

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR *Chlorella Minutissima* CULTIVADA COM PENTOSE COMO FONTE DE CARBONO

A. P. CASSURIAGA¹, B. C. FREITAS¹, E.G. MORAIS¹, G. A. PORCIÚNCULA¹, E. H. BRACHER¹, J. A. V. COSTA¹, D. I. P. ATALA²

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos

² British Petroleum Biofuels Brasil, São Paulo/ SP, Brasil.

E-mail para contato: jorgealbertovc@terra.com.br

RESUMO – Com a crescente necessidade de suprimento de energia através de fontes renováveis, as microalgas vem ganhando destaque por serem consideradas promissoras fontes de matéria-prima primária para produção de biocombustíveis como o bioetanol. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da biomassa de *Chlorella minutissima* para produção de bioetanol, quando cultivada utilizando pentoses como fonte de carbono. Para avaliar o crescimento da microalga foram realizados cultivos mixotróficos, utilizando meio Bristol's Modificado (MBM) com redução do componente nitrogenado (0,125 KNO₃) e adição de pentoses, utilizando fotobiorreatores tubulares verticais de 2 L. Com o uso de 19,16 mg.L⁻¹ de xilose e 0,89 mg.L⁻¹ de arabinose foi encontrado um teor de carboidratos de 66,4%, o que corresponde a uma produção teórica de bioetanol 502,39 L.t⁻¹ (tonelada de biomassa seca), podendo gerar 4.521,53 L.ha deste biocombustível anualmente.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são descendentes dos primeiros tipos de vida fotossintéticos. A mais de 3500 milhões de anos atrás o oxigênio da atmosfera era fornecido por cianobactérias e outras formas de vida. Desde então, as microalgas tem contribuído com o regulamento da biosfera do planeta. O uso de energia solar no cultivo de microalgas é eficiente, limpo, e de baixo custo. A biomassa das microalgas e seus produtos estão relacionados com muitas áreas de interesse geral, como a indústria de alimentos, fármacos, medicina e biocombustíveis (COSTA et al., 2012).

As condições de cultivo de microalgas podem ser alteradas para induzir a produção de maiores concentrações de substâncias de interesse como proteínas, pigmentos, ácidos graxos e carboidratos, por exemplo. Uma mesma espécie pode apresentar perfis químicos distintos de acordo com as condições de cultivo empregadas (LOURENÇO, 2006). Meios de cultura com fontes nutricionais alternativas para o cultivo de microalgas vêm sendo avaliados, como os que utilizam resíduos industriais como substrato (BERTOLDI et al., 2008).

Devido a grande necessidade energética global, baseado na instabilidade dos combustíveis fósseis e as preocupações ambientais, se torna necessário a busca por novas fontes de energia. Diversos recursos renováveis foram descobertos para atenuar as emissões de CO₂ de combustíveis

fósseis, uma das saídas é a produção de etanol a partir de açúcares de seis carbonos (MONONO, et al., 2012).

Por outro lado, a produção de material lignocelulósico é cada vez maior e com isso a geração de resíduos como açúcares não fermentescíveis, como as pentoses, através dos processos tradicionais. Dentro deste cenário é interessante encontrar maneiras de conversão desses açúcares em biocombustíveis. Um exemplo disso é a tentativa de utilização de microalgas como intermediários na produção de bioetanol, uma vez que através do consumo destas pentoses pode gerar um estímulo na produção de carboidratos por estes micro-organismos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da biomassa de *Chlorella minutissima* para produção de bioetanol, quando cultivada utilizando pentoses como fonte de carbono.

2. Material e Métodos

2.1 Microalga e condições de cultivo

Foi utilizada a cepa de *Chlorella minutissima* pertencente à Coleção do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Para o cultivo da microalga foi utilizado o meio Bristol's Modificado (MBM) (WATANABE, 1960) controle e com redução do componente nitrogenado (0,125 KNO₃). Além da redução do teor de nitrogênio, se avaliou o efeito de diferentes concentrações de pentoses. A Tabela 1 apresenta as diferentes concentrações de pentoses (pré-determinadas em trabalhos anteriores) utilizadas.

Tabela 1 - Concentração de Xilose e Arabinose utilizadas nos diferentes meios de cultivo.

