



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

XI Seminário de Extensão e Inovação
XXVI Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica
08 a 12 de Novembro - Guarapuava/PR



Cultivo da microalga *Galdieria sulphuraria* em diferentes fontes de carbono

CULTIVATION OF THE GALDIERIA SULPHURARIA MICROALGAE ON DIFFERENT CARBON SOURCES

Gustavo Ryuske Hamaguti^{a*}, Eduardo Bittencourt Sydney^a, Bárbara Ruivo Válio Barretti^b

RESUMO

A *Galdieria sulphuraria* é uma microalga extremófila com características únicas, com capacidade de desenvolvimento em pH 0,5 - 4, temperaturas até 56° C, utilizando de metabolismo auto, mixo e heterotrófico. Diferentemente das demais *Cyanidiales*, ela consegue se desenvolver em mais de 50 fontes de carbono. Visando analisar e comparar o crescimento de biomassa em diferentes fontes de carbono, foram preparados dois meios sintéticos iguais, um com adição de glicose e outro com adição de amido de milho. Foi realizada contagem periódica de células, em câmara de Neubauer. Os dados demonstraram que o crescimento da *G. sulphuraria* em fonte amilácea apresentou um ciclo de vida mais prolongado, mas resultando na produção de 7x mais biomassa quando comparada a glicose. Considerando esse resultado, meios enriquecidos de amido e/ou resíduos amiláceos podem ser promissores para o uso comercial em larga escala, podendo-se agregar um valor comercial maior a subprodutos das indústrias e diminuindo o capital gasto em pesquisas com fontes de carbono complexas.

Palavras-chave: Microbiologia, amido, glicose.

ABSTRACT

Galdieria sulphuraria is an extremophile microalgae with unique characteristics, such as the ability to develop at pH 0.5-4, temperature up to 56° C, using autotrophic, mixed and heterotrophic metabolism. Unlike other *Cyanidiales*, it manages to develop on more than 50 carbon sources. In order to analyze and compare the biomass growth in different carbon sources, two equal synthetic media were prepared, one with addition of glucose and the other with addition of corn starch. Periodic cell counting was performed in a Neubauer chamber. The data showed that the growth of *G. sulphuraria* in a starch source presented a longer life cycle, but ended up producing 7x more biomass when compared to glucose. Considering this result, media enriched with starch and/or starch residues may be promising for large-scale commercial use being able to add a greater commercial value to by-products of industries and reducing the capital spent on research with complex carbon sources.

Keywords: Microbiology, starch, glucose.

* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil; hamaguti2@gmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa; eduardosydney@utfpr.edu.br

‡ Univesidade Federal Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil; @brvbarretti@gmail.com



1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos muito interesse tem sido focado no potencial biotecnológico das microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por este tipo de microrganismo, a imensa biodiversidade faz com que haja diversos tipos de microalgas com diferentes composições de biomassa e compostos bioativos, com o auxílio do melhoramento genético e o estabelecimento de novas tecnologias para produção em grande escala, o cultivo de microalgas vem tendo grande potencial de expansão no mercado atual. (DERNER, 2006).

A *Galdieria sulphuraria*, pertencente à família das *Cyanidiales*, um grupo de algas vermelhas (*Rhodophyta*), foi a microalga escolhida para esse estudo. Acredita-se que há muito a ser estudado acerca dessa microalga por suas características únicas extremófilas, podendo ser capaz de se desenvolver em pH 0,5~4 e temperaturas até 56 °C, utilizando metabolismo autotrófico, mixotrófico e heterotrófico. Diferente das demais *Cyanidiales*, a *G. sulphuraria* cresce em mais de 50 fontes de carbono, e se desenvolve em diferentes tipos de ambientes, como em pântanos e locais áridos. (YOON; HACKETT; BHATTACHARYA, 2002).

Os carboidratos são as macromoléculas mais abundantes na natureza, e desde o século XII são estudadas por alquimistas, durante esse tempo acreditava-se que essas moléculas tinham como função apenas dar energia ao organismo humano (Fani, 2021) os carboidratos são fontes de carbono e comumente utilizadas por vários microrganismos como fonte de energia para sua sobrevivência e multiplicação, neste estudo focamos em duas fontes de carbono, a glicose e o amido de milho.

