

# **AVALIAÇÃO DO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE CIANOBATÉRIAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE 3ª GERAÇÃO EMPREGANDO MALTODEXTRINA COMO FONTE DE CARBONO**

M. M. MARONEZE<sup>1</sup>; E. C. FRANCISCO<sup>2</sup>; L. Q. ZEPKA<sup>1</sup>; FRANCO<sup>3</sup>, T. T.; E. JACOB-LOPES<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Depto. de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>2</sup>Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia e Arquitetura (FEAR), curso de Engenharia Ambiental, BR 285, São José, CEP 99052-900, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Av. Albert Einstein, 500, CEP 13083-852, Campinas, São Paulo, Brasil

E-mail para contato: jacoblopes@pq.cnpq.br

**RESUMO** - O trabalho teve como objetivo avaliar o cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. para produção de biodiesel de 3ª geração empregando maltodextrina como fonte de carbono. Os cultivos foram desenvolvidos em um biorreator de coluna de bolhas sob temperatura de 26°C e ausência de luminosidade. Foram avaliadas a concentração celular e o consumo de carbono orgânico a cada 24 horas durante a fase de crescimento do microrganismo, bem como, a concentração lipídica da biomassa e as propriedades de combustão do biodiesel produzido. Os parâmetros cinéticos obtidos demonstraram potencialidade do uso da maltodextrina em cultivos heterotróficos microalgais. As propriedades para a qualidade do biodiesel se mostraram adequadas às normas do Brasil (ANP 255) e internacionais (EN 14214 e ASTM 6751).

## **1. INTRODUÇÃO**

As crescentes preocupações com os impactos ambientais aliadas aos altos preços do diesel oriundo de fontes fósseis tornaram o biodiesel uma alternativa viável para o uso conjunto, ou até mesmo à substituição do diesel (GERPEN, 2005). Diversas matérias-primas têm sido investigadas para produção de biodiesel. Dentre elas, merecem destaque as cianobactérias, uma fonte renovável capaz de atender grande parte da demanda global de combustíveis para transportes, uma vez que são caracterizados pelas elevadas taxas de crescimento e elevado teor de óleo intracelular (CHISTI, 2007).

Cianobactérias são micro-organismos preferencialmente fotossintetizantes, mas que, ao serem submetidas a uma condição de ausência de luminosidade, passam a utilizar o metabolismo respiratório, a partir da assimilação de diferentes formas de carbono orgânico para a manutenção de suas estruturas (JACOB-LOPES et al., 2007).

Os cultivos heterotróficos superam a principal limitação dos fotossintéticos, isto é, a dependência de luz, que complica consideravelmente o processo e ainda é um sistema barato, de construção simples e mais fácil de operar em larga escala (FRANCISCO et al., 2013).

No entanto, para esses cultivos a fonte de carbono orgânico é um fator com influência direta nos parâmetros cinéticos do processo e na qualidade do biodiesel produzido, além das questões econômicas. A fonte orgânica mais comumente utilizada é a glicose, porém, o seu custo elevado acaba muitas vezes inviabilizando o cultivo. Uma alternativa para a redução dos custos é a substituição de fontes de carbono onerosas por substratos de baixo custo, como amidos e derivados (LI et al., 2007; FRANCISCO et al., 2013).

Maltodextrinas são polissacarídeos obtidos a partir do amido. São resultantes da hidrólise incompleta de dispersões de amidos cozidos, tanto com ácidos como com enzimas. Um exemplo industrial é a Maltodextrina Corn Globe 1805<sup>®</sup>, fabricada e comercializada pela Corn Products Brasil, é totalmente solúvel em água e produzida através da conversão da fécula de mandioca. A Globe 1805<sup>®</sup> possui baixa higroscopicidade, baixo teor de dextrose (4,0-7,0) e é solúvel a frio (CornProducts Brasil, 2009).

