



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Cultivo e Hidrólise Enzimática da Microalga *Chlorella sorokiniana*

Marcella Fernandes de Souza¹, Marcoaurélio Almenara Rodrigues¹, Elba Pinto da Silva Bon¹ e Suely Pereira Freitas¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro – , Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Centro de Tecnologia - Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21941-909

RESUMO

*Microalgas são importantes fontes de proteínas, carboidratos e lipídeos, sendo, em um contexto de biorrefinaria, uma biomassa potencial para produção de biocombustíveis e insumos químicos. As condições de cultivo e o tempo de incubação são essenciais para a definição da composição final da biomassa. A depleção de nitrogênio, em particular, pode resultar no acúmulo de moléculas de reserva, como carboidratos e lipídeos, importantes matérias-primas para produção de biocombustíveis. *Chlorella sorokiniana*, uma microalga verde, foi cultivada por diferentes períodos de forma a favorecer o acúmulo de carboidratos. A biomassa resultante, íntegra ou moída em moinho de bola vibratório, foi hidrolisada com um "pool" enzimático complexo. A microalga íntegra foi resistente à ação hidrolítica das enzimas, porém a moagem foi eficiente em expor o amido intracelular e os polissacarídeos de parede, possibilitando a ação das enzimas e resultando em rendimentos em glicose de 90 % após hidrólise por 6 horas.*

Palavras-chave: *Chlorella sorokiniana*, hidrólise enzimática, microalga, amido, moinho de bola

INTRODUÇÃO

Dentro de um modelo de biorrefinaria, as microalgas vêm se destacando por sua facilidade de cultivo e possibilidade de obtenção de altos conteúdos de carboidratos e lipídeos dependendo da espécie e condição de cultivo, além da possibilidade de extração de compostos de alto valor agregado, como carotenoides, ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e proteínas (Spolaore et al., 2006). No entanto, as condições que levam ao acúmulo de carboidratos, como depleção de nitrogênio (Ho et al., 2013), podem prejudicar o crescimento celular, sendo necessário encontrar um balanço entre esses dois parâmetros.

Pela sua complexidade, o fracionamento da biomassa das algas pode exigir diferentes etapas de processamento, incluindo o rompimento da sua parede celular, rica em polissacarídeos estruturais e proteínas, associadas ou não a açúcares (Northcote et al, 1958). O rompimento da parede possibilitaria, então, o acesso a polissacarídeos de reserva como o amido. Diversas preparações enzimáticas já foram utilizadas para a quebra dessa estrutura, como proteases (Choi et al., 2010), celulasas (Rodrigues e Bon, 2011) e pectinases (Kim et al., 2014), além de processos físicos ou químicos que, alterando a estrutura da parede, facilitam a atuação das enzimas.

Nesse contexto, o presente trabalho investigou o cultivo da microalga verde *Chlorella sorokiniana*, de forma a induzir o acúmulo de carboidratos em sua biomassa, e os rendimentos de hidrólise enzimática da biomassa algácea quando submetida ou não a um pré-tratamento em moinho de bola.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de cultivo e caracterização da microalga *Chlorella sorokiniana*

A microalga verde *Chlorella sorokiniana* (UTEX1663), escolhida por apresentar crescimento autotrófico, mixotrófico e heterotrófico e acúmulo de carboidratos além de outros compostos de interesse, como lipídeos e antioxidantes, foi crescida em Bold's Basal Medium (Stein, 1973). O cultivo foi conduzido em shaker a 30 °C sob agitação de 175 rpm, irradiância de 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ obtida com lâmpadas de 19 W tipo luz do dia e um fotoperíodo de 12 horas. A intensidade luminosa foi medida por meio de um medidor quântico (Li-Cor, Nebraska, USA). As células foram cultivadas em Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio, coletadas por centrifugação a 4500 rcf por 5 minutos, liofilizadas e estocadas em freezer.

Inicialmente estudou-se o tempo de cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana* que levasse a uma maior produção de biomassa rica em carboidrato, com destaque para a glicose. Para tal, a alga foi colhida ao final de sua fase de crescimento exponencial (10 dias) e em quatro momentos após atingir a estacionária (20, 25, 30 e 35 dias). O consumo de nitrato, durante o crescimento, foi determinado por leitura em espectrofotômetro (Collos et al., 1999). O conteúdo total de carboidratos da biomassa das algas foi determinado mediante hidrólise ácida segundo o protocolo publicado pelo NREL (Van Wychen e Laurens, 2013). A análise dos monossacarídeos resultantes foi realizada em HPAEC e os açúcares redutores totais foram determinados pelo método do DNS (Sumner, 1925) e expressos em equivalentes de glicose. O conteúdo de amido foi determinado por kit enzimático (Megazyme, Irlanda).

