

AValiação DOS METABÓLITOS PRODUZIDOS POR FOTOFERMENTAÇÃO POR CIANOBACTÉRIAS

L.P. VAZ¹, J. S. FERREIRA²

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Biotecnologia

² Universidade Federal de Uberlândia, Professora da FEQUI/UFU

E-mail para contato: luisapiresvaz@gmail.com

RESUMO – As cianobactérias são microrganismos procariontes com grande impacto sobre o ciclo de carbono, reciclagem do oxigênio global e de fixação do nitrogênio. Elas têm sido amplamente estudadas pelo seu potencial de fixar o CO₂, com energia obtida fotossinteticamente, para síntese de produtos de alto valor agregado, como, compostos antimicrobianos, antivirais e anticancerígenos, toxinas, fitohormônios, biocombustíveis de terceira geração e ácidos orgânicos. A proposta deste trabalho foi identificar os possíveis metabólitos (etanol e ácidos orgânicos) sintetizados pelas cianobactérias *Nostoc* sp PCC 7423 e *Anabaena variabilis* ATCC 29413, por fotofermentação. Foi avaliado a influência do enriquecimento do meio BG11₀, usando glicose como fonte de carbono orgânico, em fotoperíodo de 12h a 30°C por até 7 dias de processo. Verificou-se que houve a formação de ácido acético por *A. variabilis* em meio BG11₀ e produção de etanol por *Nostoc* sp em meio enriquecido com glicose.

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são organismos procariontes, fotoautotróficos, gram-negativas, podendo ser filamentosas ou unicelulares e estão entre as formas de vida mais bem sucedidas e antigas ainda presentes na Terra (GADEMANN e PORTMANN, 2008). Graças a adaptações bioquímicas, fisiológicas, genéticas e reprodutivas estes organismos foram capazes de colonizar diversos tipos de ecossistemas terrestres e aquáticos. Sua longa história evolutiva proporcionou grande diversidade morfológica e fisiológica, incluindo a produção de metabólitos secundários, os quais despertam interesse comercial por possuírem atividades biológicas importantes (BAJPAI, 2013). Entretanto, o único processo economicamente viável realizado atualmente é o do cultivo das cianobactérias em tanques abertos, visando o uso em suplementação alimentar de animais, extração de pigmentos, além de biomassa para produção de biocombustíveis (HALLENBECK, 2012).

Em relação aos metabólitos obtidos por esses microrganismos, pode-se citar compostos bioativos, que demonstram atividades antitumorais, antivirais, antibacteriana, antifúngica, antimalárica, antimicóticas, antiproliferativos e agentes imunossupressores e que, devido à sua elevada estabilidade química e solubilidade em água, tem aplicações importantes em indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos (TAN, 2007). Além disso, podem secretar enzimas exploradas comercialmente, tais como a beta-lactamase e a lipase (PRABHAKARAN *et al.*, 1994) e ainda, são capazes de sintetizar biopolímeros, tais como o

PHB (poli- β - hidroxibutirato), um polímero em potencial para a produção de bioplástico por apresentar características de biodegradabilidade, termoplasticidade, biocompatibilidade com células e tecidos humanos, possível aplicação para a produção de nanofibras, além de ser proveniente de fonte renovável (SHARMA, 2005).

As cianobactérias também são capazes de sintetizar ácidos orgânicos, dentre os quais se encontra o ácido láctico, um produto de grande interesse econômico, sendo este muito utilizado na indústria alimentícia como acidulante e flavorizante e para a produção de polímeros biodegradáveis. Entretanto, os ácidos orgânicos não são sintetizados em grande quantidade pelas cianobactérias, devido à utilização do carbono fixado para a manutenção celular (ANGERMAYR *et al.*, 2014). Com relação aos biocombustíveis, que são uma das alternativas para suprir a escassez futura de recursos fósseis, pois são advindos de fontes renováveis e apresentam baixos custos de produção, o etanol pode ser sintetizado pelas cianobactérias, o qual é um subproduto do ciclo do Calvin (HALLENBECK, 2012).

