



AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FICOCIANINA POR *Anabaena variabilis* UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO ORGÂNICO

W. R. CUNHA¹, T. A. TEIXEIRA², A. G. COTTAS² e J. S. FERREIRA²

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia

² Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química

E-mail para contato: warlleyrcunha@gmail.com

RESUMO – A ficocianina (FC) é uma das ficobiliproteínas, pigmentos encontrados em cianobactérias, que podem ser empregadas como corantes naturais, antioxidantes e marcadores fluorescentes. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo basal (BG11₀) da cianobactéria *Anabaena variabilis* suplementando 1 g/L da fonte de carbono orgânico, sendo testadas: glicose, lactose, frutose, sacarose e galactose, visando aumentar a produção de biomassa e de FC. O meio controle, utilizado no cultivo da cianobactéria produziu 1,61 µg FC mL⁻¹ em 8 dias, enquanto os meios contendo glicose e galactose apresentaram um aumento de cerca de 6 vezes com concentrações de 10,26 µg FC mL⁻¹ e 9,36 µg FC mL⁻¹, respectivamente. A produção de FC sofreu uma influência menor ao seu suplementar o meio com lactose, com aumento de 3 vezes em relação ao meio basal (5,31 µg FC mL⁻¹). Os meios contendo frutose e sacarose não teve efeito sobre a produção de FC. Todos os meios suplementados com os açúcares apresentaram uma produção maior de biomassa com relação ao meio basal, com destaque para o meio com glicose.

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são organismos fotossintéticos e produtores de ampla variedade de metabólitos secundários com aplicação biotecnológica. Dentre estes metabólitos, destacam-se as ficobiliproteínas que representam 50% do total de proteína celular das cianobactérias e podem ser aplicadas como antioxidantes, anticâncer e anti-inflamatórios. Quantitativamente, a ficocianina (FC) é a ficobiliproteína mais abundante nas cianobactérias. A síntese deste composto bioativo pode ser avaliada com o intuito de aumentar sua produção em escala industrial, ao abordar parâmetros como luz, composição do meio, pH, temperatura e fotoperíodo (PAGELS et al, 2019, MANIRAFASHA et al.,2016).

Mais especificamente, com relação à composição, deve-se ressaltar que a fonte de carbono influencia na formação principalmente dos macronutrientes, como carboidratos, lipídeos e proteínas (MANIRAFASHA et al.,2016). Atualmente, o meio mais empregado para cultivo de biomassa e de ficobiliproteínas é o meio mineral BG11₀, constituindo um cultivo fotoautotrófico. No entanto, alguns pesquisadores têm estudado a influência de cultivos mixotróficos, em que a fonte de carbono é formada por substâncias minerais e orgânicas, de

modo a aumentar a produtividade de biomassa e produtos, como por exemplo as ficobiliproteínas (FBP), de forma mais eficiente (BORSARI et al., 2007; RIZZO et al., 2015).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo basal da cianobactéria *Anabaena variabilis* (BG11₀) por fontes de carbono orgânico, utilizando glicose, lactose, frutose, sacarose e galactose, visando aumentar a produção de biomassa e de ficocianina (FC).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A cepa de *Anabaena variabilis* ATCC 29413, cedida pelo Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas da FURG (Rio Grande, RS), foi cultivada em meio basal BG11₀ (JACINAVICIUS et al., 2013), em Erlenmeyers de 250 e 500 mL, a 30°C, luminosidade de 1.553 lux, com fotoperíodo de 12 h, em ambiente aeróbico e com repiques periódicos de 14 dias.

Essa cepa mantida em meio basal (BG11₀) foi utilizada como inóculo para os ensaios de avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono orgânico para sobre a produção de biomassa e ficocianina por fermentação. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL, com volume útil de 50 mL, com volume de inóculo de 20% (v/v) o que correspondeu a uma concentração celular inicial de 0,18 g/L. Foram preparados o meio basal sem adição de da fonte de carbono (controle) e com suplementação de 1 g/L de açúcar. Os açúcares testados foram: glicose, lactose, frutose, sacarose e galactose. Cada condição foi realizada em duplicata.

