

AVALIAÇÃO DA IDADE E CONCENTRAÇÃO DA MICROALGA *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* POTENCIALMENTE UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

R. L. COSTA, M. C. SOARES, J. S. FERREIRA, V. L. CARDOSO, F. R. X. BATISTA

Universidade Federal de Uberlândia, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: frxbatista@feq.ufu.br

RESUMO - A produção de hidrogênio (H_2) através de rota biológica tem sido observada nos últimos anos como uma alternativa atraente ao uso de combustíveis de origem fóssil. Este estudo avaliou a influência de parâmetros de crescimento (idade e concentração de inóculo) da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* assim como a influência do enxofre na produção de H_2 . As fermentações foram realizadas em reatores com 37,5mL de volume útil e mantidas em estufa germinadora a 25°C com foto-período de 12h e luminosidade de 2200lux. O meio basal TAP foi utilizado. Parâmetros como o monitoramento do consumo da fonte de carbono (ácido acético), além da observação da síntese de metabólitos (ácidos orgânicos e etanol) também foram avaliados. Os resultados mostraram que a idade e a concentração de inóculo mais adequadas para a produção de H_2 foram respectivamente o décimo dia de cultivo e 0,20g células/L. De forma complementar, com a variação do teor de enxofre no meio basal foi possível se observar uma pequena diferença na produção de H_2 para duas das concentrações de inóculo avaliadas. Para 0,10g/L o teor que propiciou uma maior produção do produto-alvo foi o de 10mg, enquanto que para 0,20g/L foi verificado que 25mg de enxofre no meio resultaram em 8% a mais de H_2 .

1. INTRODUÇÃO

As microalgas têm se destacado nos últimos anos na área acadêmica e na indústria em virtude de seu potencial para a produção de biocombustíveis e derivados (Tevatia *et al.*, 2012). Estes indivíduos são capazes de absorver a luz solar e convertê-la em produtos de elevado valor agregado como lipídios, proteínas (Amin, 2009), dentre outros. Neste contexto, destaca-se a alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* que utiliza potencialmente a energia luminosa para produzir H_2 através de rota enzimática. É sabido que esta alga produz o H_2 em maior teor em condições de anoxia, uma vez que o oxigênio produzido durante a fotossíntese inibe a ação da enzima [FeFe]-hidrogenase responsável pelo fenômeno. Estudos demonstraram que resíduos de oxigênio da ordem de 2% podem desencadear este processo inibitório (Yang *et al.*, 2014). Ainda neste contexto, Kosourov *et al.* (2007) mostraram que em um sistema contínuo a foto-produção de H_2 por *C. reinhardtii* foi observada após a

incubação da cultura por alguns dias na ausência de sulfato (enxofre). Segundo os autores, a supressão de enxofre no meio causa uma parcial e reversível inativação da evolução fotossintética do oxigênio nas algas, resultando assim no estabelecimento de anaerobiose no sistema. Tal condição favoreceu a expressão da [FeFe]-hidrogenase nas células e a produção de H₂. Já Yang *et al.* (2014) utilizaram a privação de enxofre para proporcionar a alga uma diminuição da atividade do fotossistema II (PSII) e o aumento da taxa de respiração. Tal observação também tornou o sistema anaeróbio e com isso a hidrogenase pode ser induzida de maneira a catalisar a produção de H₂ (Das e Veziroglu, 2001; Kosourov *et al.*, 2002; Tamburic *et al.*, 2011). É importante salientar que as algas utilizam a energia luminosa para gerar elétrons que são transferidos para uma molécula de ferredoxina, tomando a sua forma reduzida. Posteriormente, a enzima hidrogenase combina os prótons (H⁺) do meio com os elétrons doados pela ferredoxina reduzida, para formar e liberar H₂ (Hallenbeck e Benemann, 2002). Assim, no intuito de desenvolver processos que melhorem a produção deste biocombustível utilizando a alga verde *C. reinhardtii*, este estudo investigou o efeito da idade e da concentração celular de inóculo. De forma adicional, a influência do teor de enxofre no meio e a síntese de subprodutos do metabolismo também foram avaliadas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Alga Verde, Meio de Cultivo e Condições de Pré-cultura

A alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* cc-124 foi adquirida do banco canadense *Chlamydomonas Resource Center*. Para a manutenção e pré-cultura, o meio basal *Tris Acetate Phosphate* – TAP (Andersen, 2005), com pH inicial ajustado para 7, foi utilizado. Cerca de 250mL da suspensão celular foi cultivada em frascos *erlenmeyer* de 500mL. Para o subcultivo, o mesmo volume de meio fresco foi adicionado. Os frascos foram então mantidos em uma incubadora dotada de controle de temperatura de 25°C e foto-período de 12h, sem agitação mecânica. A intensidade luminosa foi ajustada para 2200lux.

