

Produção da Enzima Anidrase Carbônica e de Ficobiliproteínas pela Microalga *Spirulina*

Marina C. A. de Amarante, Sibeles Santos Fernandes, Joana da Costa Ores, Susana Juliano Kalil

Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos
Caixa Postal – CEP 96203-900 – Rio Grande – Rio Grande do Sul
e-mail: marinacaamarante@gmail.com

RESUMO

*A anidrase carbônica é uma metaloenzima que catalisa a hidratação reversível do CO₂ em bicarbonato com alta eficiência, sendo aplicada em sistemas de captura enzimática. A biomassa microalgal apresenta-se como uma fonte viável de obtenção desta enzima. As cianobactérias são, também, fontes potenciais de ficobiliproteínas, biocorantes naturais. Este trabalho apresenta a produção da enzima anidrase carbônica e de ficobiliproteínas pela microalga *Spirulina platensis* LEB 52. A alga foi cultivada em meio Zarrouk, 25 °C, 3000 lx com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro e aeração constante. Após o rompimento celular, as suspensões foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para determinar a atividade enzimática e as ficobiliproteínas. A microalga apresentou potencial para produção da enzima anidrase carbônica, assim como para extração dos biocorantes ficocianina e aloficocianina, com uma produção menor de ficoeritrina. Foi obtida uma atividade máxima de 41,6 U/L com uma produtividade máxima de biomassa de 0,060 g/L/dia.*

Palavras-chave: cianobactéria, anidrase carbônica, biocorantes, captura enzimática.

INTRODUÇÃO

Atualmente existe uma grande procura por soluções alternativas para o acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera terrestre, um dos gases causadores do efeito estufa. Dentre as estratégias que podem ser utilizadas encontra-se o sequestro ou captura de CO₂ utilizando sistemas biológicos, que tem como princípio reações que já ocorrem normalmente em organismos vivos¹.

A anidrase carbônica é uma metaloenzima que tem sido amplamente estudada para aplicação nestes sistemas^{2,3,4}, pois catalisa a hidratação reversível do CO₂ em bicarbonato com alta eficiência⁵. Porém, a viabilidade do processo de captura enzimática reside inicialmente na obtenção da enzima de fontes viáveis.

Esta enzima pode ser produzida por diversos organismos, pois desempenha papel fundamental em processos biológicos como fotossíntese e respiração⁶. Uma fonte potencialmente viável de obtenção desta enzima são as algas que por sua vez possuem grande importância industrial no momento. Cianobactérias e algas possuem, também, uma ampla variedade de componentes coloridos como carotenoides, clorofila e ficobiliproteínas⁷. Espécies do gênero *Spirulina* são fontes não dispendiosas de ficobiliproteínas⁸, além de possuir certificado GRAS (Generally Recognized as Safe), permitindo seu uso em alimentos.

O cultivo de microalgas apresenta algumas vantagens, como seu rápido crescimento, alta produção de biomassa, resistência a fatores ambientais extremos, assim como a possibilidade de cultivo em espaços pequenos⁹.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi o cultivo da microalga *Spirulina platensis* LEB 52 para obtenção de bioprodutos de interesse industrial. Foi investigada a produção da enzima anidrase carbônica e das ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina) ao longo do cultivo da cianobactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

A *Spirulina platensis* LEB 52, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica (FURG), foi cultivada em erlenmeyer de 1 L (ensaio em triplicata) com meio Zarrouk 20%¹⁰, adicionado de 20% de inóculo, incubados a 25 ± 1 °C, 3000 lx, fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro e aeração com injeção de ar estéril (0,5 vvm). Foi realizado um acompanhamento da concentração de biomassa, variação do pH, atividade enzimática e concentrações de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina. Como a enzima é intracelular, para o rompimento celular, foi utilizado um homogeneizador ultrassônico com frequência de 20 kHz por 4 minutos e concentração celular de 0,2 g/L. Após centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para medida da atividade e concentrações de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina. A atividade enzimática foi determinada utilizando como substrato o *p*-nitrofenil acetato¹¹, sendo uma unidade de atividade enzimática (U) definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio. A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 680 nm¹² e a determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um medidor de pH. As concentrações de ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina foram determinadas por leitura da densidade óptica a 620, 652 e 560 nm¹³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

