 4 h seu  $\mu$  é  $0,234 \text{ h}^{-1}$  semelhante ao tempo anterior. A velocidade nesse meio se comporta de uma maneira diferente onde a fase *lag* ocorreu de 0 a 2 h, seguida por um rápido crescimento e um período em que o incremento na velocidade não foi tão significativa (4 - 8 h) tendo, assim, um  $V_{\max} = 1,00 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$  em  $t = 10 \text{ h}$ . Sua fase de declínio se iniciou em 24 h e seu  $\max_{0 \leq X \leq 30} X = 1,06 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$ .

BP<sub>P</sub> é o meio que possui peptona 0,5 % como fonte de nitrogênio e ágar 0,1 % como fonte de carbono. Esse meio de cultivo GB002 teve um crescimento mais uniforme em comparação com uma curva padrão para crescimento microbiano. Sua fase *lag* foi baixa com duração apenas de 2 h, mas alcançou a maior velocidade de crescimento tendo

um  $\mu_{\max} = 0,268 \text{ h}^{-1}$  em 2 h sendo o maior em comparação aos meios estudados. Por outro lado, quando observado  $V_X$ , a velocidade máxima de crescimento ocorre em 6 h com  $V_{\max} = 1,52 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . A fase estacionária foi mais longa que nos outros cultivos estendendo de 6 a 26 h e a fase de declínio após esse período.

Já no meio BP<sub>G</sub>, a fonte de nutrientes orgânicos foi apenas a *Gb* 1 % e a pasteurização foi efetiva no controle da carga microbiana presente no meio de cultura inicial que consistiu da diminuição da carga microbiana de  $1,70 \times 10^6$  para  $5,50 \times 10^1 \text{ UFC mL}^{-1}$  (0,0032 % da carga inicial). Nesse meio de cultivo, semelhante a BP<sub>P</sub>, houve um crescimento específico maior em 2 h de  $\mu_{\max} = 0,376 \text{ h}^{-1}$  com uma fase estacionária mais curta que os demais meios se estendendo de 8 a 16 h. Esse crescimento rápido no início do processo deve-se ao fato da presença de uma carga microbiana baixa pré-existente no sistema, o que diminuiu a fase *lag* aumentou a densidade celular rapidamente, tendo assim uma concentração de células  $X_{\max} = 1,82 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$  superior 47,80% ao BP<sub>A</sub>, 41,75% ao BP<sub>F</sub> e 20,87% ao BP<sub>P</sub>, sendo o meio melhor para o crescimento bacteriano de GB002.

A teoria metabólica da ecologia prediz que as taxas de crescimento serão maiores para os menores organismos da biosfera, os micróbios (BROWN et al., 2004). Essa teoria é aceita uma vez que, atualmente, o organismo que apresenta a maior taxa de crescimento é a bactéria marinha *Vibrio natriegens* que é capaz de duplicar a cada 7 minutos, com  $\mu$  superior a  $5,83 \text{ h}^{-1}$  (MAIDA et al., 2013). Por outro lado, a bactéria *Pelagibacter ubique*, tem um tempo de geração de quase dois dias e taxas de crescimento de 0,01 a  $0,025 \text{ h}^{-1}$  em culturas puras de laboratório (CARINI et al., 2013; RAPPE et al., 2002).

FURUSAWA, 2017 relatou vários gêneros de bactérias agarolítica isoladas e identificadas a partir de amostras de sedimentos, algas marinhas e água do mar tais como *Agarivorans*, *Alteromonas*, *Catenovulum*, *Cytophaga*, *Flammeovirga*, *Microbulbifer*, *Microscilla*, *Paenibacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Pseudozobellia*, *Saccharophagus*, *Vibrio*, *Zobellia*. Estas bactérias agarolíticas metabolizam ágar primariamente com  $\beta$ -agarase. Várias espécies bacterianas, como *Cytophaga flevensis* (VAN DER MEULEN; HARDER; VELDKAMP, 1974), *Saccharophagus degradans* (HA et al., 2011) são capazes de usar ágar como única fonte de carbono. Para realizar esse metabolismo exclusivo de ágar, os dissacarídeos e as neoagarobioses produzidos pela agarase são hidrolisados em monômeros, como D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose. Tem sido relatado que a neoagarobiose hidrolase é essencial para essa hidrólise (FURUSAWA et al., 2017).

Vale ressaltar que o meio de cultura definido utilizado para o crescimento microbiano (SWL sem extrato de levedura) não continha nenhuma fonte de nitrogênio, mesmo assim houve crescimento, mesmo que deficiente, sugerindo que essa bactéria pode ser capaz de utilizar nitrogênio inorgânico da atmosfera para a síntese de compostos nitrogenados essenciais para o crescimento.