A glicose é a principal fonte de carboidratos utilizadas pelas células e tem como função principal ser fonte de energia para os seres vivos, é um monossacarídeo simples $C_6H_{12}O_6$ e são encontradas em formações de carboidratos como: dissacarídeos e polissacarídeos (Fani, 2021). O amido é um polissacarídeo $(C_6H_{12}O_6)_n$ muito encontrado em tubérculos e cereais, são formados por unidades de glicose unidas, essa polimerização da glicose resulta em dois tipos de moléculas, a amilose e a amilopectina. A amilose é um polímero linear e a amilopectina um polímero ramificado, a junção dessas moléculas forma uma estrutura complexa de difícil absorção (CARGILL, 2015), para ser absorvida, necessita-se de um rompimento por hidrólise, físico-química ou enzimática, para a obtenção da glicose, para assim ser absorvida por organismos vivos. (TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012)

As características únicas da microalga *Galdieria sulphuraria* como a capacidade de desenvolvimento em pH 0,5 - 4, temperaturas até 56° C, utilizando de metabolismo auto, mixo e heterotrófico faz com que seu potencial biotecnológico industrial seja enorme, seu crescimento em condições extremófilas e por seu comportamento de crescimento em escala (ZIMERMANN, 2019) se tornam atrativos para a indústria biotecnológica. Embora tenham poucos estudos acerca da *G. sulphuraria* sua capacidade de inovação dentro do mercado biotecnológico é enorme, suas características podem ser de grande valia para o setor.

A utilização de microalgas na indústria se deve principalmente aos bioprodutos obtidos a partir do crescimento desses microrganismos. Bioprodutos são produtos de origem biológica, podendo ser matérias primas ou processos de conversão por mecanismo biológico (derivados de animais, plantas ou microrganismos) frequentemente são usados como biomateriais, biocombustíveis ou compostos químicos/biológicos de interesse comercial (KANBE, 2020).

O valor comercial nos bioprodutos traz grandes esperanças para o mercado biotecnológico, com o alto valor agregado aos bioprodutos derivados de microalgas, viabilizando assim o comércio em grande escala, podendo competir diretamente com grandes empresas do setor químico. Ao longo de todo o processo as microalgas podem gerar bioprodutos como: ácidos graxos, carotenoides, proteínas, aminoácidos e carboidratos de interesse, além da própria biomassa (GERAQUE, 2019).



Neste estudo conferimos a capacidade de crescimento da microalga *G. sulphuraria* em duas fontes de carbono distintas, analisando e comparando seu comportamento durante todo seu ciclo de vida. A *G. sulphuraria* teria uma melhor produção de biomassa em fontes de carbono simples ou complexos?

2 METODOLOGIA

O estudo foi feito com dois meios de cultura, cada um com uma fonte de carbono diferente para o crescimento de microalga extremófila, para avaliar e comparar a cinética de crescimento, um meio foi produzido contendo adição de amido de milho (meio A) e outro com adição de glicose (meio B) a formulação de ambos é descrita na Tabela 1, os meios de cultura preparados foram meios sintéticos que buscavam extrair a maior efetividade da microalga *G. Sulphuraria*.

O inóculo utilizado para a realização dos estudos foi a microalga *G. sulfuraria* (SAG107.79), adquirida da Coleção de Culturas de Algas da Universidade de Göttingen (SAG).

Tabela 1: Formulação dos meios sintéticos com adição das fontes de carbono

Reagente	Fórmula	Meio A	Meio B
		Concentração	Concentração
Sulfato de Amônio	NH ₄ SO ₄	1,32 g/L	1,32 g/L
Fosfato Monobásico de potássio	KH ₂ PO ₄	0,27 g/L	0,27 g/L
Sulfato de Magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g/L	0,25 g/L
Cloreto de Cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,074 g/L	0,074 g/L
Amido de milho	(C ₆ H ₁₂ O ₆) _n	25 g/L	---
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	---	25 g/L

Fonte: Autoria própria (2021)

Os reagentes utilizados nos meios foram pesados em balança analítica eletrônica para a maior precisão, foram preparados dois Erlenmeyer de 500ml, cada um com 300ml de meio de cultivo, com uma fonte de carbono. O meio com amido foi pré aquecido para ocorrer a gelatinização homogênea do amido, esse processo é necessário para que o meio fique homogêneo por inteiro e não ocorra a formação de grumos após a autoclave.

Os meios foram autoclavados à 121°C por 15 minutos, resfriados naturalmente. A inoculação foi realizada em fluxo laminar utilizando o bico de Bunsen. Todos os materiais utilizados também foram autoclavados, para não haver contaminação. Um inóculo inicial 1 milhão de células proveniente de um cultivo autotrófico foi utilizado para 300mL de meio sintético base com 50g/L de amido de milho, como descrito nas Tabelas 1 e 2. Após os meios serem inoculados, os meios foram fechados com papel Kraft, para que não houvesse contato com a luz, evitando o cultivo autotrófico.