Condição de cultivo	Xilose (mg.L ⁻¹)	Arabinose (mg.L ⁻¹)
MBM Padrão	-	-
MBM + Redução de KNO ₃ + Xilose e Arabinose	19,164	0,897
MBM + Redução de KNO ₃ + Xilose	20,06	-
MBM + Redução de KNO ₃ + Arabinose	-	20,06

Para avaliar o crescimento foram realizados cultivos mixotróficos em fotobiorreatores tipo tubulares de 2L de volume útil, mantidos em estufa termostaticada a 30 °C, fotoperíodo de 12 h claro/escuro e 40,5 µmol.m².s⁻¹ de iluminação fornecidos por lâmpadas fluorescentes de 40 W. Os cultivos foram mantidos até a caracterização de uma possível fase estacionária de crescimento.

2.2 Crescimento celular

O crescimento da biomassa foi monitorado diariamente pela densidade ótica das culturas em espectrofotômetro a 670nm, através de uma curva padrão previamente realizada, relacionando peso

seco e densidade ótica, o mesmo procedimento foi realizado para a determinação da concentração inicial de biomassa (COSTA et al., 2002).

Foram avaliados parâmetros cinéticos como a concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$, g.L⁻¹); a produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$, g.L⁻¹.dia⁻¹), obtida segundo a equação $P = (X_t - X_0)/(t - t_0)$, onde X_t é a concentração de biomassa (g.L⁻¹) no tempo t (dia), e X_0 a concentração de biomassa (g.L⁻¹) no tempo t_0 (dia) (SCHMIDELL et al., 2001); a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, dia⁻¹) por regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento e o tempo de geração (t_g , dia) pela equação $t_g = \ln 2 / \mu_{\text{máx}}$ (BAILEY e OLLIS, 1986).

2.3 Determinação do teor de carboidratos na biomassa cultivada

O teor de carboidratos (% e µg.mL⁻¹) foi avaliado utilizando o método de Dubois et al., 1956.

2.4 Determinação do teor de proteínas na biomassa cultivada

A concentração de proteínas será determinada com o uso da metodologia de Lowry et al., 1951.

2.5 Produção teórica de etanol

O rendimento teórico de etanol foi determinado de acordo com o cálculo teórico de etanol do U.S. Department of Energy (DOE) (2009). O cálculo foi realizado com base na Equação 1:

$$\eta_{\text{teórico em etanol}} = \frac{1,11g \text{ C6 ou } 1,136g \text{ C5 açúcares}}{1g \text{ açúcar polimérico}} \times \frac{Xg \text{ de açúcar polimérico}}{100g \text{ biomassa}} \times \frac{0,51g \text{ de etanol}}{1g \text{ C6 ou C5 açúcares}} \times \frac{3,79 \text{ L de etanol}}{2971g \text{ de etanol}} \times \frac{1.000.000 \text{ g de biomassa}}{1mg \text{ de biomassa}} \quad (1)$$

A determinação do rendimento teórico de etanol por área (L.ha⁻¹) foi calculada multiplicando-se o rendimento teórico de etanol em base mássica (L.g⁻¹) e o rendimento em biomassa seca por hectare (g. ha⁻¹), segundo Monono et al (2013), ha⁻¹. Foi considerada uma produtividade de 90 toneladas de biomassa microalgal a cada 10 hectares por ano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a concentração de *Chlorella minutissima* durante as diferentes condições de cultivo. A Tabela 2 apresenta os valores médios de concentração máxima, velocidade específica máxima de crescimento, produtividade máxima e tempo de geração, obtidos para *Chlorella minutissima*.

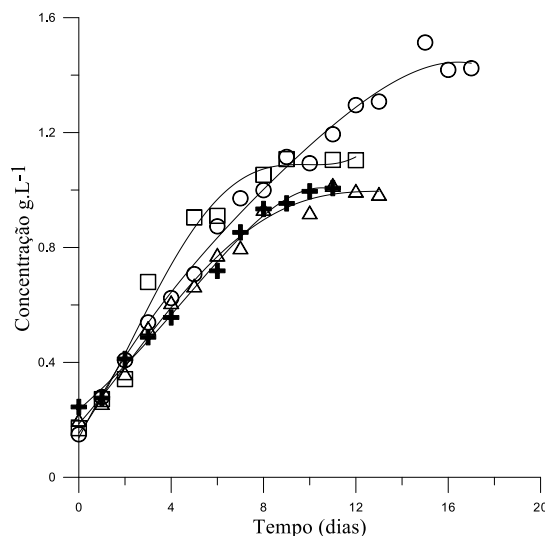


Figura 1 – Concentração de biomassa de *Chlorella minutissima* para as diferentes condições de cultivo (○) MBM Controle, (+) MBM + 50% KNO₃ + 19,164mg.L⁻¹ Xilose + 0,897mg.L⁻¹ arabinose, (□) MBM + 50% KNO₃ + 20,06 mg.L⁻¹ Xilose e (△) MBM + 50% KNO₃ + 20,06 mg.L⁻¹ Arabinose, respectivamente.