2.2 Supressão de Enxofre e Análise da Idade e Concentração do Inóculo

As algas produzem H₂ na ausência de enxofre (Das e Veziroglu, 2001). Neste contexto, o meio TAP teve este componente suprimido, sendo os sulfatos substituídos por quantidades equivalentes de sais de cloreto. Para a determinação da idade de inóculo que otimizasse a produção de H₂, a concentração celular de 0,10g/L foi fixada e as idades de 5, 10 e 15 dias avaliadas. Inicialmente, as algas foram centrifugadas à 8000rpm por 15min, lavadas com água deionizada e centrifugadas por duas vezes. A biomassa obtida foi reativada em meio fresco TAP sem enxofre, com pH de 7, em reatores de 50mL, sendo o volume útil de 37,5mL. Argônio foi purgado no sistema para remover o oxigênio. Os frascos foram lacrados e selados e incubados na mesma condição da pré-cultura. Seringas (10mL) foram introduzidas no selo do lacre de maneira a coletar o biogás produzido no experimento. De forma adicional, três concentrações iniciais de células (0,05, 0,10 e 0,20g/L), utilizando inóculo com 10 dias de

idade, foram avaliadas na produção de H_2 . O mesmo procedimento descrito anteriormente no que se refere ao preparo e execução do sistema foto fermentativo foi adotado.

2.3 Análise de Diferentes Teores de Enxofre no Meio de Cultivo

Uma vez observada a necessidade da existência de uma quantidade residual de enxofre no meio para a verificação da produção de H_2 , diferentes concentrações deste componente foram testadas. Esta verificação foi realizada para duas concentrações de inóculo (0,10 e 0,20g/L) com 10d de idade. Um cálculo preliminar mostrou que em sua composição original o meio TAP apresentava no total cerca de 50mg de componentes sulfurados. O $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ contribuía isoladamente com cerca de 80% deste valor. Assim, a estratégia adotada para a verificação da influência do teor de enxofre na produção de H_2 consistiu do preparo do meio TAP contendo quantidades diferenciadas deste sal (0, 10, 25 e 50mg).

2.4 Metodologia Analítica

A concentração celular foi determinada através do método gravimétrico, correlacionando a concentração de sólidos voláteis (SV) da biomassa de alga com a absorbância observada em uma densidade óptica de 665nm (VVMINI-1240, UV-VIS Spectrophotometer). As concentrações de ácidos orgânicos e etanol foram determinados em HPLC (Shimadzu modelo LC-20A Proeminência, Supelcogel, Coluna C-610H), em que os componentes foram detectados por UV. A temperatura da coluna foi de 32°C e uma solução aquosa de H_3PO_4 (0,1%) foi usada para a eluição, mantida a vazão de 0,5mL/min. É importante salientar que o sobrenadante celular utilizado para tal foi previamente autoclavado, centrifugado (8000rpm por 15 min) e diluído (1:10). Só então foi filtrado e injetado no sistema de detecção. Já o biogás produzido foi analisado em um cromatográfico à gás (GC 17A Shimadzu), contendo uma coluna capilar Carboxen 1010 com 30m de comprimento e diâmetro interno de 0,53mm. A temperatura do injetor foi mantida em 230°C, enquanto que a coluna e o detector em 32 e 230°C, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Avaliação da Idade de Inóculo

Para a identificação da idade de inóculo adequada para a produção de H_2 , uma concentração inicial de células de 0,10g/L foi fixada, uma vez estabelecida a supressão de enxofre no meio basal TAP. Os resultados estão apresentados na Tabela 1. Em todos os casos, após 5 dias de fermentação, a produção de biogás foi observada, contudo, H_2 não foi detectado. Kim *et al.* (2006) observaram que as células de *C. reinhardtii* podem produzir H_2 quando 7 dias de idade de inóculo são empregados. No entanto, nos estudos realizados pelos pesquisadores uma variação na composição de enxofre no meio foi simultaneamente utilizada e o efeito isolado da influência da idade de inóculo na produção de H_2 não foi determinado. Ressalta-se que a privação de enxofre por longos períodos pode ocasionar alterações

metabólicas importantes nas algas, como a redução das taxas fotossintéticas que resultam na diminuição do oxigênio no meio, enquanto que os níveis de respiração são mantidos, fato que torna a cultura anaeróbia. Esta estratégia envolve o uso de energia luminosa para haver a quebra da água, gerando adenosina trifosfato e hidrogênio, e a degradação do amido em ácidos fórmico, acético, málico, etanol, e dióxido de carbono (Tamburic *et al.*, 2011).

