

CULTIVO DE *NOSTOC* SP EM DIFERENTES LUMINOSIDADES PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E FICOBILIPROTEÍNAS¹

RAQUEL RENAN JORGE²
LUIZ RODRIGO ITO MORIOKA²
MARA LÚCIA LUIZ RIBEIRO³
MARIA HELENA PIMENTA PINOTTI³

JORGE, R. R.; MORIOKA, L. R. I.; RIBEIRO, M. L. L.; PINOTTI, M. H. P. Cultivo de *Nostoc* sp em diferentes luminosidades para produção de biomassa e ficobiliproteínas. *Semina: Ci. Biol. Saúde*, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 67-71, jun. 1999/2000.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi explorar o crescimento autotrófico de *Nostoc* sp em relação a diferentes luminosidades com a finalidade de obtenção de maior produção de biomassa e de ficobiliproteínas. Foram realizadas culturas em três intensidades luminosas, 500, 1000 e 2000 lux, usando meio mineral BG11. Com o aumento da luminosidade foi observado um aumento na produção de biomassa. A maior produção ocorreu no 21º dia de cultivo para todas as intensidades luminosas, sendo que em 2000 lux foi obtido o melhor rendimento em biomassa (1,034 g/L), correspondendo a uma produtividade de 0,049 g/L.dia. Não houve um bom aproveitamento da intensidade luminosa de 2000 lux para produção de ficobiliproteínas, com a maior produção ocorrendo em 1000 lux, tanto para ficocianina como para ficoeritrina.

PALAVRAS-CHAVE: Ficobiliproteínas; cianobactéria; *Nostoc* sp; ficocianina; ficoeritrina.

INTRODUÇÃO

Nostoc sp, uma cianobactéria, pertencente ao reino Monera, considerada anteriormente uma microalga azul-verde (Fay, 1983), tem como seu principal meio de nutrição a fotossíntese, dependendo então da luz para fixação do CO₂. O cultivo de microalgas, de maneira geral, representa um sistema biológico eficiente para utilização de energia solar, com vistas à produção de biomassa e de substâncias naturais de valor econômico (Pinotti & Segato, 1991; Skulberg, 1994). A característica mais marcante das cianobactérias é a presença de pigmentos acessórios fotossintéticos, as ficobiliproteínas. O interesse no estudo destes pigmentos é grande, tanto pelo efeito pigmentante como protéico, uma vez que as biliproteínas compreendem grande parte da proteína total capaz de ser metabolizada pelos homens e animais (Ruiz, 1996). Diferentes condições de crescimento podem afetar o conteúdo e a composição das biliproteínas de determinada espécie. O grande nível de ficobiliproteínas que a cianobactéria pode acumular sob condições favoráveis, fazem delas uma

interessante fonte de pigmentos naturais para produtos alimentares (Silva *et al.*, 1989). Essas proteínas são também usadas como marcadores fluorescentes para células e biomoléculas com fins de diagnóstico e pesquisa (Silva *et al.*, 1989). Além disso as ficobiliproteínas podem ser usadas como pigmentos naturais pela indústria cosmética, substituindo o uso contínuo dos pigmentos sintéticos (Arad & Yaron, 1992; Moreno *et al.*, 1995).

Quando microorganismos fototróficos são cultivados em batelada, com uma constante intensidade luminosa, essa intensidade luminosa por célula diminui conforme a densidade celular aumenta. Como resultado, a velocidade específica de crescimento é gradualmente reduzida conforme o crescimento torna-se limitado pela luz (Eriksen *et al.*, 1996). Outro efeito da mudança na intensidade luminosa, causada pelo sombreamento, são alterações na composição da biomassa quando as células aumentam suas concentrações de pigmentos devido ao aumento da competição pela luz (Eriksen *et al.*, 1996).

Por outro lado, uma das limitações da maior parte dos organismos fotossintéticos é que eles não se desenvolvem em altas luminosidades. A

¹ Parte da monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, em 2000, para obtenção do Bacharelado.

² Alunos do curso de Especialização em Bioquímica Aplicada da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Pr.

³ Professores do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Londrina, Cx. Postal 6001, CEP: 86.051-990, Londrina, Pr.

fotoinibição tem sido documentada em algas (Tadros *et al.*, 1993).

O objetivo do presente estudo foi investigar a produção de biomassa e ficobiliproteínas por *Nostoc* sp, em meio mineral BG11, em diferentes luminosidades.

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismo e meio de cultivo – A cianobactéria *Nostoc* sp foi isolada no laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual de Londrina e classificada pela Dra. Célia Sant'Ana do Instituto Botânico, SP. Meio BG11 (Stanier *et al.*, 1971), foi usado no experimento.

