TECNOLOGIA ENZIMÁTICA PARA CAPTURA DE CO_2: CULTIVO DE MICROALGA PARA OBTENÇÃO DE ANIDRASE CARBÔNICA

JOANA DA COSTA ORES[12], SIBELE SANTOS FERNANDES[2], MARINA CAMPOS ASSUMPÇÃO DE AMARANTE[3], BIBIANA PORTO DA SILVA[2], SUSANA JULIANO KALIL[4*]

RESUMO

Nos últimos tempos existe um forte interesse na estabilização da abundância atmosférica de CO_2 e outros gases de efeito estufa para mitigar os riscos do aquecimento global. As estratégias de redução de emissões de CO_2 incluem a redução do uso global de energia e o desenvolvimento de combustíveis livres ou com baixo teor de carbono. Outra estratégia que pode ser utilizada é a captura e sequestro de CO_2 atmosférico, onde sistemas utilizando a anidrase carbônica tem sido amplamente estudados. Esta enzima encontra-se amplamente distribuída na natureza, sendo as microalgas uma fonte potencialmente atrativa desta biomolécula. Este trabalho apresenta a obtenção da anidrase carbônica a partir da biomassa da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* e sua aplicação na captura enzimática do CO_2. Foi realizado o cultivo da microalga em meio Conway a temperatura de 25 °C e fotoperíodo 12 h claro/escuro. Foi realizado um acompanhamento em termos de biomassa e pH, sendo feita a extração da enzima e determinada a atividade enzimática ao final do cultivo. Obteve-se um extrato enzimático com uma atividade na ordem de 67 U/mg de biomassa e a enzima foi aplicada na captação enzimática do CO_2 eficazmente.

PALAVRAS-CHAVE: Captação enzimática. Cultivo microalgal. *Dunaliella tertiolecta*. Mitigação do CO_2.

ENZYME TECHNOLOGY FOR CO_2 CAPTURE: GROWING MICROALGAE TO OBTAIN CARBONIC ANHYDRASE

ABSTRACT

There has recently been growing interest in stabilizing the abundance of atmospheric CO_2 and other greenhouse gases to mitigate risks of global warming. Strategies to reduce CO_2 emissions comprise the reduction of

Universidade Federal do Rio Grande. Escola de Química e Alimentos. Rua Eng. Alfredo Huch, nº475, Caixa Postal 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.
[1] Doutoranda em Engenharia e Ciência de Alimentos.
[2] Graduandos do Curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande - FURG.
[3] Graduanda do Curso de Engenharia Bioquímica.
[4] Professora no Curso de Engenharia de Alimentos. *Autor correspondente (e-mail: dqmsjk@furg.br).

overall energy use and the development of free or low-carbon fuel. Since another feasible strategy is the capture and sequestration of atmospheric CO_2, systems which use carbonic anhydrase have been extensively studied. This enzyme is widely distributed in nature and microalgae are one of its potentially attractive source. This study deals with the extraction of carbonic anhydrase from biomass of marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and its application to the enzymatic capture of CO_2. Cultivation of microalgae was carried out in Conway medium at 25 °C and 12 h light-dark photoperiod. Biomass and pH were constantly monitored whereas the extraction of the enzyme and the determination of the enzymatic activity were carried out at the end of the cultivation. An enzyme extract, whose activity was 67.2 U/mg of biomass, was obtained and the enzyme was effectively applied to enzymatic CO_2 capture.

KEY WORDS: CO_2 mitigation. *Dunaliella tertiolecta*. Enzymatic capture. Microalgal cultivation.

1. INTRODUÇÃO

O aumento do aquecimento global tem estimulado o desenvolvimento de tecnologias eficazes para mitigação do CO_2. O aumento contínuo da concentração deste gás na atmosfera tem sido extensivamente documentado [25]. Sua concentração aumentou de 280 ppm em 1850 (revolução industrial) para 390 ppm em 2010, e atualmente vem aumentando a uma taxa de 2,4 ppm/ano [16,28].