Uma das formas de induzir a produção de metabólitos secundários é pelo processo fermentativo, ou seja, garantir a anaerobiose do meio para que a rota metabólica do microrganismo seja alterada, e desta forma haja a produção do ácido de interesse. Diante deste contexto, a proposta deste trabalho foi avaliar o potencial de produção de diferentes metabólitos por fotofermentação de duas espécies de cianobactérias: *Anabaena variabilis* ATCC 29413 e *Nostoc sp.* PCC 7423. Foi analisada a influência da composição do meio de cultivo, empregando meio BG11₀ (sintético) como meio autotrófico e meio enriquecido com glicose, usada como fonte de carbono orgânico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e Condições de Cultivo

As cepas de cianobactérias utilizadas, *Nostoc sp* PCC 7423 e *Anabaena variabilis* ATCC 29413, foram cedidas pela Unidade de Pesquisa em Cianobactérias da FURG (RS). Elas foram cultivadas em meio BG11₀ (RIPPKA *et al.*, 1979). O cultivo das cianobactérias foi feito em uma câmara com fotoperíodo de 12 h e intensidade luminosa de 1800 lux a 30 °C.

2.2. Preparação dos Frascos para Fermentação

Para realizar a fermentação, toda a vidraria (pipeta, funis, frascos de penicilina, Erlenmeyers) e meio utilizados foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min, a fim de evitar uma possível contaminação. Os frascos foram inoculados em câmara de fluxo laminar esterilizada com álcool 70% e luz ultravioleta por 15 min. Os ensaios de fotofermentação foram realizados em batelada usando frascos de penicilina de 15 mL de volume útil, sendo 1,125 mL o volume do inóculo. Como o intuito do trabalho foi avaliar o desempenho das duas espécies para as diferentes condições de meio, foram preparados dois tipos: (i) meio BG11₀; (ii) meio BG11₀ suplementado com glicose (5 g/L). Para garantir a

anaerobiose do meio, foi borbulhado gás argônio (Ar; 99,999%) durante 3 minutos em cada frasco. Em seguida, os frascos foram selados com septos de borracha butílica e lacrados com uma cápsula de alumínio. Seringas de 5 mL graduadas foram colocadas como válvula de escape, caso ocorresse a produção de algum biogás. Frascos de sacrifícios foram utilizados permitir a análise da composição do meio fermentativo e de células para intervalos diferentes de tempo (Figura 1). As análises foram feitas no terceiro e no sétimo dia de fotofermentação e em triplicata.

Figura 1 – Fotofermentação por cianobactérias em batelada usando frascos de penicilina.



2.3. Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular inicial e final foi realizada através do método gravimétrico, correlacionando a medida da absorbância do inóculo dos microrganismos através de um espectrofotômetro (GENESYS) e a massa de sólidos voláteis (SV) (BERBEROĞLU et al., 2008). A densidade óptica a 647 nm (OD_{647}) foi medida em um espectrofotômetro, e para cada cepa foram obtidas duas curvas de calibração, uma para cada comprimento de onda.

2.4. Análise das amostras

O meio de fermentação foi analisado para a determinação de glicose consumida e metabólitos (ácidos orgânicos e etanol) formados. Utilizou-se o método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) realizada no cromatógrafo marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL C-610H. Empregou-se como fase móvel ácido fosfórico (0,1%), operou-se com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno 32°C e volume de injeção de 20 μ L.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cianobactérias são microrganismos fotossintetizantes, mas que também podem se desenvolver em meios anóxicos, resultantes do cultivo na ausência de luz. A capacidade de cianobactérias empregarem rotas metabólicas alternativas na condição de meios anaeróbios e no escuro, pode levar à síntese de produtos de valor comercial por fermentação, como CO_2 , H_2 , ácidos acético, fórmico, láctico e etanol (STAL e MOEZELAAR, 1997). Neste estudo,

investigou-se os possíveis metabólitos que podem ser formados por fermentação pelas cianobactérias *Nostoc* sp PCC 7423 e *Anabaena variabilis* ATCC 29413, em meio BG11₀, enriquecido ou não com glicose (5 g/L), sob anaerobiose e em fotoperíodo de 12 h. Os resultados de concentração de glicose consumida e dos metabólitos identificados são apresentados na Tabela 1 e o perfil de concentração celular por 7 dias está ilustrado na Figura 2.