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. para produção de biodiesel de 3<sup>a</sup> geração empregando maltodextrina Corn Globe 1805<sup>®</sup> como fonte de carbono.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismo e meio de cultura

A cianobactéria utilizada foi a *Phormidium* sp., isolada do Deserto Cuatro Ciénegas no México (26°59'N 102°03'W). As culturas da microalga *Phormidium* sp. foram propagadas e mantidas em Agar-agar solidificado (20g/L) contendo meio padrão BGN, com a seguinte composição:  $K_2HPO_4$  (3g. 100mL<sup>-1</sup>),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (7,5g. 100mL<sup>-1</sup>),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (3,6g. 100mL<sup>-1</sup>), Citrato de amônio e ferro III (0,6g. 100mL<sup>-1</sup>),  $Na_2EDTA$  (0,1g. 100mL<sup>-1</sup>),  $NaCl$  (7,2g. 100mL<sup>-1</sup>),  $NaNO_3$  (150g.L<sup>-1</sup>), Ácido cítrico (0,06g. 100mL<sup>-1</sup>),  $Na_2CO_3$  (0,2g. 100mL<sup>-1</sup>),  $H_3BO_3$  (2,86g.L<sup>-1</sup>),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (1,816g.L<sup>-1</sup>),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,222g.L<sup>-1</sup>),  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (0,390g.L<sup>-1</sup>),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0,079g.L<sup>-1</sup>),  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  (0,040g.L<sup>-1</sup>) (Rippka et al., 1979). As condições de incubação utilizadas foram de 25°C, densidade de fluxo de fótons de 15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro. Para obter os inóculos na forma líquida, 1ml de meio sintético foi esterilizado e transferido para as inclinações, as colônias foram raspadas e depois homogeneizadas. Todo o procedimento foi realizado assepticamente.

### 2.2. Biorreator

Os experimentos foram realizados em biorreator de coluna de bolhas construído com vidro borossilicato, com um diâmetro externo de 12,5cm e uma altura de 16cm, resultando numa razão altura/diâmetro (L/D) igual a 1,28, com um volume total de

trabalho de 2,0L. O sistema de dispersão de ar consiste em um difusor de 2,5cm de diâmetro localizado no interior do frasco. A vazão de ar foi controlada por rotâmetros (precisão  $\pm 5\%$ ), a entrada de oxigênio e a saída dos gases foram filtradas através de unidades filtrantes Millex-FGR de 0,22 $\mu$ m de diâmetro e 50mm de diâmetro total. O biorreator, incluindo as unidades de filtragem foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C durante 40 minutos e, em seguida, durante 30 minutos, com o meio sintético.

### 2.3. Obtenção dos dados cinéticos

Os experimentos foram conduzidos em um biorreator de coluna de bolhas, operado de modo descontínuo, alimentado com 2L de meio sintético, com pH ajustado para 7,6, 100mg/L do inoculo da microalga *Phormidium* sp., temperatura de 26°C, ausência de luminosidade, e aeração contínua de 1VVM (volume de ar por volume de efluente por minuto). O meio de cultura consistiu em meio sintético BGN modificado e suplementado com maltodextrina Corn Globe 1805® (7.0 g/L) para obter concentração de 12g/L de carbono orgânico.

### 2.4. Parâmetros cinéticos

Os dados de concentração de biomassa foram utilizados para calcular a produtividade de biomassa [ $P_X = (X_i - X_{i-1}) \cdot (t_i - t_{i-1})^{-1}$ , mg/L.d], a velocidade máxima específica de crescimento [ $\ln(X_i/X_0) = \mu_{\max} \cdot t$ ], o tempo de geração [ $t_g = 0,693/\mu_{\max}$ , d] e produtividade de lipídeos [ $PL = P_X \cdot C_L$ , mg/L/d], onde,  $X_0$  é a concentração celular inicial,  $X_i$  é a concentração celular no tempo  $t_i$ ,  $X_{i-1}$  é a concentração celular no tempo  $t_{i-1}$ ,  $t$  é o tempo de residência,  $\mu_{\max}$  é a velocidade máxima específica de crescimento e  $C_L$  é o conteúdo lipídico da biomassa (%). A concentração de carbono orgânico expressa em termos de demanda química de oxigênio, foi utilizada para calcular a velocidade de consumo do substrato ( $r_S = -dS/dt$ ), a eficiência de conversão ( $EC = S_0 - S/S_0$ , %), e coeficiente de rendimento do substrato ( $Y_{X/S} = dX/dS$ , mg<sub>biomassa</sub>/mg<sub>maltodextrina</sub>), onde  $S_0$  é a concentração inicial de carbono orgânico (mg/L),  $S$  é a concentração de carbono orgânico (mg/L) e  $t$  é o tempo (d).