Este poluente é oriundo principalmente da queima de combustíveis fósseis para geração de energia e transporte, que está associada com aumento da população e industrialização [5]. Outras fontes seriam a queima de florestas e cerrado, e a queima de combustíveis de uso doméstico [25].

Os gases de efeito estufa contribuem não somente para o aquecimento global, mas também para outros impactos no meio ambiente e na vida humana. Os oceanos absorvem aproximadamente um terço do CO_2 emitido a cada ano pelas atividades humanas, tornando a água gradualmente mais ácida, o que pode causar a perda rápida de barreiras de corais e da biodiversidade do ecossistema marinho com enormes implicações na vida marinha e, consequentemente, na vida terrestre [23].

As emissões de gases de efeito estufa do transporte marítimo internacional são uma preocupação crescente. Embora os acordos internacionais sobre o clima, como o Protocolo de Quioto, exigirem que as nações considerem propostas políticas de mitigação de CO_2 para fontes terrestres de emissões, houve pouco progresso em relação à aviação e transporte naval internacionais [7].

Muitos países e regiões ao redor do mundo estabeleceram metas para redução de CO_2, a fim de cumprir os objetivos de sustentabilidade previstos no Protocolo de Kyoto. Várias opções estão sendo estudadas e implementadas, com diferentes graus de sucesso, e em diferentes fases de estudo e implementação. Alguns exemplos são energia solar, térmica ou fotovoltaica, hidrelétrica, eólica, geotérmica, biocombustíveis, sequestro de carbono, entre outros. Cada alternativa possui vantagens e problemas, e a escolha da melhor opção irá depender da área de aplicação [19].

Dentre as estratégias para redução de emissões de CO_2 está o sequestro deste gás a partir de fontes pontuais ou atmosféricas através de técnicas naturais e de engenharia [17]. Dentro deste contexto, os sistemas biológicos, que utilizam a enzima anidrase carbônica, vêm ganhando cada vez mais atenção. Estes sistemas são baseados em reações que ocorrem naturalmente nos organismos vivos e são uma via potencial para a melhoria destas tecnologias [14]. Porém, a viabilidade do processo de captura enzimático reside inicialmente na obtenção da enzima a partir de fontes viáveis.

A anidrase carbônica é uma metaloenzima que catalisa com alta eficiência a hidratação reversível do CO_2 em bicarbonato, uma reação fundamental para processos biológicos como a fotossíntese e respiração. Pode ser encontrada em diversos organismos, como animais, vegetais e algas [15], sendo o último uma fonte potencialmente viável para obtenção da enzima.

O cultivo de microalgas possui algumas vantagens, como rápido crescimento; possibilidade de cultivo em águas salobra e/ou salgada, liberando o uso de água doce para o consumo humano e agricultura; tolerância a fatores ambientais extremos, podendo ser cultivadas intensivamente em pequenos espaços e em regiões impróprias para atividades agrícolas [4].

De acordo com o exposto, considerando a importância da obtenção da enzima anidrase carbônica para utilização em tecnologias de mitigação do CO_2, este trabalho teve como objetivo investigar a produção da enzima pela microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* e seu uso na captura enzimática do CO_2.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microalga e meio de cultivo

A microalga *Dunaliella tertiolecta* utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

No preparo do cultivo e manutenção da alga marinha foi utilizado o meio Conway [27], empregando-se água marinha natural com salinidade de 28 [21].

2.2. Cultivo em fotobiorreator

O cultivo foi realizado em triplicata em erlenmeyer de 1 L contendo 800 mL do meio de cultivo adicionado de 10% de inóculo e incubados a 25±1 °C [21]. A aeração foi realizada por injeção constante de ar estéril (385 mL/min) e a iluminância foi promovida por lâmpadas florescentes de 20 W do tipo *daylight*, fornecendo 3000 lx, com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro.

Foi realizado um acompanhamento da concentração de biomassa e da variação do pH, sendo retiradas amostras assepticamente a cada 24 h.

