



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Cultivo Mixotrófico da Microalga *Chlorella vulgaris* em Diferentes Fontes de Carboidratos e sua Potencial Produção de $\beta$ – galactosidase

**José Noé da Silva Júnior<sup>1</sup>, Ezequiel Leandro Júnior<sup>1</sup>, Raquel Pedrosa Bezerra<sup>1</sup>, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares<sup>1</sup>, Elaine Cristina da Silva<sup>1</sup>, Rebeca Gonçalves de Melo<sup>1</sup>, Daniela de Araújo Viana Marques<sup>2</sup>, Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal  
– Recife – PE - E-mail: noezinhojunior@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade de Pernambuco – Campus Serra Talhada -  
Serra Talhada – PE.

#### RESUMO

*Microalgas são micro-organismos fotossintetizantes, podendo o crescimento destas ser estimulado quando cultivadas mixotroficamente. A adição de fontes de carbono orgânico no meio de cultura pode proporcionar altos valores de concentrações celulares. A biomassa das microalgas são reconhecidas por serem substâncias bioativas, sendo cada vez mais utilizadas na Biotecnologia. Chlorella vulgaris é uma microalga com variedade de atividades biológicas, no entanto, poucos estudos relatam a aplicação de sua biomassa na produção de  $\beta$ -galactosidase. Esta enzima é de alto valor industrial utilizada na hidrólise da lactose presente no leite. Este trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento celular de Chlorella vulgaris em cultivos autotrófico e mixotrófico suplementados com glicose, lactose e galactose, bem como avaliar a produção de  $\beta$ -galactosidase pela biomassa. C. vulgaris foi cultivada autotroficamente e em três condições diferentes de cultivos mixotróficos com suplementação de 10g/L de lactose, 5g/L de galactose, ou 5g/L de glicose. No final do cultivo, a biomassa foi utilizada para a determinação da atividade  $\beta$ -galactosidase. Os resultados demonstraram que o cultivo autotrófico apresentou uma concentração celular máxima de 800 mg/L e o mixotrófico com glicose, um valor de 600 mg/L, sendo o maior valor dentre os cultivos mixotróficos avaliados. No entanto, a atividade da  $\beta$ -galactosidase de 0,050 U/mL foi maior na biomassa cultivada na presença de lactose, indicando ser indutor enzimático.*

Palavras-chave:  $\beta$  -galactosidase, *Chlorella vulgaris*, atividade enzimática.

#### INTRODUÇÃO

Microalgas são reconhecidas por serem ricas em substâncias bioativas com aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (PRADHAN *et al.*, 2012). Dentre as microalgas, destaca-se a *Chlorella vulgaris* por ser facilmente cultivada e apresentar biomassa rica em vitaminas, polissacarídeos, proteínas, lipídeos e outras substâncias de interesse comercial (MOHAN *et al.*, 2009). Adicionalmente, esses biocompostos podem apresentar atividades antioxidantes, antibacterianas, anti-inflamatórias e anti-câncer (PLAZA, *et al.*, 2012).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Poucos dados na literatura relatam sobre a produção enzimática a partir de microalgas. A  $\beta$ -galactosidase é enzima de alto valor na indústria alimentícia por ser utilizada na hidrólise da lactose presente no leite aliviando os problemas associados com a intolerância à lactose (KIM & RAJAGOPAL, 2000).  $\beta$ -galactosidase encontra-se distribuída entre espécies animais, assim como em diversos micro-organismos, como bactérias, especialmente as ácido-láticas (AKOLKAR, SAJGURE & LELE, 2005).

Para a viabilização comercial dos biocompostos provenientes de microalgas, o cultivo deve ser de baixo custo e proporcional alta concentração celular. Pesquisas têm sido realizadas utilizando diferentes fontes de carbono orgânico em cultivo mixotrófico. Miao et al (2016) relata que *C. vulgaris* cresce mixotroficamente em resíduo doméstico sintético, obtendo altas concentrações celulares. Abreu et al (2012) relata que soro de queijo é uma fonte promissora para cultivo mixotrófico de *C. vulgaris*.

