



EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL BRUTO NA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES POR *CHLORELLA VULGARIS* CULTIVADAS COM PRIVAÇÃO DE LUMINOSIDADE

Natália S. Carvalho¹, Renata Q. Nascimento², Luiggi C. Pessôa¹, Kricelle M. Deamici³,
Janía B. A. da Silva^{1,4}, Carolina O. de Souza^{3,5} e Denilson J. Assis^{1,6*}

1 - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brasil.

2 - Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brasil.

3 - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brasil.

4 - Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, Brasil.

5 - Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brasil.

6 - Escola de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Salvador (UNIFACS), Salvador, Brasil.
Av. Tancredo Neves, 2131, Salvador, CEP:41820-021, BA.

denilson.assis@unifacs.br

RESUMO

As microalgas se destacam pela capacidade fotossintética, mas a privação de luminosidade pode induzir à obtenção de energia por oxidação de compostos orgânicos e, conseqüentemente, à síntese de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), cujas propriedades reológicas explicam sua ampla aplicação e interesse comercial. O glicerol bruto (GB) é um subproduto rico em compostos que servem como fonte de nutrientes para o crescimento de microalgas e geração de SPE de baixo custo. No entanto, essas respostas podem variar com a concentração da fonte de nutrientes no meio. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência da concentração de GB na produção de SPE por *Chlorella vulgaris* IBL105 em cultivo heterotrófico, bem como caracterizar o biopolímero obtido na melhor condição. As produções de biomassa e SPE resultaram de cultivos em meio sintético (BG11) contendo diferentes concentrações de GB (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 g L⁻¹). A SPE resultante da condição de maior produção foi submetida à análise reológica e seus parâmetros comparados com os de um SPE comercial. As produções de biomassa celular e SPE variaram, respectivamente, de 0,34 a 1,38 g L⁻¹ e de 0,19 a 1,05 g L⁻¹, sendo as máximas produções atribuídas ao meio contendo 2,5 g L⁻¹ de GB. As produções aumentaram com o acréscimo da concentração de glicerol bruto, entretanto, acima de 2,5 g L⁻¹, notou-se a redução dessas respostas, o que pode estar relacionada à inibição celular por excesso de substrato, toxicidade do resíduo ou insuficiência no transporte de nutrientes para as células devido ao aumento da viscosidade do meio. A SPE produzida nas condições de máxima produção apresentou índice de emulsificação superior a 50%, comportamento pseudoplástico e características reológicas, como índice de consistência (622,91 Pa.sn), índice de fluxo (0,41) e viscosidade (93,83 mPa.s a 25°C e 25s⁻¹) similares às da goma xantana

comercial. É possível condicionar *C. vulgaris* a consumirem glicerol bruto na ausência de luminosidade para sintetizarem SPE de baixo custo e com relevância tecnológica.

Palavras-chave: Microalgas, cultivo heterotrófico, resíduo, viscosidade, bioprodutos.

INTRODUÇÃO

A crise energética, os impactos ambientais e os elevados custos dos produtos naturais despertam o interesse mundial por produtos desenvolvidos com foco na sustentabilidade e na viabilidade econômica⁽¹⁾. Nesse sentido, os compostos provenientes de microrganismos surgem como alternativas para a obtenção convencional de bioprodutos, normalmente baseada no extrativismo vegetal. Além disso, os processos microbiológicos demandam pouca mão de obra, dispensam a necessidade de terras aráveis e independem de condições climáticas, o que os tornam fontes constantes e renováveis de recursos^(2,3).

Dentre os microrganismos de interesse tecnológico, as microalgas destacam-se pela versatilidade metabólica e capacidade de adaptação a condições adversas⁽⁴⁾, possibilitando a geração de bioprodutos, como polímeros extracelulares, cujas propriedades reológicas justificam a ampla aplicação como espessante, emulsificante e estabilizante⁽⁵⁻⁷⁾. Entretanto, a produção e as propriedades desses biopolímeros dependem das condições de cultivo. Em adição, os custos do processo podem ser minimizados com a aplicação de resíduo orgânico em cultivos com privação de luminosidade⁽⁸⁾.