### 2.5. Amostragem e métodos analíticos

As amostragens foram realizadas de forma asséptica em uma câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada. As ponteiros utilizadas para a coleta das amostras foram previamente esterilizadas em autoclave a 121°C por 20 minutos. A concentração celular, a dinâmica do pH e o consumo de carbono orgânico foram monitoradas a cada 24 horas durante a fase de crescimento do microrganismo. Os experimentos foram realizados duas vezes e em duplicata para cada substrato. Portanto, os dados cinéticos referem-se ao valor médio de quatro repetições.

A dinâmica do pH foi determinada por potenciometria e a concentração celular por gravimetria. A concentração de carbono orgânico, expressa em termos de demanda química de oxigênio (DQO) foi determinada por método colorimétrico segundo metodologia proposta por APHA (2005).

Ao termino do processo a biomassa foi separada do meio de cultivo por decantação, seguido de centrifugação, secagem e trituração. Para a extração de lipídeos totais da biomassa utilizou-se o método de Bligh e Dyer (1959) modificado e a quantidade de lipídeos foi determinada por gravimetria. A saponificação e esterificação

(metilação) do extrato lipídico seco foram realizadas através do método de Hartman e Lago (1976), obtendo-se o biodiesel.

As propriedades da qualidade do biodiesel foram determinadas de acordo com metodologia proposta por Francisco et al., (2010). Avaliou-se o conteúdo de ésteres (EC), número de cetano (NC), índice de saponificação (IS), índice de iodo (II), o grau de insaturação (GI), fator de comprimento da cadeia (FCC) e o ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos para o cultivo de *Phormidium* sp. utilizando maltodextrina como fonte de carbono. A análise dos dados indica que o cultivo apresentou taxas de consumo do substrato de 1665,60mg/L.d, coeficiente de conversão do substrato em células de 0,53mg<sub>célula</sub>/mg<sub>maltodextrina</sub>, concentrações celulares máximas de 5480,0mg/L, eficiência de conversão de carbono orgânico de 96,02%, produtividades de biomassa de 1072,80mg/L.d, teor de lipídeos de 14,90% e produtividade lipídica de 160,80mg/L.d.

Os resultados cinéticos obtidos foram comparáveis e até superior ao cultivo de *Phormidium* sp. com glicose realizado por Francisco et al. (2013), onde, a taxa de consumo de substrato foi de 2670,90mg/L.d, o coeficiente de conversão do substrato em células foi de 0,23mg<sub>célula</sub>/mg<sub>glicose</sub>, o teor de lipídico foi de 11,3% e as produtividades em biomassa e lipídeos foram de 404,1 e 45,6mg/L.d, respectivamente.

Tabela 1- Parâmetros cinéticos do cultivo heterotrófico de *Phormidium* sp.

Parâmetros	Valor
$r_s$ (mg/L/d)	1665,60
$Y_{X/S}$ (mg/mg)	0,53
$X_{máx}$ (mg/L)	5480,0
EC (%)	96,02
$P_X$ (mg/L.d)	1072,80
Lipídeos (%)	14,90
$P_L$ (mg/L/d)	160,80

$r_s$ : taxa de consumo do substrato,  $Y_{X/S}$ : coeficiente de conversão do substrato em célula,  $X_{máx}$ : concentração celular máxima, EC: eficiência de conversão do carbono orgânico,  $P_X$ : produtividade em biomassa,  $P_L$ : produtividade lipídica.