Condições de cultivo – O pré-inóculo foi realizado em meio BG11, por dez dias de cultivo, nas mesmas condições de cultivo do experimento, para obtenção de células na fase logarítmica de crescimento. O experimento foi realizado em triplicata por 21 dias, em erlenmeyers de 250 ml com volume de trabalho de 50 ml, agitação de 128 rpm e iluminação contínua fornecida por duas lâmpadas fluorescentes, com intensidades luminosas de 500, 1000 e 2000 lux, medidas na superfície da cultura com um luxímetro.

Biomassa – A biomassa foi coletada por centrifugação a 12000 x g por 20 minutos, lavada e ressuspensa em 10 ml de água deionizada. Uma alíquota foi utilizada para a determinação da biomassa por gravimetria.

Determinação de ficobiliproteínas – A biomassa obtida foi sonicada, precipitada com sulfato

de amônio 20% de saturação e deixada durante a noite em câmara fria (4 °C). Em seguida, foi centrifugada sob refrigeração a 12000 x g por 20 minutos, o resíduo descartado (Ribeiro, 1996) e o sobrenadante lido em Absorvâncias de 560 nm e 620 nm, para determinação de ficoeritrina e ficocianina, respectivamente (Cunha, 1994).

Análise Estatística – Os dados foram analisados por Análise de Variância, com as médias sendo comparadas pelo teste de Tukey (Rohlf & Sokal, 1981).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na produção de biomassa por *Nostoc* sp foram submetidos a análise de variância.

A análise de variância indicou que houve diferenças significativas na produção de biomassa entre dias de cultivo e entre as luminosidades. Houve também uma interação significativa entre dias de cultivo e luminosidades.

Na Tabela 2 e Figura 1 podem ser observados os resultados de biomassa, em g/L, com relação à interação dias de cultivo versus luminosidade.

Com o decorrer dos dias de cultivo, foi observado que houve um aumento na produção de biomassa por *Nostoc* sp. Com o aumento da luminosidade também foi observado um aumento na produção de biomassa. A maior produção ocorreu no 21º dia de cultivo para todas as intensidades luminosas, sendo que em 2.000 lux foi obtido o melhor rendimento em biomassa (1,034g/L), correspondente a uma produtividade de 0,049g/L.dia.

Tabela 1 – Médias de produção de biomassa (g/L) com relação à interação dias de cultivo x luminosidades (lux).

Dias de cultivo	Luminosidade (lux)		
	500	1.000	2.000
3	0,028	0,067	0,088
7	0,040	0,130	0,264
10	0,049	0,391	0,420
14	0,104	0,426	0,619
17	0,164	0,335	0,818
21	0,349	0,670	1,034

Tabela 2 – Médias de absorvância de ficoeritrina, ficocianina e ficobiliproteínas totais com relação à interação dias de cultivo x luminosidades (lux).

Dias de Cultivo	Ficoeritrina			Ficocianina			Ficobiliproteínas Totais		
	500	1.000	2.000	500	1.000	2.000	500	1.000	2.000
3	0,008	0,038	0,033	0,005	0,024	0,022	0,013	0,06	0,055
7	0,019	0,085	0,183	0,014	0,05	0,116	0,033	0,135	0,299
10	0,036	0,282	0,221	0,025	0,172	0,148	0,061	0,454	0,369
14	0,047	0,497	0,049	0,030	0,312	0,038	0,077	0,809	0,087
17	0,054	0,715	0,044	0,034	0,490	0,034	0,088	1,204	0,078
21	0,074	0,423	0,055	0,046	0,294	0,047	0,120	0,717	0,102

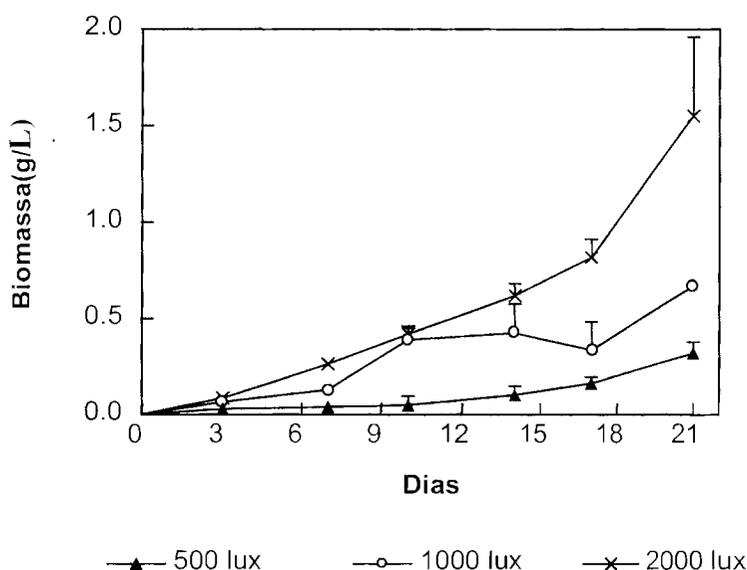


Figura 1 – Curva de crescimento de *Nostoc* sp em meio BG11, em diferentes luminosidades.