*Halomonas aquamarina* e *Alteromonas macleodii* são bactérias relatadas na literatura como microrganismos agarolíticos que também são capazes de crescer em meio de cultura sem fonte de nitrogênio, além de serem halófitas (salinidade ótima de 2 - 5% NaCl), alcalófitas (pH 8) e melhor crescimento em 25 °C (SORKHOH et al., 2010), e muitas isoladas por SHIEH podem crescer em um meio livre de nitrogênio (SHIEH; SIMIDU; MARUYAMA, 1988).

Jang-Cheon e Stephen cultivaram 12 isolados de 40 cepas da classe *Gammaproteobacteria* a partir de regiões costeiras e pelágicas do Oceano Pacífico. Os isolados tiveram crescimento relativamente lento em meios naturais de água do mar (0,051 a 0,109 h<sup>-1</sup>) e foram psicogênicos (crescimento em temperaturas baixas) a mesófilos (crescimento em temperatura próxima a ambiente) e obrigatoriamente oligotróficos; muitos deles eram do tamanho ultra microbial (< 0,1 µm<sup>3</sup>, 10× menor que uma célula de *E. coli*) (CHO et al., 2004).

O resultado de otimização do meio de cultivo da bactéria *Agarivorans albus* YKW-34 desenvolvido por FU, 2009 mostrou que o ágar é a fonte de carbono mais efetiva para a produção de agarase, quando testada várias fontes de carbono e a combinação delas. Quanto a fonte de nitrogênio, a atividade máxima de agarase foi obtida quando o extrato de levedura foi utilizado como fonte de nitrogênio em relação a outras fontes orgânicas (extrato de carne e peptona) e fontes inorgânicas (KNO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>Cl) (FU; LIN; KIM, 2009). A preferência pela fonte de nitrogênio varia com os microrganismos onde, no cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* AG LSL-11 a maior produção de agarase foi obtida quando o extrato de levedura foi utilizado como fonte de nitrogênio (LAKSHMIKANTH et al., 2006a), enquanto que a fonte inorgânica NaNO<sub>3</sub> foi mais efetiva no cultivo de *Acinetobacter* sp. AG LSL-1 (LAKSHMIKANTH et al., 2006b) e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> foi uma fonte ótima para o cultivo *Cytophaga flevensis* (DER MEULEN; HARDER, 1975).

A pasteurização é um tratamento térmico que destrói organismos patogênicos (bactérias, vírus, protozoários, fungos e leveduras) em alimentos para reduzir a contagem bacteriana total. Ao contrário da esterilização, a pasteurização não se destina a matar

todos os microrganismos, apenas a uma “destruição de 5 log”, (99,999 %) e é projetada para causar pouca, ou nenhuma, degradação do conteúdo nutricional dos produtos. Hoje, o processo de pasteurização HTST (*High Temperature/Short Time*), também conhecido como pasteurização instantânea, uma vez que é energeticamente eficiente, minimiza os danos de modificação no tratamento dos produtos e é muito efetivo na destruição de microrganismos (A&B PROCESS SYSTEMS, 2018).

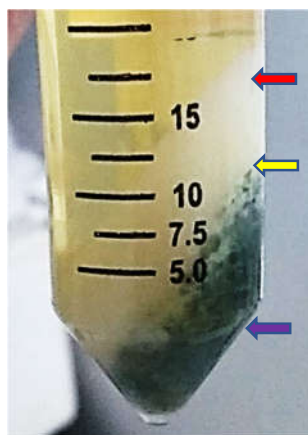
Neste trabalho o processo de pasteurização foi pensado principalmente pelo estado físico do meio de cultura após a esterilização por autoclavagem, uma vez que no processo seria extraído o ágar presente na parede celular do substrato formando um gel viscoso após o resfriamento dificultando a homogeneização das células no meio. Com a pasteurização foi possível diminuir 99,996 % da carga microbiana presente com um crescimento predominante de GB002.

### 4.3 Produção do extrato com atividade agarolítica

O extrato proteico FESS-I apresentou uma concentração de 0,0645 mg de proteínas mL<sup>-1</sup> e um volume total de 246 mL, consistindo em 15,87 mg de proteínas totais.