Ao observar a Figura1 é possível verificar que os cultivos não apresentaram fase de adaptação, caracterizando um crescimento exponencial desde os primeiros dias de cultivo, isto é resultado da manutenção da cepa de *Chlorella minutissima* em condições semelhantes as condições experimentais. Os cultivos foram mantidos até a caracterização de uma possível fase estacionária, onde segundo Moura (2006) e Renaud et al. (2002), quando em cultivos estanques, as células são mais velhas e o teor de carboidratos é maior. Os cultivos controle foram os que alcançaram concentração celular mais elevada (1,555 g.L⁻¹), alcançando a fase estacionária em aproximadamente 17 dias.

Quando analisado os cultivos com modificações no meio de cultura, foi alcançada a maior concentração celular naqueles que utilizaram somente adição de xilose (1,108 g.L⁻¹) e por último os cultivos no qual foi adicionado xilose e arabinose (1,008 g.L⁻¹). Os resultados encontrados por MARGAITES (2010) para o cultivo de microalga do gênero *Chlorella* com redução do teor de nitrogênio, sem adição de pentoses tiveram duração de 22 a 24 dias, não apresentando crescimento exponencial nos primeiros dias de cultivo, o que pode ser resultado da ausência de qualquer fonte de carbono durante os cultivos.

Com esta análise é possível verificar que a associação de pentoses como fonte de carbono é favorável para obtenção de maior concentração celular e alcance da fase estacionária em menor tempo de cultivo. Nos cultivos com pentoses uma possível caracterização de fase estacionária foi alcançada em períodos entre 10 a 13 dias de cultivo, o que permite um maior número de cultivos e com isso uma maior produção de biomassa.

Informações acerca da concentração inicial de fontes de carbono são necessárias para o crescimento ideal dos microrganismos, bem como o tipo de fotobiorreator, o uso de fotobiorreatores

tubulares apresentam características mais vantajosas, como controle de pH e temperatura e agitação mais eficientes, fornecendo então a cultura melhores condições de crescimento microalgal (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Neste contexto, o modelo de fotobiorreator utilizado priorizou as condições ideais de cultivo. Isto é comprovado a ao se comparar o cultivo desta mesma cepa, *Chlorella minutissima*, em fotobiorreatores tipo erlenmeyer realizado por Freitas et al (2012), que alcançou concentração celular máxima e velocidade específica máxima de crescimento cerca de duas vezes menores do que o obtido no presente trabalho, o que demonstra que a associação de fotobiorreatores tubulares e o uso isolado de cada pentose geram melhoras significativas no crescimento microalgal.

Tabela 2 - Concentração de biomassa máxima ($X_{\text{máx}}$), produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de geração (t_g) (média \pm desvio padrão), para os cultivos de *Chlorella minutissima*.

Condição de cultivo	$X_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹)	$P_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)	t_g (dia)
MBM Controle	1,555 \pm 0,272	0,130 \pm 0,010	0,618 \pm 0,061	1,122 \pm 0,061
MBM + 50% KNO ₃ + 19,164mg.L ⁻¹ Xilose + 0,897mg.L ⁻¹ arabinose	1,008 \pm 0,046	0,087 \pm 0,007	0,328 \pm 0,015	2,113 \pm 0,015
BM + 50% KNO ₃ + 20,06 mg.L ⁻¹ Xilose	1,108 \pm 0,043	0,170 \pm 0,022	0,242 \pm 0,013	2,864 \pm 0,013
MBM + 50% KNO ₃ + 20,06 mg.L ⁻¹ Arabinose	1,019 \pm 0,124	0,106 \pm 0,049	0,383 \pm 0,038	1,812 \pm 0,038

A Tabela 3 apresenta a composição da microalga *Chlorella minutissima* quanto ao teor de carboidratos e proteínas.