Pré-tratamento por moagem e hidrólise enzimática

O pré-tratamento foi realizado em moinho de bola vibratório (Fritsch, Alemanha) por 30 minutos com uma amplitude de 1,5 mm. Foram realizados ensaios de hidrólise da biomassa íntegra e após moagem de *C. sorokiniana* cultivada por 30 dias utilizando-se uma mistura dos sobrenadantes do cultivo dos fungos *T. reesei* Rut C-30 e *Aspergillus awamori*. Esses fungos foram selecionados pela sua capacidade de secretar um *pool* enzimático diversificado com atividades de celulasas, β -glicosidases, xilanases, pectinases, proteases e amilases, enzimas reportadas na literatura como capazes de hidrolisar a parede celular de algumas microalgas e seu amido intracelular. Para a microalga moída, o mesmo ensaio foi repetido apenas com as enzimas secretadas por *A. awamori*. As hidrólises foram conduzidas em frascos agitados a 50 °C e 200 rpm com massa total de 12,5 g e carga de sólidos de 1 % (p/p), correspondendo a 0,125 g de alga liofilizada. As hidrólises foram acompanhadas pela determinação da concentração de glicose em analisador bioquímico (YSI 2700) em 30 minutos, 2, 4, 6 e 24 horas. A amostra de 24 horas foi também analisada em HPAEC para determinação da presença e concentração de outros açúcares além da glicose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O acompanhamento do consumo de nitrato no meio de cultivo revelou que 90% do nitrato inicial havia sido consumido após 25 dias, estabelecendo-se, a partir deste tempo de cultivo, condições favoráveis ao acúmulo de carboidratos. Os dados da Figura 1 corroboram esta hipótese, indicando um aumento significativo no acúmulo de carboidratos na biomassa cultivada por 30 dias, de acordo com teste de Fisher ($p < 0,05$).

O aumento do tempo de cultivo de 30 para 35 dias não favoreceu o acúmulo de carboidratos, resultado coerente com a literatura, que indica que esse acúmulo após a depleção de nitrogênio ocorre em poucos dias (Ho et al., 2013).

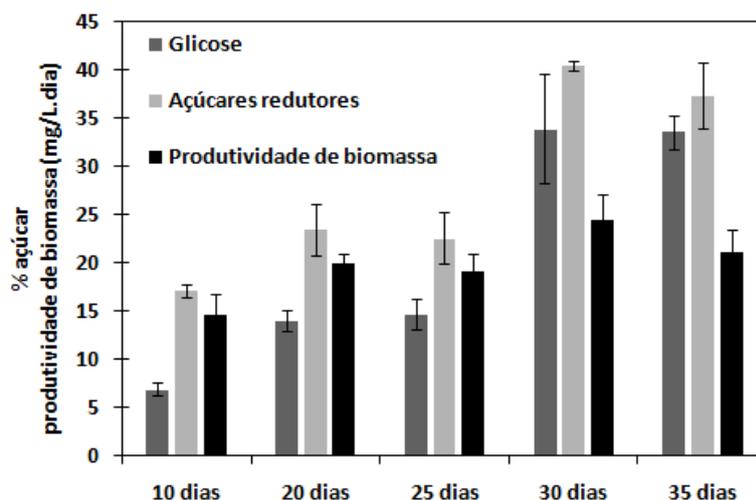


Figura 1. Composição relativa a glicose (cinza escuro) e açúcares redutores totais (cinza claro) e produtividade (preto) de biomassa seca da microalga *C. sorokiniana* após 10, 20, 25, 30 e 35 dias de cultivo. As barras de erro correspondem ao desvio-padrão de triplicatas independentes.

Além do maior conteúdo de glicose e carboidratos totais, os cultivos conduzidos por 30 dias apresentaram também a maior produtividade em biomassa seca (25,4 mg/dia). Portanto, o tempo recomendado de cultivo para o máximo de acúmulo de carboidratos, nas condições utilizadas, foi de 30 dias.

A microalga cultivada por 30 dias apresentou um teor de 30 % (m/massa seca) em glicose e a digestão enzimática da biomassa moída com amilases revelou que mais de 90 % desta glicose se encontra na forma de amido. O teor em glicose corresponde a 80 % do total de carboidratos da biomassa. O segundo açúcar mais abundante na biomassa é a galactose, correspondendo a 3,5 % do peso seco e 10 % do total de carboidratos.

Os dados da Figura 2, que apresentam a cinética de hidrólise enzimática da biomassa algácea íntegra e após tratamento por moagem, indicam que a moagem é necessária para expor os polissacarídeos da biomassa à ação das enzimas. Os resultados de hidrólise para a biomassa íntegra indicam que o uso de um *pool* enzimático diversificado não foi suficiente para efetuar uma hidrólise significativa, sendo o rendimento final em glicose de 25 % e de galactose, 37%, após 48 horas de hidrólise. Após a hidrólise, a biomassa foi tingida com lugol, tendo sido detectada a presença de amido. Este fato indica que as enzimas não foram capazes de desestruturar, de forma eficiente, a parede da microalga de forma a possibilitar que as amilases tivessem melhor acesso ao amido intracelular.