Após o congelamento, descongelamento e centrifugação, foi obtido um *pellet* composto de carboidratos remanescentes da primeira centrifugação. Esse processo de congelamento, neste caso, foi interessante pois há uma alta produção de biofilme de composição polissacarídica por GB002 (FIGURA 12), além dos carboidratos liberados durante a degradação do substrato *Gb*. A atividade enzimática foi detectada pela degradação da agarose em placa e geração de açúcares redutores totalizando uma atividade de  $0,25 \pm 0,02$  U mL<sup>-1</sup> ou 3,87 U mgP<sup>-1</sup>.

Figura 12 – Resultado da centrifugação para obtenção do extrato agarolítico produzido por GB002.



Seta vermelha: Camada de biofilme produzido durante o cultivo de GB002 em meio semi-sólido. Seta amarela: Massa celular; Seta roxa: Resíduo do substrato. Fonte: elaborado pelo autor.

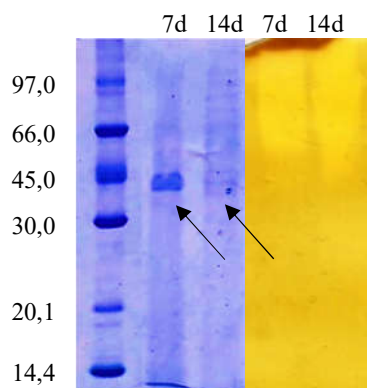
Na utilização do Vivaspin 100 kDa foi detectado atividade enzimática tanto na fração retida como na não retida. Então foi aplicado em membrana de 10 kDa para a concentração das proteínas. O volume recuperado representou 6,09% do volume aplicado com uma concentração de proteínas aproximado de de 0,93 mg mL<sup>-1</sup> e 13,95 mgP total. A atividade enzimática observada foi 0,67 ± 0,02 U mL<sup>-1</sup> sendo 0,72 U mgP<sup>-1</sup> a atividade específica.

#### 4.4 Caracterização da enzima agarolítica

Na eletroforese realizada para o extrato proteico, foi evidenciada uma banda predominante na altura de 44 kDa (FIGURA 13) e após a resuspensão do *pellet* em meio SWL e mantido por mais 7 dias (14 dias no total), uma banda mais fraca foi também observada. Uma banda de menor intensidade foi observada superior e bem próxima à de maior intensidade.

No zimograma, quando o gel foi corado a degradação do gel foi observada durante a corrida, revelando uma área mais clara desde o início do gel até aproximadamente a mesma altura das bandas da eletroforese.

Figura 13 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% e zimograma em gel de poliacrilamida com ágar 0,2 % das amostras FESS-I sete dias e 14 dias.

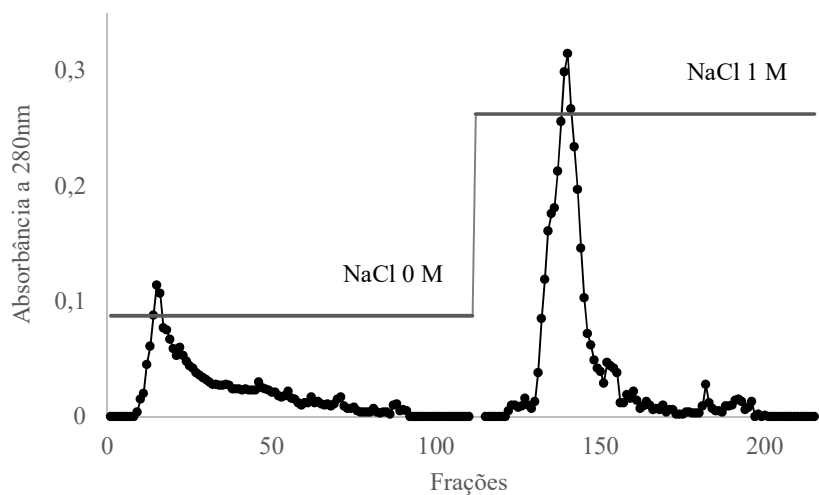


No gel de eletroforese (azul) é evidenciada uma banda predominante na altura aproximada de 44 kDa indicado pelas setas, enquanto no zimograma (amarelo) houve a degradação do gel até a altura das bandas proteicas, da fermentação em 7 dias e 14 dias. Fonte: Elaborado pelo autor.

A cromatografia de troca aniônica mostrou o perfil representado no GRÁFICO 2, em que, apenas com o tampão Tris-HCl 25 mM e pH 6,5, apresentou absorbâncias significativas no pico não retido, com uma absorbância máxima de  $Abs_{280} = 0,107$  após o volume de 48 mL. As frações (F) 9 a 30 apresentaram atividade agarolítica verificado em placa, sendo que de F-9 até F-16 mostraram um aumento da intensidade de degradação e posteriormente decrescendo gradativamente juntamente com a absorbância. Não foi quantificado a atividade enzimática das frações.

