

Cultivo da microalga *Galdieria sulphuraria* utilizando como fonte de carbono subprodutos da produção de etanol

Cultivation of the microalgae *Galdieria sulphuraria* using as a carbon source byproducts of ethanol production

RESUMO

Larissa Silva de Oliveira
larissa.1998@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney
eduardosydney@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

A microalga poli-extremófila *Galdieria sulphuraria* pode ser encontrada em fontes termais de ácido sulfúrico, é de grande interesse biotecnológico. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento da microalga utilizando como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar não hidrolisado, o melhor ácido para crescimento da *G. sulphuraria* e para hidrolisar o bagaço, e comparar o crescimento utilizando como meio de cultivo melaço sem fonte de nitrogênio e com fontes de nitrogênio. Durante o estudo obteve-se como resultados que o ácido clorídrico apresentou melhor desempenho tanto no crescimento da microalga como na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, e que o melaço sem fonte de nitrogênio apresentou melhor produção de células. O presente estudo permite abertura para estudos futuros sobre inibidores de fermentação formados através de hidrólises ácidas e sobre o processo adaptativo da *Galdieria sulphuraria*.

PALAVRAS-CHAVE: Cultivo em melaço. Bagaço não hidrolisado. *Galdieria sulfuraria*. Bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

The polyd extremophilic microalgae *Galdieria sulphuraria* can be found in hot springs of sulfuric acid, it's of great biotechnological interest. The objective of the present study was to evaluate the growth of microalgae using unhydrolyzed sugarcane bagasse as the carbon source, the best acid for growth of *G. sulphuraria* and to hydrolyze the bagasse, and to compare growth using cultivation molasses without nitrogen source and with nitrogen sources. During the study it was obtained as results that the hydrochloric acid presented better performance in the microalgae growth and sugarcane bagasse hydrolysis, and that the molasses without nitrogen source presented better cell production. The present study allows opening for future studies on fermentation inhibitors formed by acid hydrolysis and on the adaptive process of *Galdieria sulfuraria*.

KEYWORDS: Cultivation in molasses. Unhydrolyzed bagasse. *Galdieria sulfuraria*. Sugarcane bagasse

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A *Galdieria sulphuraria* é um microrganismo pertencente ao grupo das microalgas, que pode ser encontrada em fontes termais de ácido sulfúrico (HIROOKA; MIYAGISHIMA, 2016). Como o Brasil é o maior produtor de cana de açúcar do mundo, o qual é encaminhado para produção de etanol e alimentos. O bagaço gerado vem sendo utilizado para produção de energia (MARINHO et al., [s.d.]).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o crescimento da microalga *Galdieria sulphuraria* utilizando como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar não hidrolisado, o melhor ácido para crescimento e para hidrolisar o bagaço, e comparar o crescimento utilizando como meio de cultivo melaço sem fonte de nitrogênio e com fontes de nitrogênio.

METODOLOGIA

MANUTENÇÃO DO CULTIVO MÃE

Para o preparo do meio de cultivo mãe foi preparado uma solução um com volume de 300 mL de melaço 1% em um erlenmeyer, com o ajuste de pH igual a 3 realizado pela adição do ácido fosfórico. Em seguida o erlenmeyer foi vedado com papel alumínio e preparado um tampão de algodão com gaze que fora autoclavado (sob a temperatura de 121 °C e a pressão constante de 1 atm por 15 min) dentro de um béquer vedado por papel kraft, o material junto com ponteiros de 5 mL e de 200 µL para esterilizar e eliminar qualquer outra espécie de microrganismo

Após autoclavado, o microrganismo foi inoculado dentro do fluxo laminar foi inoculado a partir de um meio de cultivo padrão do laboratório um volume de 20% de *G. sulphuraria* em relação ao meio preparado.

DETERMINAÇÃO DO MELHOR ÁCIDO

O meio de cultivo utilizado para *Galdieria sulphuraria* é o meio *Allen medium* (Tabela 1), as quantidades dos sais para o preparo deste meio são encontradas para o preparo de um litro, porém foi preparado para cada etapa uma quantia de 100 mL em erlenmeyer.