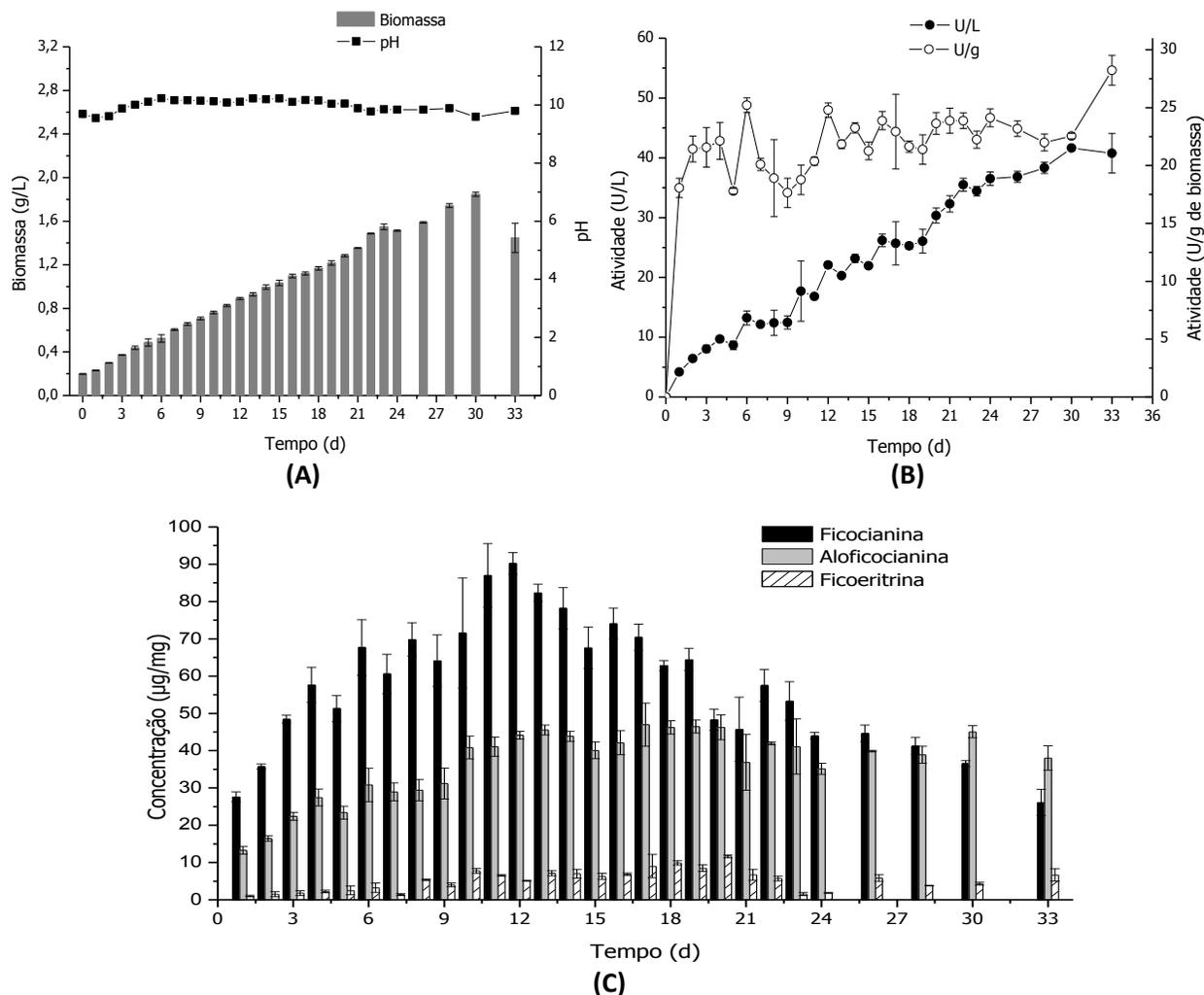
A Figura 1 apresenta os gráficos da produção da enzima e das ficobiliproteínas, bem como o crescimento celular e a variação do pH do meio. A concentração celular máxima de $1,84 \pm 0,02$ g/L foi alcançada em 30 dias de cultivo. Os parâmetros cinéticos velocidade específica máxima de crescimento e produtividade máxima alcançados foram $0,05 \pm 0,001$ 1/dia e $0,060 \pm 0,004$ g/L/dia, respectivamente. Observa-se que a microalga apresentou potencial para produção da enzima anidrase carbônica. Foi alcançada uma atividade enzimática máxima de $41,6 \pm 0,4$ U/L no 30º dia de cultivo e atividade volumétrica máxima de $28,2 \pm 1,3$ U/g no 33º dia. O pH permaneceu em torno de 10 ao longo de todo o cultivo, valor este favorável para a atuação e produção da enzima.