Após essa observação, passou-se a eluir o restante das proteínas com NaCl 1 M e resultou no perfil também mostrado na FIGURA 14 que apresentou o maior pico  $Abs_{280} = 0,315$ , sem atividade enzimática em placa em nenhuma das frações.

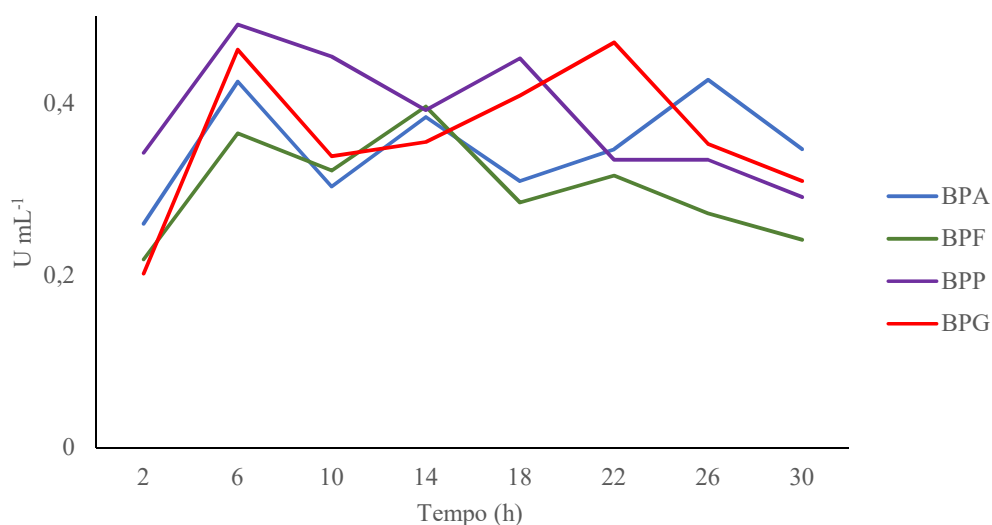
Figura 14 – Cromatografia de troca iônica de FESS-I em matriz DEAE-celulose, pH 6,5.



Os marcadores (•) no gráfico mostram as frações coletadas relacionado aos picos de absorvância a 280nm. As linhas mostram a aplicação da concentração de NaCl. A cromatografia correu em um fluxo de 1 mL/min com volume de frações de 3 mL.

Na produção da enzima em diferentes meios de cultura, o acompanhamento da produtividade está mostrado na FIGURA 15.

Figura 15 – Produção enzimática de GB002 durante a fermentação em diferentes meios de cultivo.



Produção enzimática nos meios de cultura BPA: SWL + ágar 0,1% (linha azul); BPF: SWL + Gb seca 0,1%(linha verde) ; BPP: SWL + ágar 0,1% + peptona 0,5% (linha roxa) e BPG: SWL + Gb fresca triturada 1% (linha vermelha). Fonte: Elaborado pelo autor

GB002 nos meios estudados mostrou uma heterogeneidade quanto a atividade enzimática do sobrenadante do processo, onde a atividade máxima variou de acordo com o

tempo de cultivo. Quanto a produção de atividade agarolítica, no meio BP<sub>A</sub> =  $0,42 \pm 0,008$  U mL<sup>-1</sup> no tempo de 26 h, apenas 4% maior em relação a atividade detectada em 6 h. BP<sub>F</sub> =  $0,396 \pm 0,024$  U mL<sup>-1</sup> em 14h, BP<sub>G</sub> =  $0,470 \pm 0,070$  U mL<sup>-1</sup> em 22 h e apresentando valor maior e menor tempo no meio BP<sub>P</sub> =  $0,490 \pm 0,090$  U mL<sup>-1</sup> em 6 h.

As agarases encontradas até hoje apresentam uma diversidade de propriedades catalíticas e estruturais.  $\beta$ -agarase de *Vibrio* sp. AP-2 possui  $M_r = 20$  kDa, uma das menores proteínas agarolíticas já relatadas e atua em faixa de pH de 4,0 - 9,0 com uma atividade ótima em pH 5,5 em temperaturas abaixo de 45 °C (AOKI; ARAKI; KITAMIKADO, 1990), enquanto que *Alteromonas agarlyticus* GJ1B, produz uma  $\alpha$ -agarase de 360 kDa em forma de dímero com subunidades ativas de 180 kDa,  $pI$  de 5,3, faixa de pH de 6,0 – 9,0 e atividade máxima em pH 7,2 (POTIN et al., 1993).