Foram avaliadas concentração celular em 2, 4, 6 e 8 dias de fermentação e síntese de ficocianina ao final de 8 dias do processo. A determinação da biomassa foi realizada por espectrofotometria (Shimadzu UV mini-1240) no comprimento de onda de 610 nm.

A quantificação dos açúcares foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho HPLC (High Performance Liquid Chromatography). A amostra foi filtrada em filtro 0,22 µm e injetada no cromatógrafo marca Shimadzu modelo LC-20A Pronience, equipado com coluna SUPELCOGEL C-610H e detector de índice de refração, com solução de ácido fosfórico (0,1 %) usada como fase móvel, sendo a vazão da bomba de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 32 °C e volume de injeção de 20 µL.

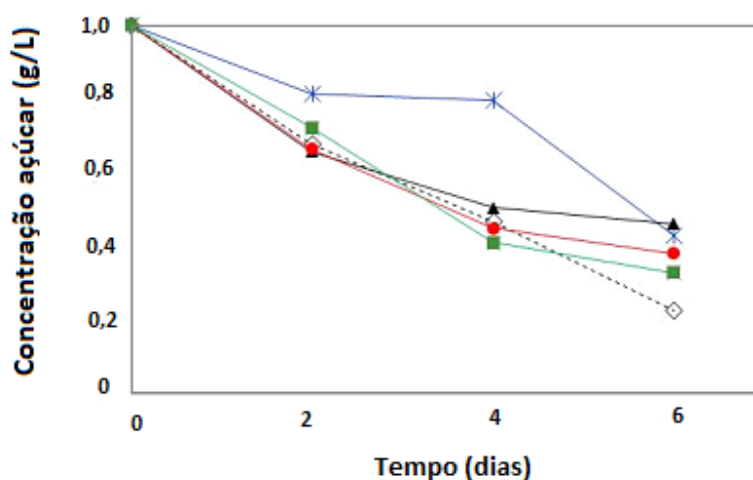
A extração de FC foi realizada por ciclos de congelamento e descongelamento combinados com ultrassom, sendo 5 ciclos de congelamento a -15°C por 1,5 h e descongelamento no banho ultrassônico a 25°C por 30 min (COTTAS, 2019). A concentração de cada FC (µg mL⁻¹) foi calculada de acordo com a Equação 1 (LIU et al., 2012):

$$[FC] = \frac{A_{615} - 0,474[A_{652}]}{5,34} \quad (1)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se pela Figura 1, o consumo das fontes de carbono nos diferentes meios de cultivo ao decorrer de 6 dias. Houve um consumo, nesta ordem crescente de 54% para lactose, 57% para glicose, 62% para sacarose, 67% para galactose e 77% para frutose, indicando a cianobactéria de *Anabaena variabilis* pode assimilar todas as fontes de carbono testadas.

Figura 1 – Consumo de fonte de carbono durante 6 dias no cultivo da *Anabaena variabilis*. Glicose 1 g/L (*), Lactose 1 g/L (▲), Frutose 1 g/L (◇), Sacarose 1 g/L (●), Galactose 1 g/L (■).



A variação da concentração de biomassa é apresentada na Figura 2. Verifica-se que, em todas condições de suplementação, houve aumento da concentração celular acima do observado para o meio controle, sendo a glicose com maior valor obtido (0,47 g/L), sendo 2 vezes maior que o meio controle. Deve-se ressaltar que a glicose não foi o açúcar mais consumido (Figura 1), mas sua conversão resultou em maior crescimento de biomassa.

Os dados do efeito da suplementação de açúcar ao meio basal (BG11₀) sobre a produção de ficocianina são mostrados na Figura 3.