Tabela 1 -Concentração final de células e volume de biogás obtidos em 5 dias de fermentação. A concentração inicial de células utilizada foi de 0,10g/L

Idade de Inóculo (d)	Concentração celular final (g/L)	Biogás (mL)
5	0,19	0,10
10	0,18	7,80
15	0,12	1,00

Os ácidos orgânicos produzidos pelas algas em culturas propagadas a partir de diferentes idades de inóculo (5, 10 e 15 dias) foram obtidos da análise do sobrenadante celular e os resultados podem ser encontrados na Tabela 2. Entretanto, é importante salientar que o ácido acético estava presente na composição original do meio TAP a 17,4 mmol/L.

Tabela 2 - Concentrações de ácidos obtidas em 5 dias de fermentação. A concentração inicial de células utilizada foi de 0,10g/L

Idade do inóculo (g/L)	Ácido Acético (mmol/L)	Ácido Propiônico (mmol/L)	Ácido Butírico (mmol/L)	Etanol (mmol/L)
5	0,00	0,00	0,00	0,00
10	30,65	0,07	0,00	0,00
15	38,41	0,014	0,00	0,00

Observando os dados encontrados nas Tabela 1 e 2 pode-se sugerir que para a idade de 5 dias, o ácido acético inicial foi utilizado para o crescimento celular, sendo o comportamento da alga caracterizado como heterotrófico. Na fase avaliada, um crescimento de 90% da alga foi observado, com um desvio padrão entre amostras de $0,40 \times 10^{-3}$. Já para a idade de 10 dias, o ácido acético atingiu no meio 30,7mmol/L, sendo observada também a presença do ácido propiônico no meio. Nesta condição um crescimento celular de 80%, com um desvio padrão entre amostra de $2,29 \times 10^{-2}$ foi verificado. Para a idade de 15 dias, ácido acético produzido (38,41mmol/L) e um desvio padrão entre amostras de $1,23 \times 10^{-2}$ foi observado. Contudo, nesta condição as algas cresceram somente 20%. O desvio padrão calculado foi de $2,87 \times 10^{-2}$.

3.2 Avaliação da Concentração Celular

Visando a potencialização da produção de hidrogênio, a avaliação do efeito da concentração inicial de células foi realizada. Foram testadas as concentrações de 0,05, 0,10 e 0,20g/L de algas. Neste ensaio, o tempo de fermentação (5 dias) foi mantido e a idade de inóculo de 10 dias foi utilizada. Observa-se neste período a produção de biogás, que quando analisado, revelou a presença de hidrogênio em pequenas concentrações. Não sendo possível,

portanto sua quantificação. Os principais produtos do metabolismo sintetizados nas condições avaliadas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações de ácidos orgânicos obtidas após 5 dias de fermentação em culturas nas quais a idade de inóculo foi de 10 dias

Concentração de inóculo (g/L)	Ácido Acético (mmol/L)	Ácido Propiônico (mmol/L)	Ácido Butírico (mmol/L)	Etanol (mmol/L)
0,05	57,01	0,10	0,00	482,0
0,10	30,65	0,07	0,00	0,00
0,20	59,79	0,07	0,00	359,3