A filtração na membrana do Vivaspin de *cut-off* 10 kDa foi eficiente pois mostrou uma redução muito significativa do volume e concentração de proteínas, porém, em membranas de *cut-off* 100 kDa houve a atividade enzimática na fração retida e na não retida, sugerindo que uma possível agregação proteica, com carboidratos ou até mesmo a existência de outra proteína de massa molecular maior com a mesma atividade, pois há microrganismos que produzem mais de um tipo de agarase como relatado por JAM et al., 2005; LAKSHMIKANTH et al., 2006a; MORRICE et al., 1983. O procedimento de concentração proteica utilizando sulfato de amônio, muito utilizado na purificação dessas proteínas, foi descartado deste trabalho, pois ao final do processo se obtém um alto volume de extrato e aplicando esse sal, na concentração de 75%, além de aumentar o tempo e custo com o processo *down-stream*, também gerou precipitação de muito carboidrato junto com as proteínas, necessitando centrifugações extras para a remoção dos mesmos.

De acordo com a massa relativa mostrada na eletroforese, a literatura encontrada não apresenta nenhuma enzima com essa massa, sendo que enzimas com massa mais próximas são de *Zobellia galactoviorans* com 40 kDa (JAM et al., 2005) e de *Pseudomonas aeruginosa* AG LSL-11 de 46 kDa (LAKSHMIKANTH et al., 2006a).

Na otimização da produção de agarase por *Pseudomonas aeruginosa* AG LSL-11, foi observada a produção de três agarase de  $M_r$  76, 64 e 46 com um atividade enzimática máxima de  $0,32$  U mL<sup>-1</sup> em 36 h de cultivo a 30 °C e com uma concentração de NaCl 2% (LAKSHMIKANTH et al., 2006a). Na produção de agarase com variação da composição dos nutrientes do meio de cultura para a bactéria marinha *Vibrio* sp. JT0107 foi obtida uma produção enzimática máxima de  $0,867$  U mL<sup>-1</sup> em biorreator de 5L (volume do processo 3L) com aeração (0.5 vvm,  $k_{La} = 65$  h<sup>-1</sup>), e agitação (350 rpm) e 20g/L de polipeptona, 4g/L de extrato de

levedura e 4g/L de ágar em água do mar artificial. A agarase apresentou  $Mr = 72$  (SUGANO et al., 1993).

Com os dados obtidos, e em comparação com a literatura consultada, o isolamento de um microrganismo de ambiente marinho, com um método simples, foi eficiente. O crescimento rápido e baixo requerimento de nutrientes, apresentados por GB002, são características de muito interesse para o desenvolvimento de um processo industrial, pois diminui os custos com matéria prima com meios mais econômicos e o processo pode ser conduzido de várias maneiras de acordo com o produto de interesse.

Relacionado aos meios de culturas mostrados, o meio proposto com biomassa de *G. birdiae* como fonte de nutrientes mostrou-se um bom meio para o crescimento microbiano e produção de enzima agarolítica por GB002. O tratamento térmico de pasteurização foi eficiente para a diminuição da carga microbiana presente na matéria prima o que representa uma diminuição da no custo da energia e equipamentos em comparação aos meios de cultura esterilizados por autoclavagem (121 °C por 15 min).

Foi possível, então, com esse trabalho o desenvolvimento de um bioprocessos simples, porém eficiente, para a produção de enzimas agarolíticas utilizando *G. birdiae* como substrato.

## 5 CONCLUSÃO

Cinco microrganismos agarolíticos foram isolados a partir da microbiota associada à macroalga *Gracilaria birdiae* e apenas um (GB002) foi selecionado para desenvolvimento de um bioprocesso, por apresentar o crescimento rápido em faixas de temperaturas mesófilas, produzir e secretar enzimas agarolítica para o meio de cultivo. Sua curva de crescimento mostra uma fase *lag* baixa, fase *log* que se estende aproximadamente de 2 a 8 h e fase estacionária até 24 h. Com uma fermentação descontínua para produção de um extrato agarolítico, em meio de cultura composto pela biomassa algácea, houve a produção de um extrato proteico com atividade agarolítica ( $0,67 \pm 0,02 \text{ U mL}^{-1}$  após concentração) além de mostrar uma proteína de aproximadamente 44 kDa, revelando a atividade por zimografia. Isso mostra a viabilidade do processo produtivo de uma enzima agarolítica utilizando a biomassa de *G. birdiae* como substrato em um meio de cultivo relativamente simples.