As maiores concentrações de ficocianina ($90,23 \pm 2,90$ μ g/mg) e aloficocianina ($47,00 \pm 5,78$ μ g/mg) foram obtidas no 12º dia e no 17º dia de cultivo, respectivamente. Foram produzidas baixas quantidades de ficoeritrina pela *Spirulina*, em comparação com as demais ficobiliproteínas, chegando ao máximo de $11,69 \pm 0,37$ μ g/mg no 20º dia de cultivo.

A atividade enzimática (U/L) aumentou durante o crescimento da *Spirulina*, ao contrário da atividade volumétrica (U/g), que permaneceu constante. Sharma et al.¹⁴ investigaram a produção da anidrase carbônica por um grupo diversificado de bactérias. Dentre os micro-organismos avaliados, o perfil de produção da enzima pela bactéria *Enterobacter gergoviae* manteve-se constante ao longo do cultivo, comportamento semelhante ao da microalga estudada

neste trabalho. Este perfil também foi observado com a microalga marinha *Tetraselmis gracilis* estudada por Rigobello-Masini, Masini e Aidar¹⁵.

Figura 1. Crescimento celular e pH (A), atividade enzimática (B) e concentração de ficobiliproteínas (C) ao longo do cultivo de *Spirulina* LEB 52 em meio Zarrouk.



CONCLUSÕES

A microalga *Spirulina* LEB 52 mostrou potencial para produção da anidrase carbônica, bem como ficobiliproteínas, obtendo-se durante o cultivo uma atividade máxima de 41,62 U/L e concentrações máximas de ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina de 90,23, 47,00 e 11,69 µg/mg, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- (1) LAL, R. Carbon sequestration. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 363, p. 815-830, August 2008.
- (2) ORES, J. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon dioxide. **Chemosphere**, v. 88, p. 255-259, 2012.
- (3) LI, L.; FU, M. L.; ZHAO, Y. H.; ZHU, Y. T. Characterization of carbonic anhydrase II from *Chlorella vulgaris* in bio-CO₂ capture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 4227-4232, 2012.
- (4) DILMORE, R.; GRIFFITH, C.; LIU, Z.; SOONG, Y.; HEDGES, S. W.; KOEPEL, R.; ATAANI, M. Carbonic anhydrase-facilitated CO₂ absorption with polyacrylamide buffering bead capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 3, p. 401-410, 2009.
- (5) NISHITA, T.; TAKAHASHI, M.; KASUYA, T.; MATSUI, K.; ICHIHARA, N.; MURAKAMI, M.; ASARI, M. Measurement of erythrocyte carbonic anhydrase isozymes (CA-I and CA-II) in racehorses and riding horses. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, p. 63-67, 2005.
- (6) HEWETT-EMMETT, D.; TASHIAN, R. E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 5, n. 1, p. 50-77, 1996.
- (7) SARADA, R.; PILLAI, M. G. E RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 795-801, 1999.
- (8) MINKOVA, K.M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M.I.; FOURNADJIEVA, S.T.; ANTOVA, R.E. E BUSHEVA, M. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 102, p. 55-59, 2003.
- (9) BORGES, L.; FARIA, B. M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: Primeiros passos para o desenvolvimento de um "Mecanismo de Desenvolvimento Limpo". **Atlântica**, v. 29, n. 1, p. 35-46, 2007.
- (10) ZARROUK, C. Contribution to the study of a Cyanophyceae. **Influence of various physical and chemical factors on growth and photosynthesis of *Spirulina maxima***. Ph.D. thesis, University of Paris; 1966.
- (11) POKER, Y.; STONE, J.T. "The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. **Biochemistry**, v. 6, p. 668-678, March 1976.
- (12) COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.
- (13) BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complimentary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419-435, 1973.
- (14) SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A.; PUJARI, R.; SHRIVASTAVA, A. Characterization of carbonic anhydrase from diversified genus for biomimetic carbon-dioxide sequestration. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 365-371, 2008.
- (15) RIGOBELLO-MASINI, M.; MASINI, J. C.; AIDAR, E. The profiles of nitrate reductase and carbonic anhydrase activity in batch cultivation of the marine microalgae *Tetraselmis gracilis* growing under different aeration conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 57, p. 18-25, 2006.