Tabela 1 – Composição do meio *Allen medium*

Reagente	Quantidade
(NH ₄) ₂ SO ₄	9,99 x 10 ⁻³ mol/L
KH ₂ PO ₄	1,98 x 10 ⁻³ mol/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,01 x 10 ⁻³ mol/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	5,03 x 10 ⁻⁴ mol/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	3,96 x 10 ⁻⁵ mol/L
Solução micronutrientes <i>Allen</i>	1 x 10 ⁻³ L

Fonte: *Allen medium* (s.d.).

Durante o preparo dos meios foram pesados os sais listados (Tabela 1) em seis erlenmeyers e adicionado 100 mL de água destilada em cada. Em seguida a cada dois erlenmeyer foi acidificado o meio até o pH de 2,55 utilizando um pHmetro para monitoramento, utilizando o ácido clorídrico, ácido fosfórico e ácido sulfúrico, e utilizando a mesma quantidade de erlenmeyer foi pesado 5g do bagaço de cana, e em seguida autoclavado. Posteriormente foi vertido os meios cada qual para um erlenmeyer com bagaço, e adicionado 20 mL do inoculo mãe em cada erlenmeyer de bagaço. E em seguida foi retirado uma amostra de 200 μ L para realizar contagem pela Câmara de Neubauer, considera-se o dia em que o microrganismo é inoculado como dia zero, repetir a contagem à cada 24 h durante treze dias.

Os erlenmeyers foram levados ao shaker em uma temperatura de 45 °C a 115 rpm. Foi determinado o melhor ácido após treze dias pela contagem na Câmara de Neubauer, em seguida traçado um gráfico (Número de células x Dias) para cada ácido, e determinado o melhor ácido a ser utilizado. E foi realizado uma análise de açúcares totais nos três erlenmeyers onde não fora adicionado inóculo, através do método fenol-sulfúrico.

A. MÉTODO FENOL-SULFÚRICO

Primeiramente, após sete dias fora retirado uma amostra de 2 mL de cada erlenmeyer que não continha microalga e armazenado em um eppendorf, em seguida centrifugado por dez minutos à 17000 rpm.

Posteriormente, foi preparado uma curva padrão de glicose 100 mg/L com algumas diluições, foi realizado a leitura no espectrofotômetro na faixa de 595 nm para determinar a concentração dos açúcares totais em cada amostra. Em um volume de 0,5 mL das três amostras diluídas na proporção de 1/10 foi adicionado 0,5 mL ácido fênico e 2,5 mL de H₂SO₄, em seguida realizada a leitura.

CULTIVO DA MICROALGA EM MELAÇO DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO

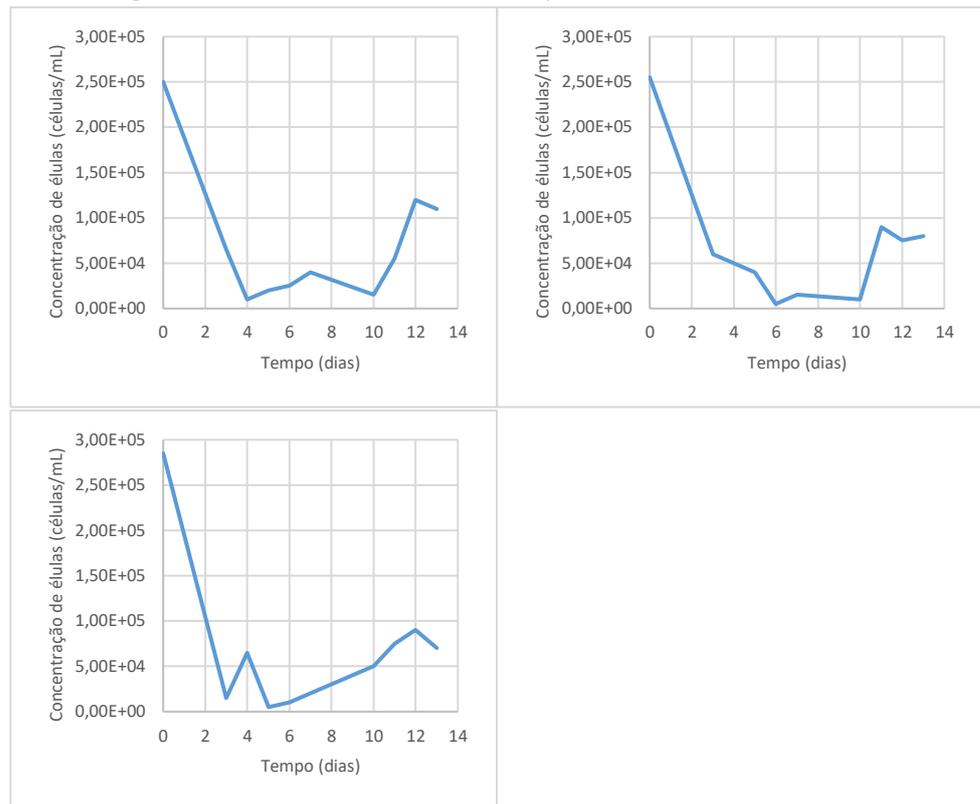
Foi preparado uma solução com volume de 100 mL de melaço 1% em três erlenmeyers de 250 mL com pH ajustado em 3 através do ácido fosfórico, em que foi testado a influência da presença e ausência de uma fonte inorgânica de nitrogênio, através da relação C/N igual a 30 tendo como fontes o nitrato de sódio e sulfato de amônio. Como parâmetro para determinar esta influência foi utilizado o método de contagem de células pela Câmara de Neubauer (conforme descrito do item 2) em relação ao dia inicial e final.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

DETERMINAÇÃO DO MELHOR ÁCIDO

Foram testados três ácidos diferentes para a hidrólise e crescimento da microalga *Galdieria sulphuraria*. Após os treze dias do cultivo da microalga montou-se uma curva de crescimento, conforme as figuras 2,3 e 4.

Figura 2,3,4 Curva de crescimento *G. sulphuraria* em HCl, H₃PO₄ e H₂SO₄

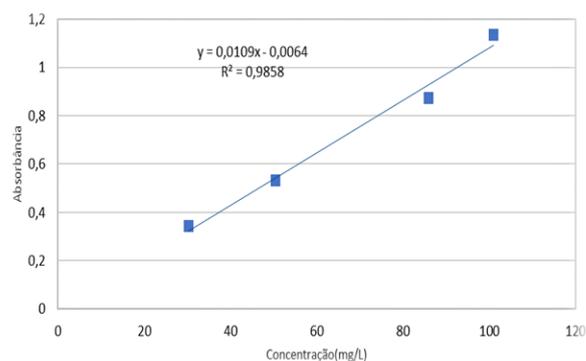


Fonte: Autoria própria.

Notou-se que nos primeiros quatro dias no HCl, nos primeiros seis dias do H₃PO₄ e nos primeiros cinco dias do H₂SO₄ houve uma redução no número de células o pode ser explicado como período de adaptação e o tempo em dias que a hidrólise pode levar para começar. Nota-se o início da adaptação entre os dias quatro e seis. E com base nas curvas de crescimento é possível constatar que o melhor ácido fora o ácido clorídrico que teve o dia doze como o dia com maior número de células e no dia quatorze notou-se o início da fase de decaimento.

No sétimo dia foi retirado uma amostra dos meios que não continham o inoculo para análise de açúcares totais, a figura 5 apresenta a curva padrão da glicose.

Figura 5 – Curva padrão da glicose



Fonte: Autoria própria.

A partir da curva padrão da glicose obteve-se a equação da reta, e por meio desta calculou-se as concentrações de açúcares nas amostras. Substituindo-se os valores de absorvância obtidos das amostras no y da equação o obteve-se as concentrações de açúcares totais, conforme a tabela abaixo:

Tabela 2 – Valores de absorvância e concentração de açúcares totais

Amostra	Absorvância (nm)	Concentração (mg/L)
HCl	0,2816	26,4220
H ₃ PO ₄	0,2550	23,9816
H ₂ SO ₄	0,2511	23,6238

Fonte: Autoria própria.