## 6 PERSPECTIVAS

- Identificação molecular da bactéria GB002;
- Otimização do meio de cultivo pasteurizado visando um alto rendimento enzimático em meio mais econômico;
- Prospectar outras enzimas e/ou biomoléculas de interesse (celulases, por exemplo) de GB002;
- Estudo da cinética de produção do biofilme bem como sua composição;
- Purificação enzimática através de pelo menos dois métodos diferentes;
- Estudo das propriedades enzimáticas (faixa de pH, salinidade,  $K_m$ ,  $V_{max}$ );
- Perfil e cinética de hidrólise da agarose na geração de oligossacarídeos com tamanhos de interesse;

## REFERÊNCIAS

- A&B PROCESS SYSTEMS. **Pasteurization and the HTST Process**. Disponível em: <<http://www.abprocess.com/literature/white-papers/pasteurization-and-the-htst-process/>>. Acesso em: 10 jun. 2018.
- AGUILERA-MORALES, M. et al. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha spp.* as a potential food source. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 1, p. 79–88, 2005.
- ALLOUCH, J. et al. Parallel substrate binding sites in a beta-agarase suggest a novel mode of action on double-helical agarose. **Structure**, v. 12, n. 4, p. 623–632, 2004.
- AOKI, T.; ARAKI, T.; KITAMIKADO, M. Purification and characterization of a novel  $\beta$ -agarase from *Vibrio* sp. AP-2. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, n. 2, p. 461–465, 1990.
- ARAKI, C. Structure of the Agarose Constituent of Agar-agar. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 29, p. 543–544, 1956.
- ARMISEN, R.; GALATAS, F. Production, properties and uses of agar. In: MCHUGH, D. J. (Ed.). **Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds, FAO Fisheries Technical Paper**. 281. ed. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1987. p. 1–57.
- ARMISEN, R.; GALATAS, F.; HISPANAGAR, S. A. Agar. **Handbook of Hydrocolloids: Second Edition**, p. 82–107, 2009.
- BERTASA, M. et al. Cleaning materials: A compositional multi-analytical characterization of commercial agar powders. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 125, p. 310–317, 2017.
- BINDELS, L. B. et al. Opinion: Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, p. 303–310, 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRITANNICA, T. E. OF E. **Enzyme** Encyclopædia Britannica, inc., , 2018. (Nota técnica).
- BROWN, J. H. et al. Toward a metabolic theory of ecology. **Ecology**, v. 85, n. 7, p. 1771–1789, 2004.
- CARDOZO, K. H. M. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 146, p. 60–78, 2007.
- CARINI, P. et al. Nutrient requirements for growth of the extreme oligotroph “*Candidatus Pelagibacter ubique*” HTCC1062 on a defined medium. **ISME Journal**, v. 7, n. 3, p. 592–602, 2013.

- CHEN, H. et al. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of agaro-oligosaccharides in vitro and in vivo. **Nutrition journal**, v. 5, n. 1, p. 31, 2006.
- CHO, J. et al. Cultivation and Growth Characteristics of a Diverse Group of Oligotrophic Marine Gammaproteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 432-440, 2004.
- CORREC, G. et al. Structural analysis of the degradation products of porphyran digested by *Zobellia galactanivorans*  $\beta$ -porphyranase A. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 277–283, 2011.
- DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853–859, 1995.
- DAWCZYNSKI, C.; SCHUBERT, R.; JAHREIS, G. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 891–899, 2007.
- DER MEULEN, H. J. VAN; HARDER, W. Production and characterization of the agarase of *Cytoplaga flevensis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 41, n. 4, p. 431–447, 1975.
- ENOKI, T. et al. Oligosaccharides from Agar Inhibit Pro-Inflammatory Mediator Release by Inducing Heme Oxygenase 1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, n. 4, p. 766–770, 2010.
- FU, X. T.; KIM, S. M. Agarase: Review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. **Marine Drugs**, v. 8, n. 1, p. 200–218, 2010.
- FU, X. T.; LIN, H.; KIM, S. M. Optimization of medium composition and culture conditions for agarase production by *Agarivorans albus* YKW-34. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1158–1163, 2009.
- FURUSAWA, G. et al. Agarolytic bacterium *Persicobacter* sp. CCB-QB2 exhibited a diauxic growth involving galactose utilization pathway. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2017.
- GAO, K.; MCKINLEY, K. R. Use of macroalgae for marine biomass production and CO<sub>2</sub> remediation: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 1, p. 45–60, 1994.
- GIORDANO, A. et al. Marine glycosyl hydrolases in the hydrolysis and synthesis of oligosaccharides. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 511-530, 2006.
- GOLD, P. Use of a novel agarose gel-digesting enzyme for easy and rapid purification of PCR-amplified DNA for sequencing. **BioTechniques**, v. 13, n. 1, p. 132–134, 1992.
- GRAM, H. C. Gram staining. **Fortschritte der Medicin**, v. 2, p. 185–189, 1884.
- GRESSLER, V. et al. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 585–590, 2010.
- GUPTA, V. et al. Optimization of protoplast yields from the red algae *Gracilaria dura* (C.

