

## Área: Ciência de Alimentos

# DIFERENTES FONTES DE NUTRIENTES NA SÍNTESE DE CARBOIDRATOS PELA MICROALGA *Spirulina platensis*

Luana Garbin Cardoso\* Elenara de Araújo, Noany Volpato, Ana Cláudia Freitas

Margarites, Telma Elita Bertolin, Luciane Maria Colla

*Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS*

*\*E-mail: 121081@upf.br*

**RESUMO** – Objetivou-se estudar as condições de cultivo que permitem o acúmulo de carboidratos na microalga *Spirulina platensis* LEB-52. Os efeitos das variáveis concentração de  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{NaCl}$  no teor de carboidratos foram avaliados por Planejamento fatorial completo  $2^2$ . Adicionou-se glicose em batelada alimentada. Os experimentos foram realizados em fotobiorreator fechado até a fase estacionária de crescimento. A concentração de carboidratos foi avaliada ao final dos cultivos. A maior concentração de carboidratos foi obtida quando a microalga foi cultivada com menor concentração de  $\text{NaNO}_3$  ( $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ ) e maior concentração de  $\text{NaCl}$  ( $1,20 \text{ g.L}^{-1}$ ).

**Palavras-chave:** bioetanol, carbono, fósforo, nitrogênio, salinidade.

## 1 INTRODUÇÃO

As microalgas estão sendo foco de estudos nos últimos anos devido o seu alto potencial biotecnológico por ser de grande aplicabilidade em diversas áreas, como farmacêutica, ambiental, indústrias de alimentos e de cosméticos. (DERNER, 2006)

A necessidade por novas fontes alternativas de energia sustentável tornou importante o estudo destes microrganismos no campo dos biocombustíveis de terceira geração produzidos a partir de seus compostos de reserva energética. Os cultivos de microalgas não necessitam de grandes áreas férteis, não ocupando grandes extensões de terras agricultáveis e áreas de florestas, o que não prejudica as culturas de alimentação humana e o meio ambiente

O crescimento e a composição bioquímica das microalgas dependem da natureza de cada espécie além de outros fatores, como disponibilidade de nutrientes, luminosidade e pH. A maioria das microalgas quando cultivadas em meio completo em termos de repleto de nutrientes, principalmente em relação às necessidades de nitrogênio, são fontes de proteína, porém quando submetidas a condições de estresse, com restrição de

nutrientes, podem acumular mais compostos de armazenamento de energia como lipídeos e carboidratos. (RICHMOND, 1990).

O nitrogênio é um componente importante para a formação de proteínas, portanto quando presente em pouca quantidade faz com que lipídios e carboidratos sejam sintetizados preferencialmente. As microalgas utilizam como fonte de carbono o gás carbônico através da fotossíntese. Porém, quando adicionadas fontes orgânicas de carbono, pode haver a síntese de carboidratos e lipídeos. Os meios de cultivos utilizados para o crescimento podem ser facilmente manipulados com o objetivo de aumentar o teor de carboidratos, lipídeos ou mesmo proteínas presentes em sua biomassa para posterior aplicação na indústria de alimentos, produção de biocombustíveis de terceira geração, entre outras áreas. No caso dos carboidratos, estes podem ser utilizados para a produção de bioetanol. Neste contexto, objetivou-se avaliar o crescimento e o acúmulo de carboidratos da microalga *Spirulina platensis* LEB-52 cultivada em diferentes concentrações de nutrientes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A microalga *Spirulina platensis* LEB-52, utilizada neste estudo foi cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A microalga foi cultivada em meio Zarrouk modificado nas concentrações da fonte salina e de nitrogênio, segundo planejamento experimental (Tabela I), utilizando fotobiorreatores tipo erlenmeyers de 2 L com agitação por meio de injeção de ar e fotoperíodo de 12 h claro/escuro. A concentração celular inicial dos cultivos foi de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ , a qual foi determinada a cada 24 h através da medida de densidade ótica em espectrofotômetro a 670 nm (COSTA et al., 2002).