Tabela 1: Dados da fermentação por *Nostoc* sp PCC 7423 e *Anabaena variabilis* ATCC 29413 durante 7 dias, em meio BG11₀ sem e com glicose, sob fotoperíodo de 12 h.

Cepa	Composição do meio	Tempo (dias)	C _{glicose} (g/L)	C _{etanol} (g/L)	C _{ácido acético} (g/L)
<i>Anabaena variabilis</i>	BG11 ₀	0	----	---	---
		3	----	---	0,25
		7	----	---	---
	BG11 ₀ + glicose	0	5,00	---	---
		3	0,61	---	---
		7	0,44	---	---
<i>Nostoc</i> sp	BG11 ₀	0	----	---	---
		3	----	---	---
		7	----	---	---
	BG11 ₀ + glicose	0	5,00	---	---
		3	1,46	0,12	---
		7	0,90	0,20	---

Sob as condições de fermentação, verificou-se que apenas a cepa *Nostoc* sp produziu etanol em meio enriquecido com glicose, sendo que a concentração foi de 0,12 g/L e 0,20 g/L para 3 dias e 7 dias de fermentação, respectivamente. Portanto, verificou-se que a condição de meio heterotrófico favoreceu a produção do etanol para esta cepa. O segundo metabólito identificado foi o ácido acético. No entanto, houve a produção de 0,25 g/L deste composto somente pela *Anabaena variabilis* em meio BG11₀ sem glicose.

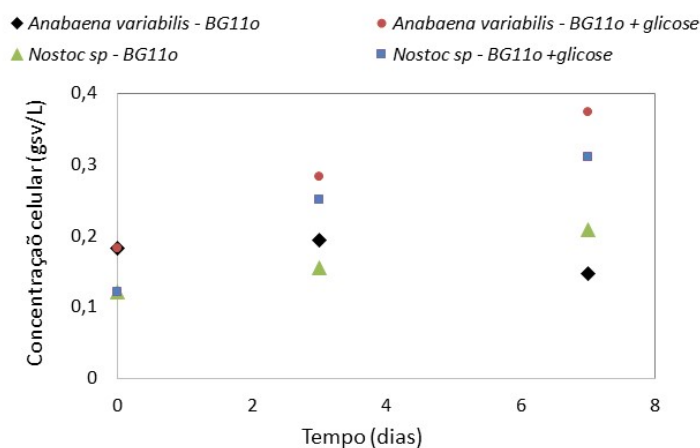
De acordo com o estudo realizado por Moezelaar e Stal (1997), a cianobactéria *Microcystis* PCC7806, produziu quantidades equimolares de ácido acético e etanol ao fermentar o glicogênio armazenado, em meio anaeróbico e no escuro. Quando as cepas foram cultivadas em fotoperíodo de 16h de luz e 8 h no escuro, houve uma produção de etanol. A influência do enriquecimento com fonte de carbono orgânico também foi empregada por Costa et al. (2015) para a produção de etanol por fotofermentação pela alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Neste trabalho, foi alcançada uma produção de 19,25 g/L de etanol em meio TAP com depleção de enxofre e sem adição de lactose ao meio. Além do etanol, também foram produzidos os ácidos propiônico e acético.

Os dados obtidos neste trabalho indicaram que as cepas avaliadas *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp podem produzir ácido acético e etanol, dependendo das condições de fermentação. Entretanto, faz-se necessário ampliar o número de parâmetros a serem investigados no intuito de compreender a influência das condições de processo que levam a alteração da rota metabólica destes microrganismos, induzindo a formação de ácidos orgânicos e etanol. Portanto, outras variáveis como fotoperíodo, intensidade luminosa, temperatura, concentração

de célula e de fonte de carbono, tipo de fonte de carbono e tempo de fermentação devem ser estudadas.