O aumento do teor de carboidratos obtidos para a microalga, em todas variações de fonte de carbono associado a redução do componente nitrogenado, se mostram de acordo com afirmado por Fogg (1983), que diz que quando há limitação de nitrogênio é imposta à uma cultura exposta a iluminação adequada, a fotossíntese contínua sendo realizada, e o fluxo de carbono gera um desvio à síntese de lipídios e carboidratos. Portanto, a utilização de pentoses (xilose e arabinose), juntamente com a redução do componente nitrogenado, são responsáveis pela obtenção de 66,44% de carboidratos na biomassa, comprovando que a redução na fonte de nitrogênio é uma forma efetiva de melhorar o acúmulo de lipídeos e/ou carboidratos na biomassa microalgal. No entanto, o aumento destes componentes na biomassa nem sempre é proporcional ao da produtividade celular. (RICHMOND, 2004).

Diferentes cepas de chlorophytas foram cultivadas por Freitas et al (2012) em reatores do tipo erlenmeyer com o uso de xilose e arabinose, encontrando para *Chlorella minutissima* 58,6% de carboidratos, teor inferior ao encontrado no presente trabalho, com a utilização de xilose e arabinose, em reatores tubulares (66,44%), o que mostra a influência direta da escolha do fotobiorreator.

Tabela 3 – Teor de carboidratos e proteínas (média \pm desvio padrão) na biomassa de *Chlorella minutissima* para as diferentes formas de cultivo

Condição de cultivo	Teor de carboidratos (%)	Teor de proteínas (%)
MBM Controle	21,55 \pm 0,61	17,07 \pm 1,76
MBM + 50% KNO ₃ + 19,164mg.L ⁻¹ Xilose + 0,897mg.L ⁻¹ arabinose	66,44 \pm 2,14	9,20 \pm 0,97
MBM + 50% KNO ₃ + 20,06 mg.L ⁻¹ Xilose	63,42 \pm 1,38	10,6 \pm 0,29
MBM + 50% KNO ₃ + 20,06 mg.L ⁻¹ Arabinose	55,72 \pm 0,54	9,79 \pm 0,74

A Figura 2 mostra o rendimento de etanol em massa e em área para a cepa de *Chlorella minutissima* nas diferentes condições de cultivo.

Os melhores resultados foram obtidos também com a adição associada de xilose e arabinose, apresentando um rendimento de etanol em massa de aproximadamente 500 L.ton⁻¹ e rendimento de etanol em área foi de aproximadamente 450 L.ha⁻¹. Estes resultados comparados com outras culturas utilizadas para produção de etanol se mostram muito favoráveis. O rendimento determinado é 25 vezes maiores do que o obtido por culturas de plantas superiores, como a cana-de-açúcar, que pode alcançar um rendimento em etanol de 19,33 L.ton⁻¹, como determinado por Urbano et al. (2009). Portanto, o cultivo de *Chlorella minutissima* pode ser considerado de grande importância visto que esta possui alta produtividade de carboidratos, bem como composição de açúcar adequado para a produção de biocombustíveis de acordo com CHEN et al., (2013).

Uma vez que tecnologias para a produção de etanol de segunda geração se tornam viáveis, pois a hidrólise de lignocelulose gera xilose e pequenas quantidades de arabinose, ambas não fermentescíveis pelo atual processo, a capacidade desta cepa em assimilar estes açúcares de cinco carbonos se torna cada vez mais destacável. Os resultados encontrados mostram que o uso de pentoses associado a redução de nitrogênio e o uso de fotobiorreatores tubulares, estimulam a produção de carboidratos fermentescíveis, afirmando assim a potencialidade do uso de *Chlorella minutissima* para produção de bioetanol.

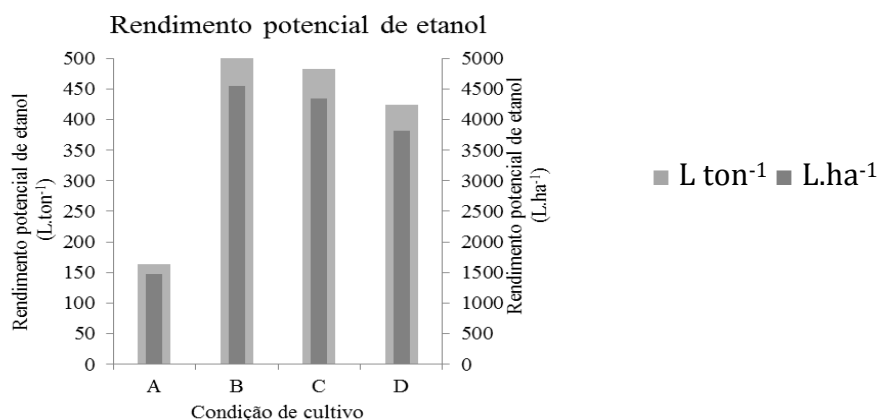


Figura 2 – Rendimento potencial de etanol em massa e em área para *Chlorella minutissima*, nas diferentes condições de cultivo, sendo A (MBM Controle), B (MBM + 50% KNO₃ + 19,164mg.L⁻¹ Xilose + 0,897mg.L⁻¹ arabinose), C (MBM + 50% KNO₃ + 20,06 mg.L⁻¹ Xilose) e D (MBM + 50% KNO₃ + 20,06 mg.L⁻¹ Arabinose).