Adicionou-se glicose ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) em batelada alimentada à partir do momento em que a concentração celular da microalga chegou a  $0,3 \text{ g L}^{-1}$ , sendo determinado o consumo dos açúcares redutores através do método de DNS (MILLER, 1959).

Para avaliar a influência das concentrações do componente nitrogenado ( $\text{NaNO}_3$ ) e Cloreto de sódio, presentes no meio de cultivo Zarrouk (1966), na concentração de carboidratos da microalga foi utilizado um Planejamento Fatorial Completo  $2^2$  com adição de glicose em batelada alimentada. Para efeitos de comparação, dois experimentos controle foram realizados nas concentrações normais de nutrientes, sem adição de glicose.

Tabela I. Matriz do Planejamento Fatorial Completo  $2^2$  utilizado para avaliar a influência das concentrações de nitrato de sódio e cloreto de sódio no meio de cultivo Zarrouk (1966), sobre o crescimento celular e acúmulo de carboidratos.

Exp.	X <sub>1</sub> (NaNO <sub>3</sub> g L <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub> (NaCl g L <sup>-1</sup> )
1	-1 (1,250)	-1 (1,10)
2	+1 (1,875)	-1 (1,10)
3	-1 (1,250)	+1 (1,20)
4	+1 (1,875)	+1 (1,20)
<u>Controle</u>	0 (2,500)	0 (1,00)

#### Determinação dos parâmetros de crescimento

A concentração celular da microalga foi determinada a cada 48 h através da medida de densidade ótica em espectrofotômetro a 570 nm, utilizando-se uma relação pré-estabelecida entre o peso seco de biomassa e a absorbância. Os cultivos foram mantidos até a fase estacionária de crescimento. A velocidade específica máxima de crescimento  $\mu_{\text{Máx}}$  (d<sup>-1</sup>) foi determinada por regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

#### Determinação de carboidratos na biomassa

A determinação de carboidratos na biomassa foi determinada pelo método de DNS (MILLER, 1959), com prévia hidrólise ácida dos polissacarídeos através da adição de HCl 1,5 N.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura I apresenta as curvas de crescimento dos experimentos do planejamento experimental completo  $2^2$  e do experimento controle.

Figura I. Curvas de crescimento dos experimentos 1 (◆), 2 (■), 3 (▲), 4 (x) e Controle (●)

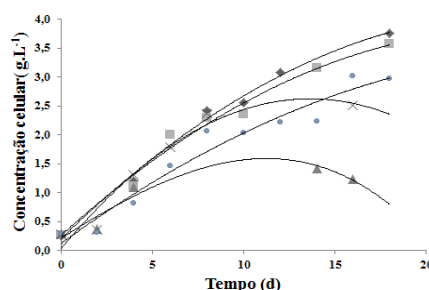


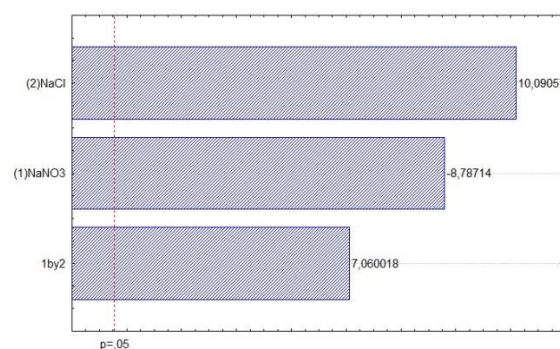
Tabela II. Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{Máx}}$ , dia<sup>-1</sup>), Concentração celular máxima ( $X_{\text{Máx}}$ , g.L<sup>-1</sup>) e concentração de carboidratos (% p/p).