2.3. Investigação da produção da enzima anidrase carbônica

Ao final do cultivo foi realizada a determinação da atividade enzimática para verificar a produção da enzima pela microalga, como a anidrase carbônica é intracelular foi necessário uma etapa de ruptura celular. O rompimento celular foi realizado através de tratamento ultrassônico utilizando um homogeneizador ultrassônico (Sonic Ruptor 250, Omni International Inc., EUA) com frequência de 20 kHz por 10 min em banho de gelo. Foram utilizadas suspensões com concentração de 0,5, 1 e 1,5 g de biomassa/L. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após a etapa de rompimento celular, as suspensões resultantes foram centrifugadas à 5200 ×*g* por 10 min a uma temperatura de 4 °C utilizando uma centrífuga refrigerada (Cientec CT-5000R, Brasil), e o sobrenadante, livre de células, utilizado para medida da atividade enzimática. O extrato enzimático foi caracterizado, também, em termos de concentração de clorofila a e b.

2.4. Determinação dos parâmetros cinéticos

A partir dos valores de concentração de biomassa, foram determinados os parâmetros cinéticos: concentração de biomassa máxima (X_{max}, g/L), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}, 1/dia) e produtividade máxima de biomassa (P_{max}, g/L/dia).

A produtividade máxima de biomassa foi calculada através da Equação 1 [26].

$$P_{max} = (X_t - X_0)/(t - t_0) \qquad (1)$$

onde:

X_0: concentração de biomassa inicial (g/L) no tempo t_0;

X_t: concentração de biomassa (g/L) em qualquer momento t subsequente ao t_0.

A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada pela regressão exponencial da porção logarítmica da curva de crescimento [2].

2.5. Captura enzimática do CO_2

Para verificar a viabilidade do uso da enzima obtida a partir da microalga marinha foram realizados ensaios de captura enzimática do CO_2.

A anidrase carbônica extraída da biomassa microalgal foi utilizada como catalisador para a hidratação do CO_2 e o mesmo foi precipitado na forma de carbonato de cálcio ($CaCO_3$). Em erlenmeyers contendo o extrato enzimático, adicionou-se tampão tris 1,2 M contendo 4,5% de cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) na proporção 1:1. A reação foi iniciada com a adição de uma solução de água deionizada saturada com CO_2. Após determinados intervalos de tempo, a mistura foi filtrada e seca para ser mensurada a quantidade de $CaCO_3$ precipitado (ensaio enzimático). Também foram realizados ensaios substituindo o extrato enzimático por água deionizada (ensaio não-enzimático) [22].

2.6. Determinações analíticas

A atividade enzimática foi determinada utilizando como substrato o *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA), segundo Pocker e Stone [24]. A mistura reacional consistiu em tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,4, solução enzimática e solução 3 mM de *p*-nitrofenil acetato, sendo registrado o aumento da absorvância a 400 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio.

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 680 nm e conversão para biomassa seca através de curva padrão [8]. Uma alíquota do cultivo foi centrifugada a 5200 $\times g$ por 10 min e o sobrenadante desprezado. As células foram lavadas com água destilada, e novamente centrifugadas. A biomassa foi ressuspendida com água destilada e feita leitura da absorvância em espectrofotômetro a 680 nm. A concentração celular foi convertida para peso seco conforme curva de calibração.

A extração da clorofila a e b foram realizadas com éter dietílico segundo metodologia de Dere, Günes e Sivaci [10] e a concentração destes pigmentos foram calculadas conforme equações de Lichtenthaler e Wellbrurn [18].

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um medidor de pH (Hanna Instruments®, modelo pH 21) segundo AOAC [1].

2.7. Análise estatística

Os resultados de extração da enzima foram tratados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com um nível de confiança de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na FIGURA 1 estão apresentados, respectivamente, o acompanhamento do crescimento celular da microalga *Dunaliella tertiolecta* e a variação do pH do meio ao longo do cultivo em fotobiorreator.