Nesse sentido, o glicerol residual da produção de biodiesel surge como uma alternativa para suplementar cultivos heterotróficos de microalgas, possibilitando a geração de bioprodutos de alto valor^(9,10). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da concentração de GB na produção de SPE por *Chlorella vulgaris* IBLC105 em cultivo heterotrófico, bem como caracterizar o biopolímero obtido na melhor condição.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismos e meios de cultivo

A microalga *Chlorella vulgaris* IBL - C105 foi doada pelo LABBIOTEC – Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia da UFBA. O inóculo da microalga foi propagado em Erlenmeyer com meio BG-11 e incubado em BOD (Biochemical Oxygen Demand), a 28°C, fotoperíodo de 12h claro/escuro, e aeração com injeção de ar comprimido filtrado em lâ de vidro.

Concentração de biomassa e pH

As medidas diárias de concentração foram realizadas por meio da leitura da densidade ótica (DO) do meio, em espectrofotômetro (PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS), 670 nm. Uma curva padrão foi usada para relacionar a densidade ótica com a massa seca da biomassa⁽¹¹⁾. O pH dos cultivos também foi medido diariamente em pHmetro digital (Tecnal, Brasil).

Condições de cultivo

O glicerol bruto do biodiesel foi concedido pela empresa Petrobras, Candeias-BA. As microalgas após prévia adaptação (1,5 g L⁻¹ de nitrato de sódio, 2 g L⁻¹ de glicerol, agitação de 140 rpm e ausência de luminosidade), foram utilizadas nos cultivos heterotróficos em quantidade correspondente a 30% (m/v) do meio. Os cultivos foram conduzidos em frascos

Erlenmeyers de 250mL (200 mL útil) incubados em shaker TE- 424 (Tecnal, Brasil) a 25°C, 140 rpm, concentração de NaNO₃ de 1,5 g L⁻¹, e diferentes concentrações de GB (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 g L⁻¹). Ao longo dos cultivos, a concentração de biomassa foi monitorada. O período do cultivo variou de acordo com a duração da fase de crescimento das microalgas em cada ensaio.

Recuperação da biomassa e SPE microalgal

Ao final de cada cultivo, a biomassa foi recuperada por centrifugação (Eppendorf 5702 R) a 4400 rpm por 7 min. A biomassa obtida foi congelada a -80°C (ColdLab CL580-86V) e liofilizada (Liotop L101). O SPE presente no sobrenadante foi extraído com adição de etanol absoluto na proporção de 3:1 (etanol: meio). O material precipitado foi filtrado, secado em estufa a 35°C e quantificado em g L⁻¹⁽¹⁾.

Índice de Emulsificação (IE₂₄)

A análise foi utilizada para verificar o poder emulsificante do sobrenadante e foi conduzida de acordo com Iyer *et al.*⁽¹²⁾ e Cooper e Goldenberg⁽¹³⁾. Os sobrenadantes dos cultivos das microalgas foram misturados com distintos óleos (mineral, girassol, soja e oliva) em tubos de ensaios e na proporção de 2:3 (v/v). Posteriormente, os tubos foram agitados em vórtex por 2 min e mantidos por 24 horas em repouso. O índice de emulsificação foi determinado por meio da relação entre a altura, em centímetros, da Camada Emulsificada (CE) e a Altura Total (AT) da camada dos líquidos no tubo, conforme a Equação (A).

$$IE_{24} (\%) = (CE)/(AT)*100 \quad (A)$$

Parâmetros reológicos

Os parâmetros foram obtidos em um reômetro (Haake Rheotest 2.1) de cilindros concêntricos acoplado a um banho-maria. Soluções aquosas dos SPE (0,4%, m/v) foram preparadas e mantidas sob refrigeração por 12 horas. As medidas foram obtidas em função da variação da taxa de cisalhamento (25 a 1000 s⁻¹), na temperatura de 25°C⁽¹⁴⁾. Os dados foram ajustados ao modelo de Ostwald-de Waele.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As máximas produções de biomassa celular (1,38 g L⁻¹) e SPE (1,05 g L⁻¹) ocorreram no meio contendo 2,5 g L⁻¹ de GB, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1: Diferentes concentrações de glicerol bruto e respostas na produção de biomassa e SPE por *Chlorella vulgaris* IBL-C105.