A eficiência de hidrólise para a biomassa moída foi elevada, tendo sido alcançados rendimentos em glicose de 90 % com apenas 6 horas de hidrólise, chegando a 100 % após 24 horas. A velocidade inicial de hidrólise foi alta, alcançando-se 36 % de rendimento em glicose em apenas 30 minutos, resultado superior ao rendimento final encontrado para a biomassa íntegra após 48 horas de hidrólise. Estes resultados confirmam que a moagem foi eficaz na desestruturação da parede celular.

No entanto, as enzimas utilizadas não foram capazes de hidrolisar todos os polissacarídeos estruturais, pois, além de glicose, apenas galactose foi detectada no hidrolisado e seu rendimento final de hidrólise foi de apenas 20%, comparável ao obtido com a microalga íntegra.

Os mesmos rendimentos foram alcançados na hidrólise utilizando-se somente o sobrenadante do fungo *A. awamori*, sugerindo que suas enzimas foram responsáveis pelo resultado alcançado. Esse fungo é conhecido por sua produção de amilases, o que explica sua eficiência na hidrólise do amido intracelular exposto após quebra da parede celular da microalga durante a moagem.

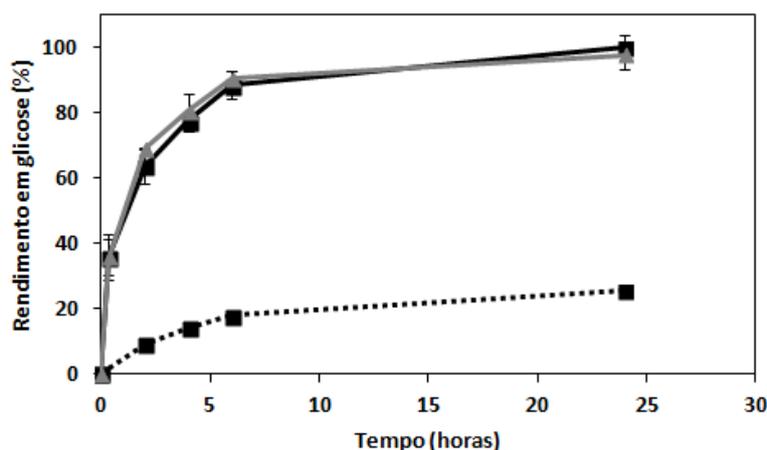


Figura 2. Cinética da hidrólise enzimática da biomassa de *Chlorella sorokiniana* com enzimas dos fungos *Trichoderma reesei* Rut C-30 e *Aspergillus awamori* (■) e apenas o sobrenadante de *A. awamori* (▲) submetida (linha contínua) ou não (linha pontilhada) a pré-tratamento por moagem.

A hidrólise da microalga *C. sorokiniana* após moagem é promissora para produção de um xarope rico em glicose contendo uma pequena concentração de galactose (12 % p/p). A alta produtividade encontrada deve ser validada em hidrólise com maior carga de sólidos de modo a comprovar o potencial de aplicação industrial do processo.

CONCLUSÕES

A microalga *Chlorella sorokiniana* é uma microalga promissora para a produção de carboidratos, majoritariamente glicose. A parede celular da biomassa íntegra é resistente à hidrólise por um “pool” enzimático celulolítico, porém a hidrólise de seu amido intracelular foi realizada de forma eficiente após o rompimento dessa estrutura em moinho vibratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Choi SP, Nguyen MT, Sim SJ. 2010. Enzymatic Pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* Biomass for Ethanol Production. *Bioresour Technol* 101:5330–5336.
- Collos Y, Mornet F, Sciandra A, Waser N, Larson A, Harrison PJ. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *J Appl Phycol* 11:179–184.
- Ho S-H, Huang S-W, Chen C-Y, Hasunum T, Kondo A, Chang J-S. 2013. Characterization and Optimization of Carbohydrate Production from an Indigenous Microalga *Chlorella Vulgaris* FSP-E. *Bioresour Technol* 135:157–165.
- Kim KH, Choi IS, Kim HM, Wi SG, Bae H-J. 2014. Bioethanol Production from the Nutrient Stress-Induced Microalga *Chlorella vulgaris* by Enzymatic Hydrolysis and Immobilized Yeast Fermentation. *Bioresour Technol* 153:47–54.
- Northcote DH, Goulding KJ, Horne RW. 1958. The Chemical Composition and Structure of the Cell Wall of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochem J* 70(3).
- Rodrigues MA, Bon EPS. 2011. Evaluation of *Chlorella* (chlorophyta) as Source of Fermentable Sugars Via Cell Wall Enzymatic Hydrolysis. *Enzyme Res* article id 405603.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. 2006. Commercial Applications of Microalgae. *J Biosci Bioeng* 101(2):87–96.
- Stein, J (ED.) 1973. Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. 448 pp.
- Sumner JB. 1925. A more specific reagent for the determination of sugar in urine. *J Biol Chem* 65:51–54.
- Van Wychen S, Laurens LML. 2013. Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass. NREL.