

# **AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA *APHANOTHECE MICROSCOPICA NÄGELINA* CONVERSÃO HETEROTRÓFICA DO AMIDO DE MILHO E MANDIOCA COMO FONTES DE CARBONO ORGÂNICO**

A. M. SANTOS<sup>1</sup>, K. R.V. QUINHONES<sup>1</sup>, E.C. FRANCISCO<sup>2</sup>, M.I. QUEIROZ<sup>3</sup>, L.Q. ZEPKA<sup>1</sup>, E. JACOB-LOPES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos

<sup>2</sup>Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia e Arquitetura

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos

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

**RESUMO** - O trabalho teve por objetivo avaliar a produção de biomassa e lipídeos por *Aphanothece microscopica Nägeli*, a partir de amido de mandioca e amido de milho como fonte de carbono orgânico. Os ensaios foram conduzidos em um biorreator de coluna de bolhas com relação altura/diâmetro (L/D) igual a 1,28, com volume de trabalho de 2L. As condições experimentais foram em meio sintético BGN, modificado com amido de mandioca e amido de milho visando obter uma razão C/N de 68, 100mg/L do inóculo, pH de 7,6, temperatura de 30°C, aeração contínua de 1VVM (volume de ar por volume de meio de líquido por minuto) e ausência de luminosidade. Os resultados indicaram máximas produtividades de biomassa de 19,16mg/L.h e 17,638mg/L.h, utilizando-se amido de mandioca e milho, respectivamente, em paralelo a produtividades em lipídios de 113,61mg/L.h e 117,41mg/L.h.

Palavras-chave: cultivo heterotrófico, microalga, amido.

## **1. INTRODUÇÃO**

As cianobactérias são microrganismos procariontes largamente distribuídos na natureza. São preferencialmente fotossintetizantes, mas algumas linhagens, como *Aphanothece microscopica Nägeli*, apresentam a distinta capacidade de obtenção de energia a partir do consumo de substratos orgânicos na ausência de luminosidade (Queiroz *et al.*, 2007). A elevada concentração de matéria orgânica do meio resulta em uma razão C/N adequada para suportar o cultivo heterotrófico de microalgas. Meios de cultivo como o BGN apresentam pouca fonte orgânica de carbono, de modo que a adição de compostos de fácil assimilação é interessante para manter o metabolismo das microalgas durante o período de escuro, surgindo também como uma alternativa para intensificar a produção de biomassa.

O cultivo heterotrófico, suportado por uma fonte exógena de carbono, é uma importante forma de produção de metabólitos de interesse comercial. As fontes de carbono orgânico específicas, para o desempenho metabólico ideal, de cada espécie de microalga ainda são desconhecidas. A glicose é mais comumente usada, em função do seu teor energético mais elevado do que a maioria dos substratos orgânicos, porém seu uso pode implicar na elevação dos custos do meio de cultivo. Segundo Wei *et al.* (2009) uma das maneiras de reduzir custos

no cultivo heterotrófico está na redução dos custos do substrato. Estes autores relatam que 80% dos custos médios de um meio de cultivo está no uso da glicose como fonte de carbono orgânico, sugerindo que o uso de materiais de baixo custo, como amidosé uma boa estratégia na direção de redução de custos.

A construção de instalações para o cultivo heterotrófico é facilitada por ser um processo simples e barato. No entanto, nem todas as espécies podem crescer heterotroficamente e o uso de substratos adequados é necessário. A composição bioquímica da biomassa das microalgas é determinada pela natureza de cada espécie algal, de fatores como a intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e concentração de CO<sub>2</sub> (Miao & Wu, 2004). Através da manipulação dessas condições pode-se obter uma maior quantidade de um metabólito de interesse.

Neste sentido, o trabalho teve como objetivo analisar o desempenho da *Aphanothece microscopica Nægeli* na conversão heterotrófica de de amido de milho e mandioca como fontes de carbono orgânico.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### **Microrganismos e meio de cultura:**

As culturas da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* foram propagadas e mantidas em meio padrão BGN, com a seguinte composição: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3g. 100mL<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (7,5g. 100mL<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O (3,6g. 100mL<sup>-1</sup>), Citrato de amônio e ferro III (0,6g. 100mL<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub> EDTA (0,1g. 100mL<sup>-1</sup>), NaCl (7,2g. 100mL<sup>-1</sup>), NaNO<sub>3</sub> (150g.L<sup>-1</sup>), Ácido cítrico (0,06g. 100mL<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,2g. 100mL<sup>-1</sup>), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (2,86g.L<sup>-1</sup>), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,816g.L<sup>-1</sup>), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,222g.L<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,390g.L<sup>-1</sup>), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,079g.L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,040g.L<sup>-1</sup>).

### **Biorreator e condições de cultivo:**

Os experimentos foram conduzidos em um biorreator de coluna de bolhas com relação altura/diâmetro (L/D) igual a 1,28, com volume de trabalho de 2L. As condições experimentais foram em meio sintético BGN, adicionado de amido de mandioca e amido de milho visando obter uma razão C/N de 68, 100mg/L do inóculo, pH de 7,6, temperatura de 30°C, aeração contínua de 1VVM (volume de ar por volume de meio de líquido por minuto) e ausência de luminosidade. Os ensaios foram conduzidos em meio de cultivo BGN contendo 20g/L de amido de milho e posteriormente o ensaio foi repetido nas mesmas condições, utilizando-se 20g/L de amido de mandioca.