Ensaio	GB (g L ⁻¹)	Biomassa (g L ⁻¹)	SPE (g L ⁻¹)
1	0,5	0,34	0,19
2	1	0,76	0,27
3	1,5	1,08	0,54
4	2	1,28	0,65
5	2,5	1,38	1,05
6	3	1,21	0,56

O aumento da concentração de glicerol bruto elevou as produções, entretanto, acima de 2,5 g L⁻¹, houve a redução dessas respostas, o que pode ter relação com a inibição celular por excesso de substrato, toxicidade do resíduo ou insuficiência no transporte de nutrientes para as células devido ao aumento da viscosidade do meio.

A SPE obtida na condição de maior produção foi submetida à análise reológica e os dados foram comparados com o da goma xantana Sigma, conforme a Figura 1.

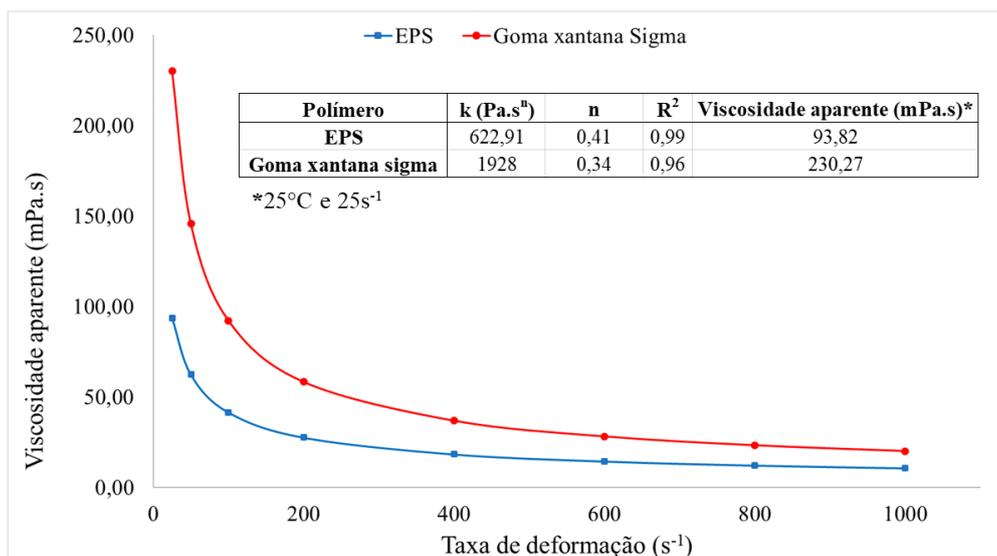


Figura 1: Parâmetros reológicos e efeito da taxa de deformação sobre a viscosidade das soluções aquosas (0,4%, m/v) de SPE de *C. vulgaris* e goma xantana Sigma. 25°C e 25s⁻¹.

As curvas mostradas na Figura 1 revelam que a viscosidade aparente sofre redução à medida que aumenta a taxa de deformação, o que sugere um comportamento pseudoplástico, que por sua vez foi confirmado com os valores de índices de comportamento do fluido ($n < 1$)⁽¹⁵⁾. Embora as soluções demonstrem similaridade de comportamento, a do EPS apresentou valores de índice de consistência (K) e viscosidade aparente, respectivamente, 3 e 2,5 vezes menores do que os obtidos para a goma xantana comercial, um biopolímero de alta pureza e obtido por bactérias selecionada. Por outro lado, a viscosidade aparente do EPS produzido neste estudo foi aproximadamente 5 vezes maior do que os sintetizados por microalgas *spirulina* LEB-18 cultivadas em meio sintético⁽¹⁶⁾, demonstrando o potencial tecnológico do EPS resultante do consumo de GB por *C. vulgaris*.