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento celular e produção de  $\beta$ -galactosidase em cultivos autotrófico e mixotrófico com glicose, lactose ou galactose da *Chlorella vulgaris*.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Cultivo da microalga

O cultivo de *Chlorella vulgaris* foi realizado com o meio de cultura padrão Bold's Basal ou neste acrescentado dos carboidratos lactose (10 g/L), galactose (5 g/L) ou Glicose (5 g/L) em frascos de Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultura. Os cultivos, em duplicatas, foram realizados a 30°C, intensidade luminosa de 72  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e aeração constante. No final dos cultivos, a biomassa foi centrifugada à 15000 rpm, durante 10 minutos, à 4°C e, em seguida, liofilizada.

#### - Preparação dos extratos

A biomassa seca de *Chlorella vulgaris* foi ressuspensa em tampão fosfato de s\u00f3dio, 1M, pH 7, na concentra\u00e7\u00e3o de 100 mg/mL. A suspens\u00e3o foi sonicada, em banho de gelo, totalizando 20 pulsos de um minuto, tendo intervalo de um minuto entre cada pulso. Em seguida, a suspens\u00e3o foi centrifugada a 8000 rpm, 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante, denominado de extrato celular foi utilizado para a realiza\u00e7\u00e3o do ensaio de atividade enzim\u00e1tica.

#### - Determina\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o celular

A concentra\u00e7\u00e3o celular foi determinada espectrofotometricamente \u00e0 680 nm, utilizando uma curva de calibra\u00e7\u00e3o cuja densidade \u00f3ptica (DO) foi correlacionada com a massa seca.

#### - Atividade enzim\u00e1tica

O substrato utilizado foi o nitroferol-  $\beta$ -D-galactopiranos\u00eddeo (ONPG – Sigma Co, USA), dissolvido em 0,05 M de tamp\u00e3o fosfato de s\u00f3dio pH 7.0. O ensaio de atividade enzim\u00e1tica foi realizado em placa de 96 po\u00e7os, no qual 50  $\mu\text{L}$  de substrato foi adicionado a 50  $\mu\text{L}$  do extrato da microalga, sendo a placa incubada a 37°C por 30 minutos. Ap\u00f3s esse per\u00edodo, a rea\u00e7\u00e3o foi interrompida atrav\u00e9s da adi\u00e7\u00e3o de 100  $\mu\text{L}$  de carbonato de s\u00f3dio e lida por espectrofotometria



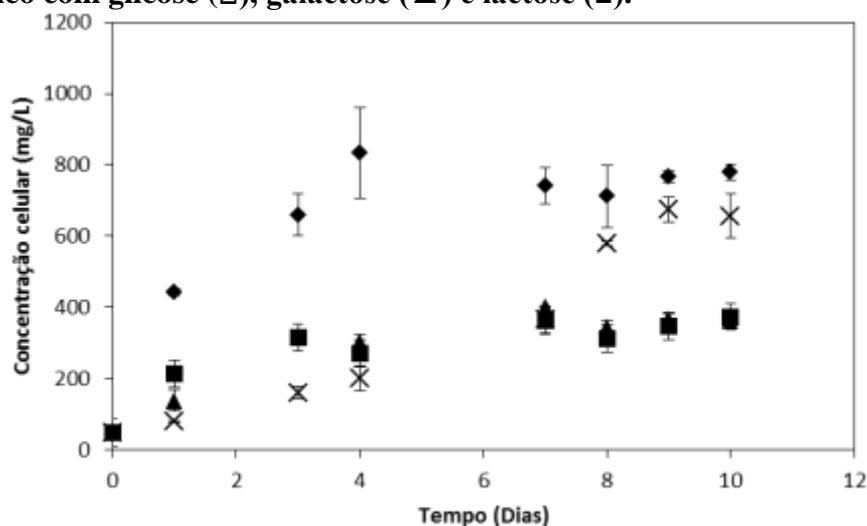
## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

à 415 nm. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{M}$  de o-nitrofenol por minuto.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados demonstraram que *Chlorella vulgaris* apresentou crescimento celular quando cultivada em meio de cultura padrão e suplementados com os carboidratos glicose, galactose e lactose (Gráfico 1).