A análise de variância dos resultados obtidos na determinação de ficobiliproteínas totais indicou diferenças significativas entre dias de cultivo e entre as luminosidades, bem como uma interação significativa entre dias de cultivo e luminosidades.

As médias para ficoeritrina, ficocianina e ficobiliproteínas totais estão apresentadas na Tabela 4.

Considerando as intensidades luminosas, pode ser visto que, em 500 lux, com o decorrer dos dias de cultivo, houve aumento no teor de ficobiliproteínas. Para 1.000 lux houve um acréscimo até o 17^o dia de cultivo, sendo 3,26 vezes maior que a melhor produção de ficobiliproteínas na intensidade de 2.000 lux. Em 2.000 lux, observa-se um aumento de ficoeritrina e ficocianina durante os dez primeiros

dias de cultivo e posteriormente a diminuição de sua produção.

Na Figura 2 temos a produção de ficobiliproteínas totais com relação aos dias de cultivo e luminosidades.

A maior produção de ficobiliproteínas ocorreu em 1000 lux. Observa-se que apesar de ocorrer uma produção significativa de biomassa com aumento da luminosidade, essa não demonstrou ser eficaz na produção de ficobiliproteínas, havendo uma diminuição de ficobiliproteínas com 2000 lux (Figuras 1 e 2). Infere-se que a alta densidade da cultura não permite que todas as células recebam quantidades equivalentes de luz, não havendo um bom aproveitamento dessa intensidade luminosa. Chen *et al.* (1996), estudando *Spirulina platensis*

Tabela 3 – Análise de variância para os resultados de biomassa (g/L) em função dos dias de cultivo e luminosidades.

C.V.	g.l.	S.Q.	Q.M.	F.	Pr >F.
Luminosidades	2	2,245	1,123	117,7	0,0001
Dias de Cultivo	5	2,415	0,4831	50,63	0,0001
Dias X Luminosidades	10	1,243	0,1243	13,03	0,0001
Resíduo	33	0,3148	0,009541		
Total	50	6,2178			

Tabela 4 – Análise de variância para os resultados de pigmentos totais em função dos dias de cultivo e luminosidades.

C.V.	g.l.	S.Q.	Q.M.	F.	Pr >F.
Luminosidades	2	2,497	1,248	74,54	0,0001
Dias de Cultivo	5	1,021	0,2041	12,19	0,0001
Dias X Luminosidades	10	2,022	0,2022	12,07	0,0001
Resíduo	34	0,5695	0,009541		
Total	51	6,1095			

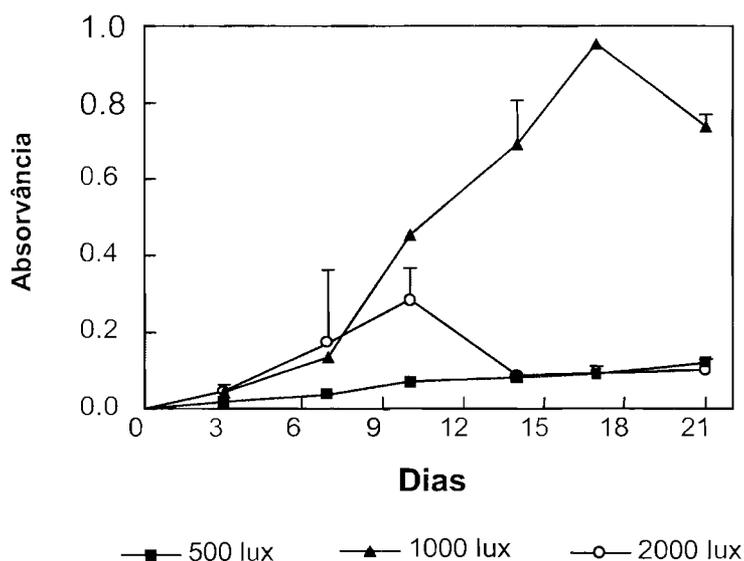


Figura 2 – Produção de ficobiliproteínas por *Nostoc* sp, em meio BG11, em diferentes luminosidades, em função de diferentes dias de cultivo.