Com relação ao crescimento celular, foi verificado que o meio heterotrófico induziu o aumento da biomassa, sendo que a concentração de células sofreu um acréscimo de 2 vezes para *Anabaena variabilis* e de 2,6 para *Nostoc sp*, em 7 dias. Principalmente no caso da *Anabaena variabilis*, houve consumo de glicose somente para crescimento celular sem produção de metabólitos como ocorreu no ensaio empregando a *Nostoc sp*. Para o meio BG11₀, este aumento foi de 1,7 vezes para a *Nostoc sp*, variando de 0,12 g/L para 0,21 g/L ao final do ensaio. Entretanto, para a *Anabaena variabilis*, foi verificado um aumento da concentração celular de 0,18 g/L para 0,19 g/L nos 3 primeiros dias de ensaio e, posteriormente, a concentração de célula foi de 0,15 g/L em 7 dias de fermentação.

Figura 2 – Variação de concentração celular em função do tempo.



4. CONCLUSÕES

As cianobactérias asseguram um futuro promissor devido às inúmeras possibilidades de metabólitos ainda não explorados, seu fácil cultivo e baixo custo de manutenção. Este trabalho identificou a produção de ácido acético por *Anabaena variabilis* em meio autotrófico e de etanol em meio enriquecido com glicose por *Nostoc sp*. O estudo demonstra que a exploração de parâmetros de cultivo podem levar à compreensão do como as condições de fotofermentação podem influenciar as rotas metabólicas das cianobactérias e aumentar a produção destes compostos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Uberlândia e a Faculdade de Engenharia Química pela oportunidade em realizar este trabalho, à Unidade de Pesquisa em Cianobactérias da FURG (RS) pela doação das cepas e ao apoio financeiro da FAPEMIG, do CNPq e da CAPES.

6. REFERÊNCIAS

- ANGERMAYR, S. A., et al. Exploring metabolic engineering design principles for the photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnology for Biofuels*. v. 7:99, p.1-15, 2014.
- BAJPAI, R.D.; SUSEELA, M.R. Cyanobacteria: potencial candidates for drug discovery. *Springer*. v. 103, p.947-961, 2013.
- BERBEROĞLU, H, JAY, J., PILON, L. Effect of nutrient media on photobiological hydrogen production by *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *International Journal Of Hydrogen Energy*. v. 33, p. 1172–1184, 2008.
- COSTA, R.L, OLIVEIRA, T.V., FERREIRA, J.S , CARDOSO, V.L., BATISTA, F.R.X. Prospective technology on bioethanol production from photofermentation. *Bioresource Technology*. v.181, p. 330-337, 2015.
- GADEMANN, K.; PORTMANN, C. Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities. *Curr Org Chem* . v. 12, p. 326–341, 2008.
- HALLENBECK, P. C. Hydrogen Production by Cyanobacteria. *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*. p. 15-28, 2012.
- MOEZELAAR, R., STAL, L.J. A comparison of fermentation in the cyanobacterium *Microcystis* PCC7806 grown under a light/dark cycle and continuous light. *European Journal of Phycology*.v. 32, p. 373-378, 1997.
- PRABHAKARAN, D.; SUMATHI, M.; SUBRAMANIAN, G. Ability to use ampicillin as nitrogen source by marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 30501. *Curr. Microbiol*. v. 28, p, 315–320, 1994.
- RIPPKA R, DESRUELLES J, WATERBURY JB, HERDMAN M, STANIER RY. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol*. v. 111, p. 1-61, 1979.
- SHARMA, L.; MALLICK, N. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1304-1310, 2005.
- STAL, L.J., MOEZELAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. v. 21, p. 179–211, 1997.
- TAN, L.T. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry*. v. 68, p. 954–979, 2007.