Conforme a Tabela 3, para a concentração de 0,05g/L da alga, a concentração final de ácido acético observada no meio foi de 57,01mmol/L, tendo um desvio padrão entre as replicatas de $3,31 \times 10^{-3}$. Nesta condição também se observa a síntese de ácido propiônico e etanol, no qual o desvio observado entre as replicatas foi de $8,43 \times 10^{-5}$ e $6,39 \times 10^{-2}$, respectivamente. Para uma concentração de 0,10 g/L observou-se uma concentração final de 30,65mmol/L de ácido acético, com desvio padrão de $3,16 \times 10^{-2}$. Este caso também apresentou a produção de ácido propiônico, sendo o desvio padrão de $1,37 \times 10^{-2}$. No último experimento com uma concentração de inóculo de 0,20g/L, a produção de ácido acético total foi de 59,79mmol/L, sendo que o desvio padrão entre as replicatas foi de $0,96 \times 10^{-3}$. Ácido propiônico e etanol também foram identificados na amostra, com desvio padrão de $2,66 \times 10^{-5}$ e $5,9 \times 10^{-2}$, respectivamente. Mus *et al.* (2007) relatou que a formação de etanol durante a fotofermentação por *Chlamydomonas* ocorre a partir da redução da acetil-CoA, resultando na oxidação de duas moléculas de NADH. Os autores salientam também que incrementos nos níveis de ADH1 mRNA ocorrem durante o período de anoxia. Assim, o piruvato pode ser também convertido a etanol via PDC1 (piruvato decarboxilase) e na rota da enzima álcool desidrogenase (ADH), verifica-se a produção de etanol e também a oxidação de um NADH. Já as concentrações finais de células podem ser observadas na Tabela 4. O crescimento acentuado das algas foi observado para uma concentração de inóculo de 0,10g/L (75%), enquanto que para a concentração de 0,05g/L houve um crescimento de 14%. Já para a última concentração avaliada (0,20g/L), não houve crescimento celular e sim uma redução no número de células de 22,5%.

Tabela 4 - Concentração final de células e volume de biogás obtidos em 5 dias de fermentação em culturas nas quais a idade de inóculo foi de 10 dias

Concentração celular inicial (d)	Concentração celular final (g/L)	Biogás (mL)
0,05	0,057	1,50
0,10	0,175	7,80
0,20	0,155	2,00

3.3 Avaliação da Variação do Teor de Enxofre

Trabalhos (Chochois *et al.*, 2009 e Lehr *et al.*, 2012) demonstraram que um dos maiores desafios para a produção de H_2 por rota biológica é a sensibilidade da hidrogenase à presença de O_2 . Para solucionar este problema, a atividade no foto-sistema II da alga deve ser reduzida, de modo a equilibrar o aumento do O_2 com o consumo respiratório das células. Isso ocorre quando o teor de enxofre é limitado no meio de cultivo (Melis *et al.*, 2000). De modo a confirmar este fato, ensaios nos quais o teor de enxofre foi variado (0, 10, 25 e 50mg) foram executados sendo apresentados na Tabela 5. Ao final, observou-se que as quantidades de biogás produzido foram maiores quando comparadas as situações supracitadas. Conforme pode ser visualizado na Figura 1, na presença de um residual de enxofre a produção de H_2 é significativamente maior.

Tabela 5 – Concentração celular final e produtividade volumétrica de H_2 obtidas após 5 dias de fotofermentação, sob condições diferenciadas de teor de enxofre no meio, em culturas nas quais a idade de inóculo foi de 10 dias

		Concentração celular final (d)		Produtividade H_2 ($\mu\text{mol/L dia}$)	
Conc. Inicial no Meio		0,10 (g/L)	0,20 (g/L)	0,10 (g/L)	0,20 (g/L)
Teor de SO_4 (mg)	0	0,09	0,30	0,06	0,50
	10	0,08	0,31	2,09	1,48
	25	0,09	0,46	0,00	2,26
	50	0,10	0,39	0,00	1,56

Para uma concentração celular inicial de 0,10g/L, após 5d de fermentação, não houve uma mudança significativa na concentração celular final, independente do teor de enxofre. Já para concentração celular inicial de 0,20g/L, um crescimento celular progressivo foi observado com o aumento gradual do teor de enxofre no meio. Atenta-se que para um teor de 25mg de SO_4 , o maior crescimento celular, cujo desvio padrão entre as replicatas foi de $89,39 \times 10^{-3}$, foi observado. Além disso, a maior produtividade de H_2 foi observada nesta condição. Percebe-se que a produção de H_2 está claramente ligada a presença de uma quantidade mínima de enxofre no meio. Já a análise do metabolismo, conforme Figura 1, nos mostra que para os ácidos orgânicos, como o ácido acético, observa-se que quando há produção de H_2 , verifica-se uma queda da produção deste ácido e quando não há produção de hidrogênio, verifica-se um aumento na produção do mesmo.