verificou que, um dos fatores que influenciava no crescimento e na composição celular da microalga era a intensidade luminosa. O maior conteúdo de ficocianina foi na cultura com baixa densidade. Como a ficocianina é um pigmento fotossintético acessório, esta é uma maneira de obter mais energia por célula. Tadros *et al.* (1993), também verificou que semelhante a muitas algas, as cianobactérias respondem a uma baixa intensidade luminosa com

o aumento de sua pigmentação. Ueda & Nakajima (1999), analisando duas linhagens de *Synechocystis*, uma selvagem e outra mutante deficiente em ficocianina, encontrou que em altas intensidades luminosas e em alta densidade celular da cultura ocorria uma redução do armazenamento de luz nos pigmentos fotossintéticos. A ficocianina, sendo o principal pigmento de armazenamento de luz, diminuía com aumento da intensidade luminosa.

JORGE, R. R.; MORIOKA, L. R. I.; RIBEIRO, M. L. L.; PINOTTI, M. H. P. *Nostoc* sp cultivation under different light intensities for biomass and phycobiliproteins. *Semina: Ci. Biol. Saúde*, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 67-71, jun. 1999/2000.

ABSTRACT: *The aim of this work was to explore the autotrophic growth of Nostoc sp in relation to different light intensities, in order to obtain a greater production of biomass and phycobiliproteins. It was undertaken cultures in three light intensities, 500, 1000 and 2000 lux, using mineral medium BG11. Production of biomass increased with increase of the light intensity. The greater production occurred at 21th day for all light intensities, with 2000 lux obtaining the better yield of biomass (1,034 g/L), corresponding to the productivity of 0,049 g/L . day. The greater production of total phycobiliproteins occurred in 1000 lux, for both the phycobiliproteins, phycocyanin and phycoerithrin.*

KEY WORDS: *Phycobiliproteins; cyanobacteria; Nostoc sp; phycoerithrin; phycocyanin.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAD, S.; YARON, A.. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science & Technology*, v. 3, p. 92 – 99, 1992.
- CHEN, F.; ZHANG, Y.; GUO, S.. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotech. Lett.*, v. 18, n. 5, p. 603 – 608, 1996.
- CUNHA, P. D. Extração e caracterização das ficobiliproteínas das cianobactérias *Nostoc sp* e *Phormidium sp*. Londrina, 1994. (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas).
- ERIKSEN, N. T.; GUEEST, T.; IVERSEN, J. J. L.. Phototrophic growth in the lumostat: a photo-bioreactor with on-line optimization of light intensity. *Journal of Applied Phycology*, v. 8, p. 345-352, 1996.
- FAY, P. *The Blue Greens*. London: E. Arnold, 1983.
- MORENO, J.; RODRIGUEZ, H.; VARGAS, M. A.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G.. Nitrogen fixing cyanobacteria as source of phycobiliprotein pigments. Composition and growth performance of ten filamentous heterocystous strains. *Journal of Applied Phycology*, v. 7, p. 17 – 23, 1995.
- PINOTTI, M. H. P.; SEGATO, R.. Cianobactérias: importância econômica. *Semina*, v. 12, n. 4, p. 275 – 280, 1991.
- ROHLF, F. J.; SOKAL, R. R. *Biometry*. 2 ed. São Francisco, W. H. Freeman, 1981.
- RIBEIRO, M. L. L. *Aspectos gerais de microalgas e extração, caracterização das ficobiliproteínas da cianobactéria Nostoc sp*. Londrina, 1996. Monografia (Especialização em Bioquímica Aplicada)- Universidade Estadual de Londrina.
- RUIZ, L. R. *Spirulina spp* : um potencial inexplorado. In: JORNADA DE BIOQUÍMICA, 7, 1996, Londrina. *Anais...* Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 1996.
- SILVA, H. J.; CORTIÑAS, T.; ERTOLA, R.. Effect of nutritional factors on the culture of *Nostoc sp* as a source of phycobiliprotein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 31, p. 293 – 297, 1989.
- SKULBERG, O. M.. Oscillatorialean cyanoprokaryotes and their application for algae culture technology. *Algological Studies*, v. 75, p. 265 – 278, 1994.
- STANIER, R. Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, v. 35; n. 2, p. 171-205, 1971.
- TADROS, M. G.; SMITH, W.; JOSEPH, B.; PHILLIPS, J.. Yield and quality of cyanobacteria. *Spirulina maxima* in continuous culture in response to light intensity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 39/40, p. 337-347, 1993.
- UEDA, R.; NAKAJIMA, Y.. Improvement of microalgal photosynthesis by reducing the content of lighth harvesting pigment. *Journal of Applied Phycology*, v. 11, p. 195 – 201, 1999.