Os meios já fechados sem entrada de luz foram armazenados em estufa incubadora BOD, sob a temperatura de 45 °C, alíquotas foram coletadas três vezes por semana (segunda, quarta e sexta), estas foram analisadas em câmara (câmara de Neubauer) para contagem de células.

A contagem na câmara foi feita nos quadrantes maiores, em contagem diagonal (começando pelo quadrante superior esquerdo e terminando no quadrante inferior direito), após isso, foi feita a média aritmética simples entre todos os quadrantes, para obtenção do número de células da alíquota do dia.



Com o número de células médio por quadrante já obtido, foi feito o cálculo para número de células por ml, como mostrado na Eq. (1).

$$C_{ml} = \frac{Cq}{Vq} \quad (1)$$

Onde;

C_{ml} corresponde ao número de células por ml.

Cq corresponde à média de células por quadrante na câmara de Neubauer

Vq corresponde ao volume de cada quadrante na câmara de Neubauer

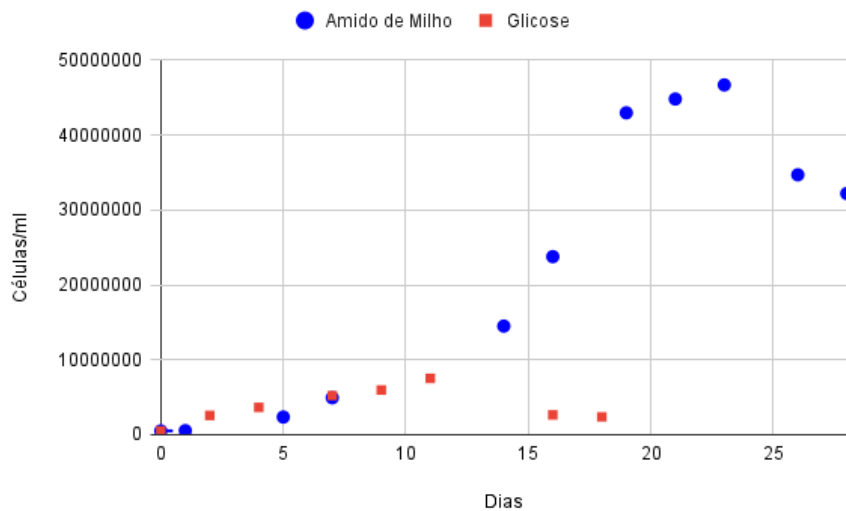
Os dados foram coletados ao longo de 26 dias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi acompanhado o ciclo de vida da microalga *G. sulphuraria* em dois meios sintéticos iguais, com adição de fontes de carbonos diferentes em mesma quantidade (25 g/L de amido de milho e 25 g/L de glicose) visando analisar e comparar em qual meio haveria maior crescimento da microalga.

Foi possível perceber que no meio sintético com amido de milho o crescimento de biomassa foi consideravelmente maior, a microalga *G. sulphuraria* cresceu quase sete vezes mais que em comparação com o meio sintético com adição de glicose, como visto na Figura 5.

Figura 5. Gráfico do crescimento comparativo de biomassa da microalga *Galdieria sulphuraria* nos meios sintéticos com adição de amido de milho e glicose, em células/ml.



Fonte: Autoria própria (2021)

O ciclo de vida da microalga *G. sulphuraria* foi maior no meio sintético com adição de amido de milho. Como neste meio a fonte de carbono era o amido, um polissacarídeo com cadeia complexa, a microalga não consegue se alimentar diretamente do polissacarídeo, ela necessita da disponibilidade da glicose (monossacarídeo), ou seja, possivelmente possa ter ocorrido uma hidrólise em decorrência da presença do microrganismo, transformando a cadeia complexa de polissacarídeos em pequenos monômeros de glicose, tornando-o consumível pela microalga. Essa possível hidrólise feita pela *G. sulphuraria* pode ter feito com



que a fonte de carbono tenha sido disponibilizada aos poucos, conseqüentemente aumentando o tempo do seu ciclo de vida.

Pela figura 5, vemos que o meio sintético com adição de amido de milho teve uma quantidade de biomassa quase sete vezes maior que o meio sintético com adição de glicose, essa condição deve-se possivelmente pela formulação química de cada fonte de carbono, a glicose ($C_6H_{12}O_6$) é um monossacarídeo simples e sempre biodisponível, o amido de milho por se tratar de um polissacarídeo ($(C_6H_{12}O_6)_n$) feito por inúmeros monômeros de glicose, não tem a glicose biodisponível, mas tem a presença várias glicoses, que se hidrolisadas podem ser disponíveis para o consumo de microrganismos, assim tendo mais glicoses disponíveis para o crescimento do microrganismo.