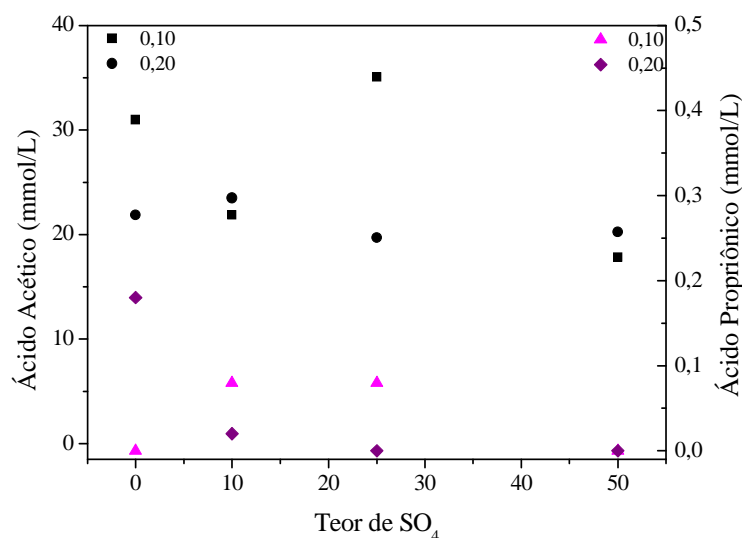


Figura 1 - Produção de ácido acético e propiônico para diferentes teores de SO_4 e concentrações celular iniciais de 0,10 e 0,20g/L.

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos fica claramente demonstrada a necessidade de um melhor entendimento do metabolismo das algas verdes para que a produção de hidrogênio molecular. Em geral, hidrogênio foi produzido de forma mais acentuada a partir de uma concentração inicial de inóculo de 0,2g/L, quando esta foi mantida em meio TAP contendo pelo menos 25mg de enxofre. Outra observação importante foi a verificação da capacidade metabólica da alga em produzir subprodutos do metabolismo com elevado valor agregado (ácidos orgânicos e etanol) além de diversificada aplicação tecnológica.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG (Processo PCE-00089-14), CNPQ e CAPES pelo apoio financeiro e a Universidade Federal de Uberlândia, bem como a Faculdade de Engenharia Química pelo apoio.

6. REFERÊNCIAS

- AMIN, S. Review on biofuel and gas production process from microalgae. *Energy Conversion and Management*, Indonesia, v.5, p.1834-1840, 2009.
- ANDERSEN, R. A., *Algal culturing techniques*, London, Elsevier Academic Press, 2005.
- CHOCHOIS, V., DAUVILLE, D., BEYLY, A., TOLLEER, D., CUINE, S., TIMPANO, H., PELTRIER, G. Hydrogen production in *Chlamydomonas*: photosystem II-dependent

- and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism. *Plant Physiology*, v. 151, p. 631-640, 2009.
- DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.26, p.13-28, 2001.
- MUS, F.; DUBINI, A.; SEIBERT, M.; POSEWITZ, M. C.; GROSSMAN, A. R. Anaerobic acclimation in *chlamydomonas reinhardtii* anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p. 25475–25486, 2007.
- HALLENBECK, P.C.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.27, p. 1185-1193, 2002.
- KIM, J. P.; KANG, C. D.; PARK, T. H.; KIM, M. S.; SIM, S. J. Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p.1585-1590, 2006.
- KOSOUROV, S; PATRUSHEVA, E; GHIRARDI, M. L; SEIBERT, M; TSYGANKOV, A. A comparison of hydrogen production by sulphur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. *Journal of Biotechnology*, v.128, p.776-787, 2007.
- KOSOUROV, S; TSYGANKOV, A.; GHIRARDI, M. L; SEIBERT, M. Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters. *Biotechnol Bioeng*, v. 78, p. 731-740, 2002.
- LEHR, F., MORWEISER, M., SASTRE, R. R., KRUSE, O., & POSTEN, C. Process development for hydrogen production with *Chlamydomonas reinhardtii* based on growth and product formation kinetics. *Journal of Biotechnology*, v. 162, p. 89-96, 2012.
- MELIS, A., XHANG, L. P., FORESTIER, M., GHIRARDI, M. L., & SEIBERT, M. Sustained photo biological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology*, v. 122, p. 127-135, 2000.
- TAMBURIC, B.; ZEMICHAEL, F. W.; MAITLAND, G. C.; HELLGARDT, K. Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p.7872-7876, 2011.
- TEVATIA, R.; DEMIREL, Y.; BLUM, P. Kinetic modeling of photoautotrophic growth and neutral lipid accumulation in terms of ammonium concentration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology*, v.119, p.419-424, 2012.
- YANG, D.; ZHANG, Y.; BARUPAL, D. K.; FAN, X.; GUSTAFSON, R.; GUO, R.; FIEHN, O. Metabolomics of photo biological hydrogen production induced by CCCP in *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v 39, p. 150-158, 2014.