### **Métodos Analíticos:**

As amostras foram coletadas em intervalos de 24h e caracterizadas quanto ao pH, demanda química de oxigênio (DQO) e concentração celular. O pH foi determinado por

potenciometria, a demanda química de oxigênio foi determinada conforme a metodologia descrita no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). A concentração celular foi determinada gravimetricamente por meio da filtração de um volume conhecido do meio de cultivo em filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os testes foram realizados em duplicata e os dados cinéticos referem-se à média de duas repetições. Ao final de cada experimento as biomassas resultantes foram coletadas e secas em estufa à 60°C para posterior análise de lipídeos pela técnica proposta por Bligh e Dyer (1959).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A Tabela 1 apresenta os parâmetros cinéticos de crescimento de *Aphanothece microscopica Nægeli* utilizando amido de mandioca e milho como fonte de carbono orgânico em cultivos heterotróficos.

Tabela 1 Parâmetros cinéticos obtidos utilizando amido de mandioca e milho como fonte de carbono orgânico

Parâmetro	Amido de mandioca	Amido de milho
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,012	0,011
tg (h)	57,7	63
$P_x$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	19,16	17,63
$r_{\text{máx}}$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	-44,13	-24,7
Lipídio (%)	5,93	6,66
$P_L$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	1,13	1,17

A análise dos resultados indica que o amido de milho, como fonte de carbono orgânico no cultivo heterotrófico da *Aphanothece microscopica Nægeli*, resultou em produtividades celulares médias de 17,63 mg/L.h e velocidade máxima específica de crescimento celular de 0,011  $\text{h}^{-1}$ . Em paralelo a biomassa apresentou um teor de lipídios de 6,66%, resultando em uma produtividade em lipídios de 1,17 mg/L.h. Adicionalmente, os resultados obtidos com o amido de mandioca indicaram produtividades celulares médias de 19,16 mg/L.h e velocidades máximas específicas de crescimento celular de 0,012  $\text{h}^{-1}$ . Nestas condições a biomassa apresentou um teor de lipídios de 5,93% e uma produtividade em lipídios de 1,13 mg/L.h. Um melhor desempenho foi evidenciado usando amido de mandioca como substrato orgânico, pois resultou em uma maior produção de biomassa em um menor tempo de geração. Estes resultados podem estar associados as reservas energéticas com estruturas semelhantes presentes em cianobactérias. Estes micro-organismos possuem como reserva endógena o chamado amido cianofíceo, cuja estrutura química é bastante similar a estrutura da amilopectina encontrada nas plantas superiores (Francisco *et al.*, 2014). Neste sentido as células já estão adaptadas a este substrato o que torna mais fácil a assimilação de amidos com maior teor de amilopectina em sua estrutura, como é o caso do amido de mandioca.

A avaliação do efeito da fonte de carbono no cultivo heterotrófico de cianobactérias e microalgas é objeto de estudos recentes na literatura. A glicose é mais comumente usada, porém seu uso pode implicar na elevação dos custos do meio de cultivo. Liang *et al.* (2009), trabalhando com *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico, verificaram que a adição de 1 e 2% de glicose ao meio de cultivo proporcionou melhor crescimento do que 5 e 10%, sugerindo 1% como a concentração ideal a ser utilizada para se obter elevada produtividade de biomassa e lipídios pela microalga. Segundo Martinez *et al.* (1991) a glicose atuando como substrato orgânico promoveu mudanças fisiológicas nas cepas de *Chlorella vulgaris* que afetaram a via metabólica de assimilação do carbono, tamanho da célula, densidade volumétrica de material de armazenamento, como grânulos de amido e lipídios. Os açúcares são os substratos mais utilizados como fonte de carbono orgânico no cultivo heterotrófico, especialmente a glicose (Miao & Wu, 2006; Xu *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2009; Heredia-Arroyo *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010; OGrady & Morgan, 2011), porém outras fontes orgânicas de carbono podem ser utilizadas, tais como glicose e hidrolisado de amido de mandioca (Wei *et al.*, 2009), glicose (Wei *et al.*, 2009; OGrady & Morgan, 2011) e misturas de glicerol e glicose (OGrady e Morgan, 2011).

#### 4. CONCLUSÃO

A utilização do amido de mandioca resultou em melhores desempenhos para o cultivo heterotrófico da *Aphanothece microscopica Nägeli*. Os resultados obtidos indicaram máximas produtividades em biomassa de 19,16mg/L.h em paralelo a produtividades lipídicas de 1,13mg/L.h.

As microalgas constituem uma fonte alternativa potencial na obtenção de bioprodutos. Aliado a obtenção de metabólitos de interesse, com alto valor agregado, está a possibilidade de redução de custos no cultivo destes microrganismos através do uso de compostos de fácil assimilação e baixo custo, como os amidos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Com. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.

FRANCISCO, E. C.; FRANCO, T.T.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E. (2014) Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation. *Bioprocess BiosystEng*, 2014.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. (2010) Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol.162, p. 1978–1995

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CU, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, Netherlands, v. 31, p. 1043-1049, 2009

MARTINEZ, F.; ASCASO, C.; ORUS, M.I. (1991) Morphometric and stereologic analysis of *Chlorella vulgaris* under heterotrophic growth conditions. *Annals of Botany*, vol.67, p. 239-245.

MIAO, X.; WU, Q. (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*, vol.110, p. 85-93

MIAO, X.; WU, Q. (2006) Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, vol.97, p. 841–846.

OGRADY, J.; MORGAN, J.A. (2011) – Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol.34, p. 121–125.

QUEIROZ, M.I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q.; BASTOS, R.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology*. v.98 n.98 p.2163-2169, 2007.

SHEN, Y.; YUAN, W.; PEI, Z.; MAO, E. (2010) Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol.160, p. 1674–1684.

WEI, A.L.; ZHANG, X.W.; WEI, D.; CHEN, G.; WU, Q.Y.; YANG, S.-T. (2009) Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol.36, p. 1383–1389.

XU, H.; MIAO, X.L.; WU, Q.Y. (2006) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, vol.126, p. 499–507.