Ensaio	$X_{\text{Máx}}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$\mu_{\text{Máx}}$ (d <sup>-1</sup> )	$\Delta t$ log	Carboidratos(% p/p)
1	3,256	0,2720	9	51,05
2	3,569	0,2966	12	39,48
3	1,780	0,3120	8	62,03
4	2,363	0,2974	8	56,22
Controle	3,108	0,3130	8	28,89

Avaliando-se os resultados do planejamento experimental verifica-se que as variáveis NaNO<sub>3</sub> e NaCl apresentaram efeito significativo em  $X_{\text{Máx}}$  e  $\mu_{\text{Máx}}$ , no nível de 90% de confiança. O ensaio que apresentou superior  $X_{\text{Máx}}$  foi o 2 (3,569 g.L<sup>-1</sup>), quando a microalga foi cultivada com a concentração superior de NaNO<sub>3</sub> e concentração inferior de NaCl. Este ensaio apresentou concentração superior ao ensaio controle (3,108 g.L<sup>-1</sup>). O ensaio 3, realizado com inferior concentração de NaNO<sub>3</sub> e superior concentração de NaCl, apresentou a maior  $\mu_{\text{Máx}}$  (0,312 d<sup>-1</sup>), sendo esta similar ao ensaio controle (0,3120 d<sup>-1</sup>). O ensaio 2 quando comparado ao 3, com apenas dois dias a mais de cultivo apresentou um aumento de 100% na  $X_{\text{Máx}}$  (3,569 g.L<sup>-1</sup> e 1,780 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente) e insignificante diminuição na velocidade específica máxima de crescimento (0,2966 d<sup>-1</sup> e 0,312 d<sup>-1</sup>, respectivamente), portanto pode ser considerado o ensaio no qual se obteve os melhores resultados.

A Figura II representa o diagrama de Pareto, o qual demonstra o efeito das variações de diferentes concentrações de nitrato de sódio e cloreto de sódio no teor de carboidratos da *Spirulina platensis* LEB-52.

Figura II. Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis concentração dos componentes NaNO<sub>3</sub> e NaCl.

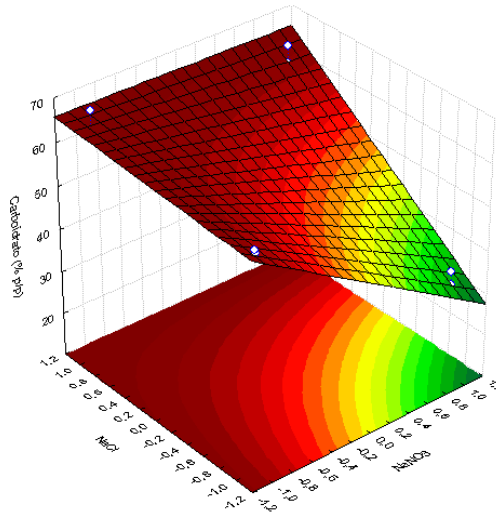


----

De acordo com o diagrama de Pareto os efeitos principais de NaCl e NaNO<sub>3</sub>, assim como a interação entre estes apresentaram efeito significativo num intervalo de confiança de 95%.

A Figura III apresenta a superfície de resposta das concentrações de carboidratos obtidos através do planejamento experimental 2<sup>2</sup>.

Figura III. Superfície de Reposta para concentração de carboidratos (%) nos ensaios do Planejamento Experimental de *Spirulina platensis* em função das concentrações de NaCl e  $\text{NaNO}_3$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ).



De acordo com a Figura III, a maior concentração de carboidratos foi obtida no experimento 3, no qual a microalga foi cultivada com menor concentração de  $\text{NaNO}_3$  ( $0,125 \text{ g.L}^{-1}$ ) e maior concentração de NaCl ( $1,20 \text{ g.L}^{-1}$ ).

As concentrações de  $\text{NaNO}_3$  apresentaram efeitos significativos para carboidratos ( $p < 0,05$ ), considerando-se um intervalo de confiança de 95%. A redução do componente nitrogenado apresentou efeito negativo e significativo ( $-14,9325$ ) demonstrando que com a redução do componente nitrogenado houve um aumento no teor de carboidratos. O aumento da concentração salina apresentou efeito positivo e significativo ( $17,1475$ ) indicando que com o aumento da concentração salina houve aumento no percentual de carboidratos.