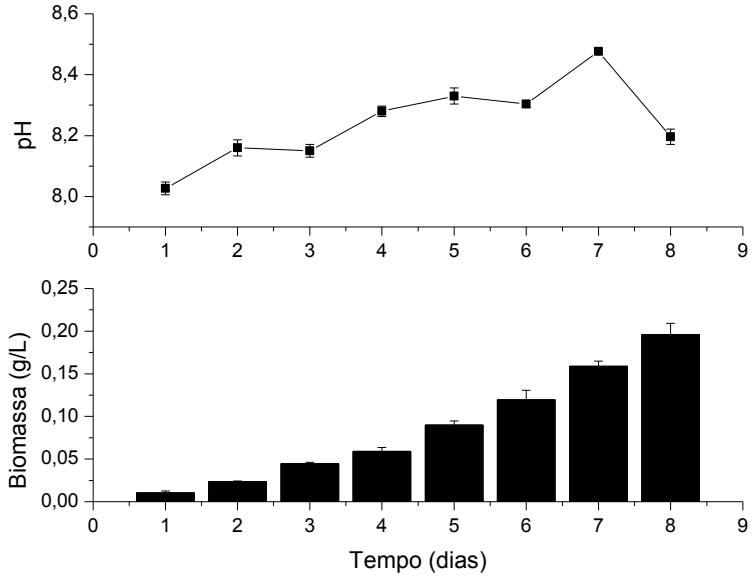


Figura 1. Acompanhamento do crescimento celular e variação do pH durante o cultivo da *Dunaliella tertiolecta*.

A concentração celular máxima de 0,20±0,01 g/L foi alcançada em 8 dias de cultivo. Os parâmetros cinéticos velocidade específica máxima de crescimento e produtividade máxima alcançados para a *D. tertiolecta* foram 0,327±0,01 1/dia e 0,03±0,002 g/L/dia, respectivamente. O pH do meio aumentou ao longo do cultivo, em relação ao pH inicial de 7,9, mantendo-se acima de 8,0, valor este favorável para a atuação da enzima.

A TABELA 1 apresenta os resultados de atividade, clorofila a e clorofila b obtidos após a ruptura celular das amostras com diferentes concentrações celulares.

Tabela 1. Resultados do ensaio de extração da anidrase carbônica utilizando diferentes concentrações celulares.

Resposta	Concentração celular (g/L)		
	0,5	***1,0***	***1,5***
Atividade específica (U/g)	66,7 ± 2,6[a]	67,2 ± 1,3[a]	65,3 ± 3,6[a]
Atividade (U/mg clorofila a)	2,2 ± 0,03[b]	2,3 ± 0,03[a]	2,1 ± 0,03[c]
Clorofila a (µg/mg)	32,4 ± 1,4[a]	29,1 ± 0,7[b]	30,1 ± 1,5[a,b]
Clorofila b (µg/mg)	16,4 ± 0,5[a]	15,1 ± 0,5[a]	13,3 ± 0,6[b]

[a]Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias ($p<0,05$)

Obtiveram-se extratos enzimáticos com atividade máxima de 67,2 U/g, sendo que os valores alcançados com as três concentrações estudadas foram estatisticamente iguais. O maior teor de clorofila a foi obtido no ensaio com 0,5 g/L de biomassa, que foi estatisticamente igual ao ensaio com 1,5 g/L. Os maiores valores de clorofila b, foram obtidos com 0,5 e 1,0 g/L.

Chinnasamy et al. [6] estudaram o efeito de elevadas concentrações de CO_2 e de diferentes temperaturas no crescimento da alga *Chlorella vulgaris* ARC 1, avaliando também a influência na atividade da enzima anidrase carbônica. Em condições ambientais (0,036% de CO_2), foram obtidas atividades de 12,2 e 14,8 U/mg de clorofila, sendo que os autores determinaram a atividade de hidratase, que utiliza como substrato o CO_2.

As três concentrações celulares resultaram em um bom rendimento em termos de extração da enzima. Porém, a concentração de biomassa mais favorável para realizar um acompanhamento da atividade enzimática e concentração de clorofila ao longo do cultivo seria a de 0,5 g/L.

A FIGURA 2 apresenta os resultados do ensaio de captação enzimática do CO_2. Foi realizada uma cinética de precipitação do CO_2 na forma de carbonato de cálcio ($CaCO_3$).