Agardh) J. Agardh and *G. verrucosa* (Huds.) Papenfuss. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 2, p. 209–218, 2011.

HA, S. C. et al. Crystal structure of a key enzyme in the agarolytic pathway,  $\alpha$ -neoagarobiose hydrolase from *Saccharophagus degradans* 2-40. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 412, n. 2, p. 238–244, 2011.

HEHEMANN, J. H. et al. Biochemical and structural characterization of the complex agarolytic enzyme system from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 36, p. 30571–30584, 2012.

HIGASHIMURA, Y. et al. Oligosaccharides from agar inhibit murine intestinal inflammation through the induction of heme oxygenase-1 expression. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 8, p. 897–909, 2013.

HIGASHIMURA, Y. et al. Protective effect of agaro-oligosaccharides on gut dysbiosis and colon tumorigenesis in high-fat diet-fed mice. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 310, n. 6, p. G367–G375, 2016.

HOBEN, H. J.; SOMASEGARAN, P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1246–1247, 1982.

HU, B. et al. Prebiotic effects of neoagaro-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. **Anaerobe**, v. 12, n. 5–6, p. 260–266, 2006.

HWANG, H. J. et al. Fermentation of seaweed sugars by *Lactobacillus* species and the potential of seaweed as a biomass feedstock. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 6, p. 1231–1239, 2011.

IDFA. **International Dairy Foods Association**. Disponível em: <<https://www.idfa.org/news-views/media-kits/milk/pasteurization>>. Acesso em: 8 jun. 2018.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 468–482, 2011.

JAM, M. et al. The endo- $\beta$ -agarases AgaA and AgaB from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans* : two paralogue enzymes with different molecular organizations and catalytic behaviours. **Biochemical Journal**, v. 385, n. 3, p. 703–713, 2005.

JANG, M. K. et al. Purification and characterization of neoagarotetraose from hydrolyzed agar. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 10, p. 1197–1200, 2009.

JOHN, R. P. et al. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011.

JUNG, S. et al. Biochemical characterization of a novel cold-adapted GH39  $\beta$ -agarase, AgaJ9, from an agar-degrading marine bacterium *Gayadomonas joobiniege* G7. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 5, p. 1965–1974, 2017.

- KIM, H. T. et al. High temperature and low acid pretreatment and agarase treatment of agarose for the production of sugar and ethanol from red seaweed biomass. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 582–587, 2013.
- KOBAYASHI, R. et al. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 162–163, 1997.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LAKSHMIKANTH, M. et al. Optimization of culture conditions for the production of extracellular agarases from newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* AG LSL-11. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 531–537, 2006a.
- LAKSHMIKANTH, M. et al. Extracellular  $\beta$ -agarase LSL-1 producing neoagarobiose from a newly isolated agar-liquefying soil bacterium, *Acinetobacter* sp., AG LSL-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1087–1094, 2006b.
- LI, J. et al. A simple method of preparing diverse neoagaro-oligosaccharides with  $\beta$ -agarase. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 8, p. 1030–1033, 2007.
- LI, M. et al. Isolation and characterization of an Agaro-Oligosaccharide (AO)-hydrolyzing bacterium from the gut microflora of chinese individuals. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.
- LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, 2014.
- MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms, 13th Edition**. Pearson, 2017.
- MAIDA, I. et al. Draft Genome Sequence of the Fast-Growing Bacterium *Vibrio natriegens* Strain DSMZ 759. **Genome Announcements**, v. 1, n. 4, p. e00648-13, 2013.
- MARTÍNEZ-CÁNOVAS, M. J. et al. *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 733–737, 2004.
- MICHEL, G. et al. Bioconversion of red seaweed galactans: A focus on bacterial agarases and carrageenases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 1, p. 23–33, 2006.
- MICHEL, G.; CZJZEK, M. Polysaccharide-degrading enzymes from marine bacteria. In: **Marine Enzymes for Biocatalysis**. 2013. p. 429-464.
- MORRICE, L. M. et al.  $\beta$ -agarases I and II from *Pseudomonas atlantica* purifications and some properties. **European Journal of Biochemistry**, v. 558, p. 553–558, 1983a.
- NAJAFPOUR, G. D. Growth Kinetics. In: **Biochemical Engineering and Biotechnology**. Second ed. Elsevier B.V., 2015. p. 127–192.
- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi Method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 03, n. 2, p. 375–380, 1944.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 52–68, 2011.