Para avaliar o potencial do biodiesel como substituto do óleo diesel, foram determinadas as propriedades de combustão do biodiesel, tais como conteúdo de éster, número de cetano, índice de saponificação, índice de iodo, grau de insaturação, fator de comprimento de cadeia e ponto de entupimento de filtro a frio. Uma comparação das propriedades do biodiesel do óleo de microalgas com as legislações vigentes no Brasil (ANP 255), Europa, (EN 14214) e Estados Unidos (ASTM 6751) é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2- Propriedades do biodiesel para o cultivo de *Phormidium* sp. empregando maltodextrina como fonte de carbono orgânico e normas internacionais

Propriedades do biodiesel	Microalgas	ASTM 6751	EN 14214	ANP 255
CE (%)	99,98	-	Min.96,5	-
NC	66,50	Min. 47	Min. 51	Min. 45
IS	209,57	-	-	-
II (gI <sub>2</sub> /100g)	25,98	-	Máx. 120	-
GI (%)	75,67	-	-	-
FCC (%)	27,67	-	-	-
PEFF (°C)	70,45	-	-	-

CE = conteúdo de éster, CN = número de cetano, IS = índice de saponificação, II = índice de iodo, GI = grau de instauração, FCC = fator de comprimento da cadeia, PEFF = ponto de entupimento de filtro a frio.

Os parâmetros considerados cumprem com a legislação brasileira (ANP 255), e internacionais (EN 14214 e ASTM 6751), indicando o potencial de exploração da biomassa microalgal de *Phormidium* sp. como matéria-prima para a produção de bicomcombustíveis.

## 5. CONCLUSÃO

O uso da maltodextrina demonstrou a eficiência da cianobactéria *Phormidium* sp. em converter o carbono orgânico presente no meio de cultivo, sendo dos 96,02% convertidos 53% incorporados na forma de biomassa. Uma elevada concentração celular, de 5480,0mg/L foi obtida, bem como um significativo teor lipídico (14,90%). O biodiesel produzido apresentou propriedades de combustão de acordo com as principais legislações nacional e internacionais. Neste sentido, os resultados obtidos demonstram a potencialidade de exploração deste tipo de processo para a produção de biodiesel de 3ª geração.

## 5. REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION- APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20. ed. Washington: APHA, 2005.

ANP 255. *Provisional Brazilian Biodiesel Standard ANP* (Agencia Nacional do Petróleo), 2003.

ASTM 6751. *Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100)*. Blend Stock for Distillate Fuels, 2002.

- BLIGH, E.G.; DYER, J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, v.37, p.911-917, 1959.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, v.26, p.126-131, 2007.
- CORN PRODUCTS BRASIL S/A. Ficha Técnica, 2009.
- FRANCISCO, E. C.; FRANCO, T. T.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E. Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. *Bioprocess Biosystems Engineering*, v. 36, p. 1986-2013, 2014.
- FRANCISCO, E.C.; NEVES, D.B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T.T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.95, p. 395-403, 2010.
- GERPEN, J. V.; KNOTHE, G. Basics of the transesterification reaction. In: KNOTHE, G. GERPEN, J. V.; KRAHL, J. (Eds.) *The Biodiesel Handbook*. AOCS Press, Urbana, Illinois, p.17-25, 2005.
- HARTMAN, L., LAGO, R.C.A. A rapid determination of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, v.22, p.475-476, 1976.
- JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q.; PINTO, L.A.A.; QUEIROZ, M.I. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium *Aphanathece microscopica* Nägeli. *Chemical Engineering and Processing*, v.46, p.63-69, 2007.
- LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v.98, p.764-771, 2007.
- RIPPKA, R. et al. Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiolog.* Great Britain. n.111. p.1-61, 1979.
- UNE-EN 14214. *Automotive Fuels, Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines, Requirements and Test Methods*, 2003.