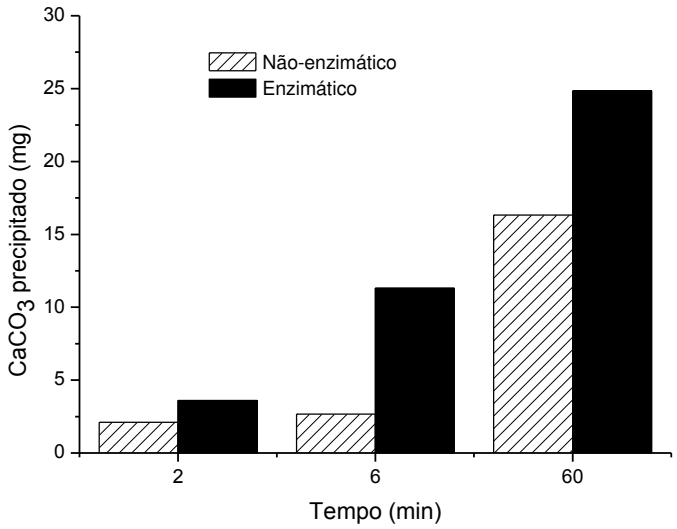


Figura 2. Cinética de precipitação do carbonato de cálcio.

Como pode ser observado na FIGURA 2, a anidrase carbônica obtida da biomassa microalgal da *Dunaliella tertiolecta* catalisou a hidratação do CO_2, que precipitou mais rapidamente na forma de $CaCO_3$ na presença da enzima.

Estudos anteriores [12,20] demonstraram que a massa total de $CaCO_{3(s)}$ precipitada não depende da concentração da enzima, a anidrase carbônica apenas altera a cinética para atingir o equilíbrio. Este comportamento pode ser observado na FIGURA 2. A reação na presença da anidrase carbônica (ensaio enzimático) apresentou uma taxa inicial de precipitação do $CaCO_3$ superior ao ensaio não-enzimático.

Os poucos estudos que usam a anidrase carbônica para a captura de CO_2 utilizam preparações enzimáticas altamente purificadas ou de fontes de difícil ampliação de escala, como sangue humano [3,9,11,12,20], o que aumenta o custo do processo, limitando a aplicabilidade deste tipo de tecnologia. No presente trabalho, além de a enzima ter sido obtida de uma fonte potencialmente viável, a biomassa resultante do processo de extração pode ainda ser destinada para outros fins, como incorporação em ração animal.

4. CONCLUSÃO

Ao final do cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* obteve-se um extrato enzimático com uma atividade na ordem de 67 U/mg de biomassa. A enzima apresentou potencial para aplicação em processos de captação enzimática do CO_2.

Sendo assim, a biomassa microalgal mostrou ser uma fonte viável para obtenção da anidrase carbônica.

5. REFERÊNCIAS

[1] AOAC – Association Of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th. v. II., Virginia, 2000.

[2] BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd ed. Singapore, McGraw-Hill, 1986.

[3] BOND, G.M.; STRINGER, J.; BRANDVOLD, D.K.; SIMSEK, F.A.; MEDINA, M.G.; EGELAND, G. Development of integrated system for biomimetic CO_2 sequestration using the enzyme carbonic anhydrase. Energy & Fuels, v. 15, p. 309-316, 2001.

[4] BORGES, L.; FARIA, B.M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P.C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: Primeiros passos para o desenvolvimento de um mecanismo de desenvolvimento limpo. Atlântica, v. 29, n. 1, p. 35-46, 2007.

[5] CHANG, E.H.; YANG, S.S. Microalgae for biofixation of carbon dioxide – Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. Botanical Bulletin of Academia Sinica, Taipei, v. 44, p. 43-52, 2003.

[6] CHINNASAMY, S.; RAMAKRISHNAN, B.; BHATNAGAR, A.; DAS, K.C. Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO_2 and temperature. International Journal of Molecular Sciences, v. 10, p. 518-532, 2009.

[7] CORBETT, J.J.; WANGB, H.; WINEBRAKE, J.J. The effectiveness and costs of speed reductions on emissions from international shipping. Transportation Research Part D, v. 14, p. 593-598, 2009.