4. CONCLUSÃO

A potencialidade do uso de *Chlorella minutissima* cultivada com o uso de pentoses é confirmada, a partir da elevada produção de carboidratos alcançada. Os melhores resultados para os dos parâmetros cinéticos foram obtidos nos cultivos utilizando meio de cultura com 100% de nitrogênio, com concentração celular 1,55 g.L⁻¹, velocidade específica máxima de crescimento 0,618 dia⁻¹ e tempo de geração 1,12 dia. A melhor produtividade foi obtida nos cultivos com a adição somente de xilose, 0,170 g.L⁻¹.dia⁻¹. Os maiores teores de carboidratos foram obtidos nos cultivos com a adição associada de xilose e arabinose e redução do componente nitrogenado, alcançando cerca de 66,44%, resultando então no cultivo mais promissor para o rendimento de etanol por área e massa, com aproximadamente 450 L.ha⁻¹ e 500 L.ton⁻¹, respectivamente, o que pode gerar uma produção anual de 4.521,53 L.ha⁻¹ deste biocombustível.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Bioch.engineering fundamentals*. 2. ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B., Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual, *Ciência Rural*, v.38, n.1, p.54-58, 2008.
- CHEN, C.Y.; ZHAO, X.Q.; YEN, H.W.; CHENG, C.L.; LEE, D.J.; BAI, F.W.; CHANG, J.S.; Microalgae-based Carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, v.78, n.15, 2013.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World J. of Microbio. & Biotech*, v.18, n.7, p. 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; ANDRADE, M. R. Microalgae Biotechnology, Microbiology and Energy – Microalgal Engineering: the Metabolic Products and the Bioprocess. New York: Nova, 2012.

DOE, 2009. Theoretical Ethanol Yield Calculator. US Department of Energy, Available at www.eere.energy.gov/biomass/ethanol_yield_calculator.html (acessado 01.01.14).

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, v. 28, p.350-356, 1956.

FREITAS, B. C. B., MORAIS, E. G.; BRACHER, E. H.; COSTA, J. A. V.; ATALA, D. I. P. Determinação da concentração de carboidratos na biomassa de chlorophytas cultivadas com pentoses. 7º Congresso Internacional de Bioenergia, São Paulo, 2012.

FOGG, G. E. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Bot. Mar.*, v.26, p.3-14, 1983.

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L. A.; RANDALL, J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The J. of bio. chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARGARITES, A. C.F.; Seleção e cultivo de microalgas para a produção de bioetanol; Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, FURG, 2010.

MAGRO, C.D.; Remoção de cromo VI e DQO de meio de cultivo adicionado de efluente com elevada concentração de cromo a partir da microalga *Spirulina platensis*; Trabalho de conclusão de curso, Engenharia Ambiental, UPF, 2011.

MONONO, E. M.; NYREN P. E.; BERTI, M. T.; PRYOR, S. W. Variability in biomass yield, chemical composition, and ethanol potential of individual and mixed herbaceous biomass species grown in North Dakota, *Ind. Crops and Products*, v. 41, p. 331-339, 2013.

MOURA JÚNIOR, A.M.; BEZERRA NETO, E.; KOENING, M. L.; LEÇA, E. E. Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle. *Ciênc. Agrônômica*, v.37, n.2, p.142-148, 2006.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.E.; DEBASHAN, L.; BASHAN, Y.; Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, Oxford, v.45, p.11-36, 2011.

RENAUD, S. M.; LUONG-VAN, T.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, v. 211, p.195-214, 2002.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. London: *Blackwell Science*, v.15, p.312-351. 2004.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*. São Paulo: E. Blücher, 2001.

URBANO, L.H., SUMAN, P. A., LEONEL, M. Rendimento de processo de produção de etanol a partir de manipueira. XIII Congresso Brasileiro de Mandioca. Bahia, 2009.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of applied microbiology University of Tokyo. *J. of General and Applied Microbio*, v. 6, p. 1-4, 1960.