Os valores de índice de emulsificação do sobrenadante de *C. vulgaris* cultivadas na condição selecionada foram acima de 50%, conforme mostrado na Tabela 2, podendo ser consideradas bons agentes emulsificantes para todos os óleos testados⁽¹⁷⁾.

Tabela 2: Índices de emulsificação do sobrenadante produzido por *C. vulgaris* e da goma xantana Sigma obtidos por Santos⁽¹⁸⁾.

Amostra	Índice de Emulsificação (IE ₂₄) (%)			
	Óleo mineral	Óleo de Girassol	Óleo de Soja	Azeite de Oliva
Goma xantana	50	63	55	62
<i>C. vulgaris</i>	53,16	54,32	55,17	52,63

Os resultados obtidos por *C. vulgaris* foram similares aos da goma xantana Sigma⁽¹⁸⁾, o que evidencia o potencial do meio isento da biomassa como bom agente emulsificante em segmentos industriais com menor exigência de pureza, tal como o setor petroquímico.

CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que é possível condicionar microalgas *C. vulgaris* a consumirem glicerol bruto na ausência de luminosidade para sintetizarem SPE de baixo custo, com relevância tecnológica e, portanto, mais competitiva no mercado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESB—Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Bahia pelo apoio financeiro (BOL0642/2020).

REFERÊNCIAS

1. DE JESUS, C. S.; UEBEL, L. D. S.; COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; DE MORAIS, E. G.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; NUNES, I. L.; FERREIRA, E. D. S.; DRUZIAN, J. I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. *Bioresource technology*, v. 256, p. 86-94, 2018.
2. NUNES, J. M. N.; RODRIGUES, P. R.; CACIQUE, P. P.; DRUZIAN, J. I.; LOBATO, A. K. C. L. Mapeamento e modelagem de patentes de processos biotecnológicos catalisados por culturas puras bacterianas. *Cad. Prospec.*, Salvador, v. 11, p.304-315, 2018.
3. LEITE, L. F. Produção de single-cell-oil em batelada alimentada. 2019, 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR/PR, Ponta Grossa.
4. ANDRADE, B. B. Produção de microalgas cultivadas em meio reutilizado e uso da eletrofloculação como método de separação de biomassa. 2021, 58 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, PPGBiotec-UFBA/BA, Salvador.
5. WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H. C. What are bacterial extracellular polymeric substances?. In: *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1999. p. 1-19.
6. MOREIRA, R. V. Estratégias nutricionais para a otimização da produção de exopolissacarídeos pela cepa *Enterobacter amnigenus* LABEM. 2016, 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, PPGBiotec-UFBA/BA, Salvador.
7. DA SILVA, M. B. F. Avaliação da influência de condições de cultivo na produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) por *Arthrospira Platensis*. 2018, 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, IQ-UFRJ/RJ, Rio de Janeiro.
8. DE OLIVEIRA, N. G. Cultivo da microalga de alto valor econômico *Nannochloropsis oceanica* em meio alternativo utilizando melão de cana como substrato orgânico. 2019, 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Oceanografia), Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, LABOMAR- UFC/CE, Fortaleza.
9. ANITHA, M.; KAMARUDIN, S. K.; KOFLI, N. T. The potential of glycerol as a value-added commodity. *Chemical Engineering Journal*, v. 295, p. 119-130, 2016.
10. DE OLIVEIRA, C. Y. B. Efeito do modo nutricional e da fonte de carbono no cultivo e na composição bioquímica da microalga *Selenastraceae* sp. nov. 2020, 72 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, CCA-UFSC, Florianópolis.
11. COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; ANDRADE, B. B.; ASSIS, D. D. J.; SOUZA, C. O.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. *International journal of biological macromolecules*, v. 116, p. 552-562, 2018.
12. IYER, A.; MODY, K.; JHA, B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, n. 1-2, p. 220-222, 2006.

13. COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.
14. ASSIS, D. D. J.; BRANDÃO, L. V.; COSTA, L. A. S.; FIGUEIREDO, T. V. B.; SOUSA, L. S.; PADILHA, F. F.; DRUZIAN, J. I. A study of the effects of aeration and agitation on the properties and production of xanthan gum from crude glycerin derived from biodiesel using the response surface methodology. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 172, n. 5, p. 2769-2785, 2014.
15. FOX, R. W.; MCDONALD, A. T.; PRITCHARD, P. J. *Introdução à Mecânica dos Fluidos*. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2010. 728p.
16. DE JESUS, C. S.; ASSIS, D. A.; RODRIGUEZ, M. B.; FILHO, J. A. M.; COSTA, J. A. V.; FERREIRA, E. S.; DRUZIAN, J. I. Pilot-scale isolation and characterization of extracellular polymeric substances (EPS) from cell-free medium of spirulina sp LEB-18 cultures under outdoor conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 124, p. 1106-1114, 2019.
17. RAMOS, B. F. M.; DE ALMEIDA, P. F.; CHINALIA, F. A. Bacterial xanthan and rhamnolipid simultaneous production using industrial oil produced water. *Environmental Technology*, p. 1-15, 2020.
18. SANTOS, T. D. S. *Biossíntese alternativa de goma xantana em água residual da indústria de petróleo e resíduo de mandioca: produção e caracterização*, 2021. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021.

EFFECT OF CRUDE GLYCEROL CONCENTRATION ON THE PRODUCTION OF EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES BY CHLORELLA VULGARIS CULTIVATED WITH LUMINOSITY DEPRIVATION.

ABSTRACT

*Microalgae stand out for their photosynthetic capacity, but light deprivation can induce energy to be obtained through the oxidation of organic compounds and, consequently, the synthesis of extracellular polymeric substances (EPS), whose rheological properties explain their wide application and commercial interest. Crude glycerol (CG) is a by-product rich in compounds that serve as a source of nutrients for microalgae growth and low-cost SPE generation. However, these responses may vary with the concentration of the nutrient source in the medium. The objective of this work was to evaluate the influence of CG concentration on EPS production by *Chlorella vulgaris* IBLC105 in heterotrophic culture, as well as to characterize the biopolymer obtained in the best condition. Biomass and EPS yields resulted from cultures in synthetic medium (BG11) containing different concentrations of CG (0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 and 3.0 g L⁻¹). The EPS resulting from the higher production condition was submitted to rheological analysis and its parameters compared with those of a commercial EPS. The cellular biomass and EPS productions ranged, respectively, from 0.34 to 1.38 g L⁻¹ and from 0.19 to 1.05 g L⁻¹, with the maximum production attributed to the medium containing 2.5 g L⁻¹ CG. The productions increased with the increase in the concentration of crude glycerol, however, above 2.5 g L⁻¹, there was a reduction in these responses, which may be related to cellular inhibition by substrate excess, residue toxicity or insufficiency. in the transport of nutrients to the cells due to the increase in the viscosity of the médium. The EPS produced under maximum production conditions showed an emulsification index greater than 50%, pseudoplastic behavior and rheological characteristics, such as consistency index (622.91 Pa.sn), flow index (0.41) and viscosity (93.83 mPa.s at 25°C and 25s⁻¹) similar to commercial xanthan gum. It is possible to condition *C. vulgaris* to consume crude glycerol in the absence of light to synthesize low-cost and technologically relevant EPS.*

Keywords: *Microalgae, heterotrophic cultivation, residue, viscosity, bioproducts.*