[8] COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; FILHO, P.D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of Spirulina platensis growth in fresh water using response surface methodology. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 18, p. 603-607, 2002.

[9] DAVY, R. Development of catalysts for fast, energy efficient post combustion capture of CO_2 into water; an alternative to monoethanolamine (MEA) solvents. Energy Procedia, v. 1, p. 885-892, 2009.

[10] DERE, S.; GÜNES, T.; SIVACI, R. Spectrophotometric determination of chlorophyll - a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. Turkish Journal of Botany, Turkey, v. 22, p. 13-17, 1998.

[11] DILMORE, R.; GRIFFITH, C.; LIU, Z.; SOONG, Y.; HEDGES, S.W.; KOEPSEL, R.; ATAAI, M. Carbonic anhydrase-facilitated CO2 absorption with polyacrylamide buffering bead capture. International Journal of Greenhouse Gas Control, v. 3, p. 401-410, 2009.

[12] FAVRE, N.; CHRIST, M.L.; PIERRE, A.C. Biocatalytic capture of CO_2 with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 60, p. 163–170, 2009.

[14] FIGUEROA, J.D.; FOUT, T.; PLASYNSKI, S.; MCILVRIED, H.; SRIVASTAVA, R.D. Advances in CO_2 capture technology – The U.S. Department of Energy's Carbon

Sequestration Program. International Journal of Greenhouse Gas Control, v. 2, p. 9-20, 2008.

[15] HEWETT-EMMETT, D.; TASHIAN, R.E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α-, β-, and γ-carbonic anhydrase gene families. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 5, n. 1, p. 50-77, 1996.

[16] IPCC – Intergovernmental Panel On Climate Change. Climate change 2007: the scientific basis. In: Solomon, S. (Ed.), Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge Univ. Press, New York, 2007.

[17] LAL, R. Carbon sequestration. Philosophical Transactions of The Royal Society B, v. 363, p. 815-830, 2008.

[18] LICHTENTHALER, H.K.; WELLBURN, A.R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf in different solvents. Biochemical Society Transactions, London, v. 11, p. 591-592, April 1985.

[19] MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, p. 217-232, 2010.

[20] MIRJAFARI, P.; ASGHARI, K.; MAHINPEY, N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO_2 sequestration purposes. Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 46, p. 921-926, 2007.

[21] OLIVEIRA, L.S.; PEREIRA, S.A.; NASCIMENTO, I.A.; MENDES, C.Q.; CRUZ, A.C.S.; LEITE, M.B.N.; ARAUJO, V.Q.; MARQUES, S.S.I.; CABANELAS, I.; VICH, D.; TOSTO, M. Biocombustíveis de microalgas: seleção das melhores espécies com base na produção de lipídios. In.: VII SEMBIO - Semana de Biologia da UFBA: Protegendo nossas Florestas. Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, p. 35-37, 2011.

[22] ORES, J.C.; SALA, L.; CERVEIRA, G.P.; KALIL, S.J. Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon dioxide. Chemosphere, v. 88, p. 255-259, 2012.

[23] ORMEROD, W.G.; FREUND, P.; SMITH, A.; DAVISON, J. Ocean storage of CO_2. IEA greenhouse gas R&D programme. UK: International Energy Agency, 2002.

[24] POKER, Y.; STONE, J.T. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. Biochem., v. 6, p. 668-678, 1976.

[25] RAMANATHAN, V.; FENG, Y. Air pollution, greenhouse gases and climate change: Global and regional perspectives. Atmospheric Environment, v. 43, p. 37-50, 2009.

[26] SCHMIDELL, W.; LIMA, A.U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA. ISBN: 85-212-0279-2, 2001.

[27] WALNE, P.R. Experiments in the large scale culture of the larvae of Ostrea edulis. Fishery Investigations, v. 25, n. 4, p.1-53, 1966.

[28] WMO – World Meteorological Organization. Greenhouse gas bulletin: The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Based on Global Observations through 2009. N° 6: 24, November 2010.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.