No meio sintético com adição de glicose, foi possível observar que o ciclo de vida da microalga *Galdieria Sulphuraria* foi menor, quando comparado ao cultivo com amido, com fase de crescimento mais escalar e durou cerca de 18 dias. Seu crescimento máximo foi de $7,51.10^6$ células/mL. O ápice do crescimento foi no 11º dia e logo após isso, houve uma queda considerável, onde o número de células mortas é superior, curva típica de um crescimento microbiano. Uma das razões para essa queda é a falta de algum nutriente essencial para crescimento.

No meio sintético com adição de amido de milho, o ciclo de vida foi maior, durou em torno de 28 dias, teve um crescimento mais exponencial e seu ápice foi no 23º dia com cerca de $4,67.10^7$ células/mL, com decaimento sequencial. Essa queda também pode ser ocasionada pela falta de nutrientes essenciais, como nitrogênio, fosfato e/ou outros micronutrientes.

Planejamentos não realizados devido a COVID-19: Foram feitos alguns testes durante o ano de 2021, dois deles tiveram de ser interrompidos devido a bandeira vermelha em decorrência do aumento de casos da COVID-19, o que impossibilitou a ida ao campus para dar continuidade aos experimentos, interrompendo assim a contagem de alíquotas e a cinética da microalga em si. Outras fontes de carbono iam ser testadas neste mesmo experimento, para estudo comparativo.

4 CONCLUSÃO

A *G. sulphuraria*, de caráter extremófila tem capacidade de se desenvolver em outras fontes de carbono mais complexas. No teste comparativo entre os dois meios sintéticos comprovou-se que o meio que continha amido de milho (polissacarídeo) como fonte de carbono, foi mais efetivo, tendo um crescimento maior, com um rendimento sete vezes maior que comparado com o meio que tinha glicose (monossacarídeo) como fonte de carbono. Pode-se concluir, que a complexidade da fonte de carbono retarda o início da fase de crescimento de células e prolonga o tempo de cultivo, em razão da maior quantidade de carbono presente.

Para o uso comercial, meios contendo amido ou resíduos amiláceos podem ser promissores para cultivos em larga escala com foco na produção de biomassa. Além disso, sabe-se que a *G. sulphuraria* tem grande potencial de gerar bioprodutos, impactando diretamente no mercado de produtos biodegradáveis e compostos químicos e biológicos, agregando valor aos seus derivados, podendo ter abordagens em biocombustíveis, cosméticos, fármacos e produtos alimentícios.



REFERÊNCIAS

DERNER, Roberto Bianchini; OHSE, Silvana; VILLELA, Maurício; CARVALHO, Sabrina Matos; FETT, Roseane. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria/RS, ano 2006, v. 36, n. 6, p. 1959 - 1967, nov, dez. 2006.

YOON, Hwan Su; HACKETT, Jeremiah D.; BHATTACHARYA, Debashish. A single origin of the peridinin- and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Lowa city, v. 99, n. 18, p. 11724–11729, 3 set. 2002. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.172234799. Acesso em: 30 ago. 2021.

CARGILL (Brasil). O AMIDO E SUAS PROPRIEDADES PARA O SETOR ALIMENTÍCIO. **FOOD INGREDIENTS BRASIL**, Brasil, v. 35, p. 41-44, 2015.

FOOD INGREDIENTS BRASIL, FANI (São Paulo/SP). **Carboidratos: Estrutura, propriedade e funções**. São Paulo/SP: EDITORA INSUMOS LTDA., 30 ago. 2021. Disponível em: <https://revista-fi.com/artigos/ingredientes-funcionais/carboidratos>. Acesso em: 30 ago. 2021.

TORRES, Livia Maria; LEONEL, Magali; MISCHAN, Martha Maria. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Ciência Rural**, Santa Maria/RS, ano 2012, v. 47, n. 12, p. 1327 - 1332, jul. 2012.

ZIMERMANN, Jéssika D’Arc Fernandes. **Cultivo da microalga Galdieria sulphuraria em permeado de soro de leite**. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

KANBE, Mariana. **Bioprodutos, Biomateriais, Bioplásticos e Plásticos verdes**. [S. l.], 25 abr. 2020. Disponível em: <https://www.tectonia.com.br/biotecnologia/bioplásticos-biomateriais-plásticos-verdes/>. Acesso em: 20 ago. 2021.

GERAQUE, Eduardo. **Biorrefinaria converterá biomassas renováveis em intermediários químicos verdes**. [S. l.], 23 jul. 2019. Disponível em: https://pesquisaparinovacao.fapesp.br/biorrefinaria_convertera_biomassas_renovaveis_em_intermediarios_quimicos_verdes/1095. Acesso em: 19 ago. 2021.