Nomenclature Committee Of The International Union Of Biochemistry: Units of enzyme activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 97, p. 319–320, 1979.

ORTIZ, J. et al. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 98–104, 2006.

PANE, L. et al. Viability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* grown free and immobilized in alginate beads. **Aquaculture International**, v. 6, n. 6, p. 411–420, 1998.

PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, v. 41, n. 4, p. 389–396, 2002.

POTIN, P. et al. Purification and characterization of the  $\alpha$ -agarase from *Alteromonas agarlyticus* (Cataldi) comb. nov., strain GJ1B. **European Journal of Biochemistry**, v. 214, n. 2, p. 599–607, 1993.

RAJAN, S. S. et al. Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD<sup>+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-dependent phospho- $\alpha$ -glucosidase from *Bacillus subtilis*. **Structure**, v. 12, n. 9, p. 1619–1629, 2004.

RAPPÉ, M. S. et al. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 630–633, 2002.

SHIEH, W. Y.; SIMIDU, U.; MARUYAMA, Y. Nitrogen Fixation by Marine Agar-degrading Bacteria. **Microbiology**, v. 134, p. 1821–1825, 1988.

SHULER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess engineering: Basic concepts. **Journal of Controlled Release**, p. 293, 2002.

SORKHOH, N. A. et al. Agarolytic bacteria with hydrocarbon-utilization potential in fouling material from the Arabian Gulf coast. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 7, p. 554–559, 2010.

SUBHADRA, B.; EDWARDS, M. An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in United States. **Energy Policy**, v. 38, n. 9, p. 4897–4902, 2010.

SUGANO, Y. et al. Purification and Characterization of a New Agarase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain JT0107. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1549–1554, 1993.

TERWISSCHA VAN SCHELTINGA, A. C. et al. Stereochemistry of Chitin Hydrolysis by a Plant Chitinase/Lysozyme and X-ray Structure of a Complex with Allosamidin: Evidence for Substrate Assisted Catalysis. **Biochemistry**, v. 34, n. 48, p. 15619–15623, 1995.

TRINCONE, A. Potential biocatalysts originating from sea environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 3–4, p. 241–256, 2010.

TRINCONE, A. Update on Marine Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes : Biotechnological Applications. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 901, 2018.

VAN DER MEULEN, H. J.; HARDER, W.; VELDKAMP, H. Isolation and characterization of *Cytophaga flevensis* sp. nov., a new agarolytic flexibacterium. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 40, n. 3, p. 329–346, 1974.

WACKETT, L. P. Novel biocatalysis by database mining. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 280–284, 2004.

WANG, J. et al. Anti-oxidation of agar oligosaccharides produced by agarase from a marine bacterium. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 5, p. 333–340, 2004.

WANG, L. et al. Comparative research on the structures and physical-chemical properties of agars from several agarophyta. **Oceanologia et Limnologia Sinica**, v. 32, n. 6, p. 658–664, 2001.

WARGACKI, A. J. et al. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. **Science**, v. 335, n. 6066, p. 308–313, 2012.

WU, S. C.; PAN, C. L. Preparation of algal-oligosaccharide mixtures by bacterial agarases and their antioxidative properties. **Fisheries Science**, v. 70, n. 6, p. 1164–1173, 2004.

WU, S. C.; WEN, T. N.; PAN, C. L. Algal-oligosaccharide-lysates prepared by two bacterial agarases stepwise hydrolyzed and their anti-oxidative properties. **Fisheries Science**, v. 71, n. 5, p. 1149–1159, 2005.

YUN, E. J. et al. Enzymatic production of 3,6-anhydro-l-galactose from agarose and its purification and in vitro skin whitening and anti-inflammatory activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 7, p. 2961–2970, 2013.

YUN, E. J. et al. 3,6-Anhydro-L-galactose, a rare sugar from agar, a new anticariogenic sugar to replace xylitol. **Food Chemistry**, v. 221, p. 976–983, 2017.

YUN, E. J.; YU, S.; KIM, K. H. Current knowledge on agarolytic enzymes and the industrial potential of agar-derived sugars. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 14, p. 5581–5589, 2017.