Conforme os valores de concentrações obtidos, é possível afirmar que o ácido clorídrico hidrolisou mais naturalmente o bagaço da cana-de-açúcar apresentando uma concentração maior de açúcares totais e resultou na maior produção de células, e o ácido que obteve menor desempenho pode-se afirmar que foi o ácido sulfúrico o qual apresentou a menor concentração de açúcares totais e um tempo de vinte quatro horas a mais que o ácido fosfórico para terminar a fase exponencial de crescimento.

CULTIVO EM MELAÇO DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO

Com os valores obtidos pelo método de contagem inicial e final do crescimento da *Galdieria sulphuraria*, determinou-se a produção (células/L) e produtividade (células/L.dia) conforme a tabela 3.

Tabela 3 – Produção e produtividade

Amostra	Inicial (células/L)	Final (células/L)	Produção (células/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,00 x 10 ⁵	1,05 x 10 ⁶	3,50 x 10 ⁵
NaNO ₃	6,90 x 10 ⁵	1,02 x 10 ⁶	3,30 x 10 ⁵
Sem nitrogênio	4,05 x 10 ⁵	1,01 x 10 ⁶	6,05 x 10 ⁵

Fonte: Autoria própria.

Com base nos valores de produção e produtividade assumiu-se que a melhor condição fora o melaço sem adição de nenhuma fonte de nitrogênio, porém embora o nitrogênio não tenha se mostrado benéfico neste experimento, devido a problemas técnicos que influenciaram a qualidade da cepa utilizada, o resultado obtido pode ser discrepante de um resultado ideal, se fazendo necessário repetir o experimento para uma análise concreta.

CONCLUSÃO

A *Galdieria sulphuraria* demonstra uma grande versatilidade no estudo de fontes de carbono, apresentando crescimentos em subprodutos da produção de etanol como bagaço de cana-de-açúcar.

Conforme os valores de concentrações de açúcares totais obtidos para a determinação do melhor ácido, é possível afirmar que o ácido clorídrico não só foi o melhor para o crescimento da microalga como o também o melhor ácido para hidrolisar o bagaço da cana-de-açúcar. Apesar do resultado obtido no crescimento ter sido extremamente baixo, contudo o estudo da hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar no *shaker* permite a abertura de futuros estudos como a influência da formação de hidroximetilfurfural e furfural que segundo a literatura são inibidores de fermentação, e além da possibilidade de analisar mais o processo adaptativo da microalga partindo de um cultivo no meio Allen inoculado a partir de um meio com melaço, para um novo meio *Allen Medium* inoculando a partir do dia onde a microalga atinge seu ponto máximo de crescimento.

De acordo com os resultados obtidos do melaço de cana-de-açúcar será possível realizar estudos de aplicações biotecnológicas visando a produção de biomassa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Araucária pelo incentivo financeiro. Ao Professor Dr. Eduardo pela oportunidade de trabalhar neste projeto, por toda orientação. Aos meus pais por tornarem isso possível. E aos meus amigos por todo apoio.

REFERÊNCIAS

Allen Medium. Disponível em: <<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/media/table/allen.html>>. Acesso em: 2 jul. 2019.

HIROOKA, Shunsuke; MIYAGISHIMA, Shin-ya. Cultivation of Acidophilic Algae *Galdieria sulphuraria* and *Pseudochlorella* sp. YKT1 in Media Derived from Acidic Hot Springs. **Frontiers in Microbiology**, v. 07, 20 dez. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.02022/full>>. Acesso em: 17 maio 2019.

MARINHO, Fabiana Bezerra et al. **RESÍDUO DA AGROINDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA – VINHAÇA.** [s.d.]. Disponível em: <<http://www.revistaea.org/pf.php?idartigo=2548>>. Acesso em: 28 maio 2019.