A maior concentração de carboidratos foi verificada no Experimento 3 o qual foi cultivado sob a menor concentração do componente nitrogenado ( $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ ) e maior concentração de NaCl ( $1,20 \text{ g.L}^{-1}$ ). O mesmo apresentou 62,03% de carboidrato, sendo que o experimento padrão apresentou apenas 28,89%, demonstrando grande aumento no percentual de carboidratos com a redução do componente nitrogenado e aumento de concentração salina.

O nitrogênio é considerado um importante componente para o metabolismo das microalgas, pois contribui para a formação das proteínas, portanto a redução na quantidade desse elemento no meio de cultura faz com que lipídeos e carboidratos sejam sintetizados preferencialmente (RIGANO et al., 1998). O estresse salino afeta a atividade osmótica das células, alterando, portanto, as características de produção de compostos importantes para a permeabilidade celular, podendo levar ao acúmulo, principalmente, de lipídios (ABALDE et al., 1995).

## 4 CONCLUSÃO

As concentrações do componente nitrogenado ( $\text{NaNO}_3$ ) e do componente salino ( $\text{NaCl}$ ), apresentaram efeito significativo em  $X_{\text{Máx}}$  e  $\mu_{\text{Máx}}$ , para microalga *Spirulina platensis* LEB-52. O ensaio que apresentou superior  $X_{\text{Máx}}$  foi o 2 ( $3,569 \text{ g.L}^{-1}$ ), sendo também superior a do ensaio controle ( $3,108 \text{ g.L}^{-1}$ ). O ensaio 3 apresentou a maior  $\mu_{\text{Máx}}$  ( $0,312 \text{ d}^{-1}$ ), sendo esta similar ao ensaio controle ( $0,312 \text{ d}^{-1}$ ).

A maior concentração de carboidratos ocorreu no Experimento 3, o qual continha a menor concentração do componente nitrogenado ( $1,250 \text{ g.L}^{-1}$ ) e maior concentração do componente salino ( $1,20 \text{ g.L}^{-1}$ ), associado a adição de glicose na concentração de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de modo batelada alimentada. Estas podem ser utilizadas como matéria-prima alternativa à matriz energética atual, diminuindo problemas como utilização de alimentos para produção de biocombustíveis.

## 5 AGRADECIMENTOS

CNPQ, FAPERGS, a Universidade de Passo Fundo e Universidade Federal do Rio Grande.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABALDE J. et. al. **Microalgas: Cultivos y Aplicaciones**. 1ª Ed. Universidade da Coruña, Espanha, p. 1995. 210.
- COSTA, J.A.V; COLLA, L.M.; FILHO, P.F.D.; KABKE, K.; WEBER, A. Moelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using responde surface methodology. **Journal of MicrobiolBiotechnol** 2002; 50(1):161-167.
- DERNER, Roberto Bianchini et al. **Microalgas, produtos e aplicações**. *Cienc. Rural*. 2006, vol.36, n.6, pp. 1959-1967
- MILLER, G. L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal.Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- RICHMOND, A. Outdoor mass cultures of microalgae: **Biological principles, production systems**. In: RICHMOND, A. (ed.). CRC Handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Florida, USA, 1990. p. 285-330
- RIGANO, V. D. M. et al., The physiologican significance of light and dark  $\text{NH}_4^+$  metabolism in *Chlorella sorokiniana*. *Phytochemistry*, v. 47, p. 177-181, 1998.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: E. Blücher, 2001. 254 p.
- WATANABE, A. List of algalstrains in collection at theInstitute of appliedmicrobiologyUniversity of Tokyo. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 6, p. 1-4, 1960.
- ZARROUK, C. **Contribution à I étude d une Cyanophycée**: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *spirulina máxima*. 1966. Thesis (Ph.D) - Université Des Paris, Paris, 1966.