Verifica-se que o cultivo da *Anabaena variabilis*, ao final de 8 dias, nos meios suplementados com glicose, lactose e galactose favoreceram a produção de FC atingindo teores acima do daquele observado para a condição controle. O teor de ficocianina nos meios glicose e galactose não apresentaram diferença significativa, tendo-se a concentração de $10,26 \pm 1,74 \mu\text{g FC mL}^{-1}$ e $9,36 \pm 0,19 \mu\text{g FC mL}^{-1}$, respectivamente, cerca de 6 vezes maior quando comparado ao meio controle. Para o meio contendo lactose, este aumento foi de 3 vezes, apresentando uma concentração de $5,31 \pm 2,00 \mu\text{g FC mL}^{-1}$, aproximadamente 3 vezes maior que o controle.

Figura 2 – Crescimento celular obtido dos cultivos de *Anabaena variabilis* utilizando meios com diferentes fontes de carbono com inóculo de 20% em 8 dias. Controle (○), Glicose 1 g/L (*), Lactose 1 g/L (▲), Frutose 1 g/L (◇), Sacarose 1 g/L (●), Galactose 1 g/L (■).

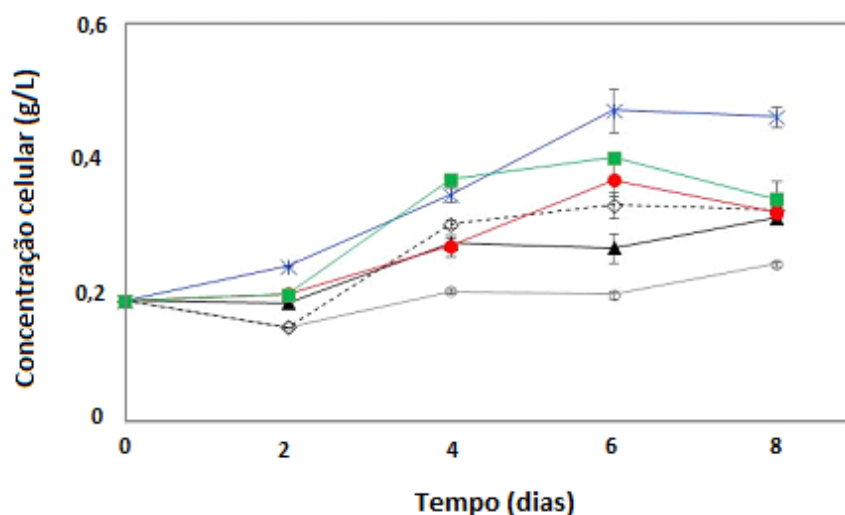
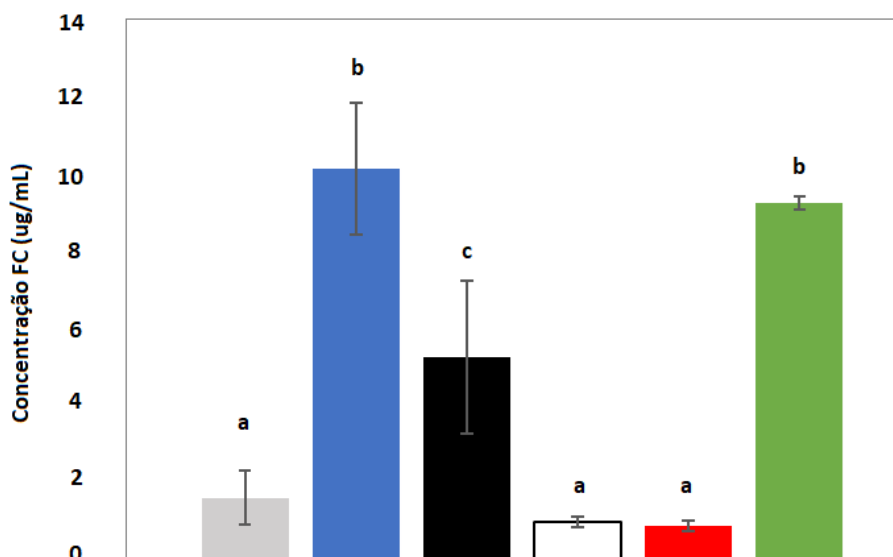


Figura 3 – Concentração de FC dos cultivos de *Anabaena variabilis* utilizando meios com diferentes fontes de carbono com inóculo de 20% em 8 dias. Controle (■), Glicose 1 g/L (■), Lactose 1 g/L (■), Frutose 1 g/L (□), Sacarose 1 g/L (■), Galactose 1 g/L (■). Letras diferentes entre as colunas representam diferença estatística do Teste Tukey com $p < 0,05$.