**Gráfico 1. Concentração celular de *Chlorella vulgaris* em cultivos autotrófico (□) e mixotrófico com glicose (□), galactose (▲) e lactose (■).**



Pela análise do gráfico, observa-se que o cultivo autotrófico apresentou o maior crescimento celular, atingindo valores próximos a 800 mg/L, após 4 dias. Em relação aos cultivos mixotróficos, a adição de glicose proporcionou um maior crescimento celular, apresentando valores de 600 mg/L em 10 dias. A adição de galactose ou lactose apresentou uma concentração celular de aproximadamente 400 mg/L em 3 dias.

As atividades enzimáticas de  $\beta$ -galactosidase intracelular da *C. vulgaris* cultivada em diferentes carboidratos estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1. Concentração de atividade enzimática (U/mL) nos extratos de *Chlorella vulgaris* suplementados com diferentes açúcares.**

Carboidratos	GLICOSE	GALACTOSE	LACTOSE
Atividade enzimática (U/mL)	$0,044 \pm 0,016^a$	$0,043 \pm 0,021^a$	$0,052 \pm 0,019^b$

O extrato de *C. vulgaris* cultivado na presença de lactose apresentou maior atividade enzimática, de  $0,050 \pm 0,001$  U/mL, quando comparado aos extratos de *C. vulgaris* cultivados na presença de glicose e galactose. Isso demonstra que a presença da lactose induz a *C. vulgaris* a produzir  $\beta$ -galactosidase.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

As atividades  $\beta$ -galactosidase obtidas por *C. vulgaris* são menores que as atividades relatadas por Alazzeh *et al.*, (2009) que, ao avaliarem a influência de carboidratos e proteínas na indução de alfa e  $\beta$ -galactosidase em *Lactobacillus reuteri*, obtiveram atividades de 30 U/mL com a lactose e de 20 U/mL com a galactose.  $\beta$ -galactosidase é uma enzima essencial ao funcionamento de bactérias ácido-láticas, como *Lactobacillus reuteri*, enquanto que a *Chlorella vulgaris* não necessita dessa enzima para o seu crescimento.

Logo, os resultados encontrados demonstram que novas fontes alternativas, e de baixo custo, podem ser utilizadas para produção  $\beta$ -galactosidase visando aplicações industriais.

### CONCLUSÕES

*Chlorella vulgaris* cresceu na presença das glicose, galactose e lactose, obtendo maiores valores de concentração celular na presença de glicose. Por outro lado, a biomassa cultivada na presença de lactose obteve a maior produção da  $\beta$ -galactosidase. No entanto, testes adicionais precisam ser realizados para comprovar a atividade da  $\beta$ -galactosidase produzida por *Chlorella vulgaris*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu AP, Fernandes B, Vicente AA, Teixeira J, Dragone G. 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *J. Biol Chem* 118: 61-66.
- Alazzeh AY, Ibrahim SA, Song D, Shahbazi A, AbuGhazaleh AA. 2009. Carbohydrate and protein sources influence the induction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidases in *Lactobacillus reuteri*. *J. Food Chem* 117 : 654 – 659.
- Akolkar SK, Sajgure A, Lele SS. 2005. Lactase production from *Lactobacillus acidophilus*. *W. J. of Microb and Biotech* 21 : 1119–1122.
- Kim JW, Rajagopal SN. 2000. Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *F. Microb* 45: 29–34.
- Miao M, Yao X, Shu L, Yan Y, Wang Z, Li N, Cui X, Lin Y, Kong Q. 2016. Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with synthetic domestic wastewater. *Int Biodet & Biodeg* 1-6.
- Mohan N, Hanumantha Rao P, Ranjith Kumar R, Sivasankaran S, Sivasubramanian V. 2009. Studies on mass cultivation of *Chlorella vulgaris* and effective harvesting of biomass by lowcost methods. *J. of Algal Biomass Ut* 1 : 29 – 39.
- Pereira-Rodríguez Á, Fernández-Leiro R, González-Siso MI, Cerdán ME, Becerra M, SanzAparicio J. 2012. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* galactosidase. *J. Struct. Biol.* 177 : 392–401.
- Plaza M, Santoyo S, Jaime L, Avalo B, Cifuentes A, Reglero G, Reina G, G-B Señoráns FJ Ibáñez. 2012. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT- F. S. and Tech* 6 : 245-253.