Os meios com adição de frutose e sacarose, não influenciaram significativamente na produção de FC ao final do experimento. Isso mostra que o consumo da fonte de carbono não indica uma maior produção de ficocianina (Figura 3) e produção de biomassa (Figura 2), uma vez que a frutose foi o açúcar mais consumido, indicando que diferentes rotas metabólicas foram utilizadas pela cianobactéria em função da fonte de carbono.



Segundo Khattar et al. (2015), o cultivo de *Anabaena fertilissima* em meio BG11₀ com suplementação de diferentes tipos de açúcares favoreceu a produção de FBP e apresentou melhores resultados para a produção de FC quando utilizado sacarose a 5 g/L. Ao comparar este resultado destes autores com o presente trabalho, observa-se que a espécie de cianobactéria também é uma variável a ser considerada na avaliação da produção de FC, sendo que as espécies podem ter metabolismos diferentes de acordo com a composição do meio

Estes dados de produção de FC com apenas uma variação, a fonte de carbono, é um passo para etapas futuras com a combinação e diversos fatores que influenciam a produção de ficocianina, tais como o pH do meio, suplementação de fonte de nitrogênio, açúcar e iluminação de culturas com diferentes cores de luz.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho indica que a *Anabaena variabilis* cultivada em diferentes meios sofre alteração no crescimento celular, na produção de ficobiliproteínas e na capacidade de assimilar açúcares distintos. Conclui-se que a melhor condição é o meio BG11₀ com suplementação de glicose, pois favoreceu a produção de FC (6 vezes) e o aumento da concentração celular (2 vezes) durante 8 dias.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio e incentivo à pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

BORSARI, R. R. J.; MORIOKA, L. R.; RIBEIRO, M. L. L.; BUZATO, J. B. Mixotrophic growth of *Nostoc sp.* on glucose, sucrose and sugarcane molasses for Phycobiliprotein production. *Acta Sci. Biol. Sci.*, v. 29 (1), p. 9-13, 2007.

COTTAS, A. G. Avaliação do processo de produção de ficobiliproteínas de cianobactérias e purificação por sistemas aquosos bifásicos. *Dissertação de Mestrado*. Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 2019.

JACINAVICIUS, F. R.; GAMA JUNIOR, W. A.; AZEVEDO, M. T. P.; SANTANNA, C. Manual para cultivo de cianobactérias. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2013.

KHATTAR, J. I. S., KAUR, S., KAUSHAL, S., SINGH, Y., SINGH, D. P., RANA, S., GULATI, A. Hyperproduction of phycobiliproteins by the cyanobacterium *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5 under optimized culture conditions. *Algal Res.*, v. 12, p. 463–469, 2015.

LIU, Y., FENG, Y., LUN, J. Aqueous two-phase countercurrent distribution for the separation of c-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. *Food Bioprocess*, v. 90(2), p. 111–117, 2012.



MANIRAFASHA, E., NDIKUBWIMANA, T., ZENG, X., LU, Y., JING, K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochem. Eng. J.*, v. 109, p. 282–296, 2016.

PAGELS, F., GUEDES, A. C., AMARO, H. M., KIJJOA, A., VASCONCELOS, V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. v. 37(3), p. 422-443, 2019.

RIZZO, R. F., SANTOS, B. DO N. C. DOS, CASTRO, G. F. P. DA S. DE, PASSOS, T. S., NASCIMENTO, M. DE A., GUERRA, H. D., LIMA-ARAÚJO, K. G. DE. Production of phycobiliproteins by *Arthrospira platensis* under different lightconditions for application in food products. *Food Sci. Technol. (Campinas)*, v. 35(2), p. 247–252, 2015.