

Área: Engenharia de Alimentos

CULTIVO SEMICONTÍNUO DE *Spirulina* sp. LEB-18 PARA SÍNTESE DE BIOPOLÍMEROS

Jéssica Corá, Juliana Botelho Moreira, Ana Luiza Machado Terra, Mariana Souza de Oliveira, Jorge Alberto Vieira Costa e Michele Greque de Moraes*

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Cursos de Engenharia de Alimentos e Engenharia Bioquímica, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS

*E-mail: michele.morais@pq.cnpq.br

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi estudar o cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 e avaliar a síntese de biopolímeros. O cultivo foi realizado em duplicata, a 30 °C, 3200 lux e fotoperíodo 12 h claro/escuro, em fotobiorreatores tubulares verticais, com volume útil de 1,5 L. A concentração celular inicial foi 0,2 g.L⁻¹. Ao chegar no final da fase exponencial de crescimento foram realizados os cortes. A taxa de renovação de meio estudada foi 20 %. A extração de biopolímeros da biomassa microalgal foi realizada através de digestão diferencial ao final do cultivo. A partir do cultivo semicontínuo da *Spirulina* sp. LEB-18 com taxa de renovação de 20 % foi obtido P_{máx} de 0,247 ± 0,177 g.L⁻¹.d⁻¹, μ_{máx} de 0,140 ± 0,025 d⁻¹, concentração celular de 1,59 ± 0,32 g.L⁻¹ e rendimento em biopolímeros de 15,5 ± 4,80 %.

Palavras-chave: Ciclo de crescimento, polímeros biodegradáveis, taxa de renovação.

1 INTRODUÇÃO

A intensa utilização de materiais poliméricos de origem petroquímica e a lenta degradabilidade desses têm contribuído para amplificação de problemas de gestão de resíduos sólidos. Os atuais processos de fabricação e de eliminação destes materiais favorecem ainda o aumento dos níveis de dióxido de carbono na atmosfera, contribuindo para o aquecimento global. Em resposta a estes problemas, tem sido proposto o uso de polímeros biodegradáveis como uma alternativa aos plásticos sintéticos (LEE, et al. 2008).

Segundo a *American Standard for Testing and Methods* (ASTM) D-883 (2012), biopolímeros são polímeros degradáveis, os quais a degradação é realizada ação de micro-organismos, como bactérias, algas e fungos, por ocorrência natural.

Cianobactérias apresentam potencial para síntese de biopolímeros, como por exemplo, o poli-β-hidroxibutirato. Dependendo das condições de cultivo, esses micro-organismos podem ser estimulados a sintetizar e acumular biopolímeros (PANDA e MALLICK, 2006).

A microalga *Spirulina* é uma cianobactéria pertencente ao grupo das Cyanophyta, também denominadas algas azuis. Caracteriza-se por sua organização celular procariótica, filamentosa, que forma tricomas cilíndricos multicelulares, e se dispõem na forma espiralada (VONSHAK, 1997).

Para a síntese de biopolímeros as microalgas podem ser cultivadas em modo semicontínuo, no qual há substituição de parte do meio de cultivo em intervalos periódicos e coleta da biomassa, geralmente quando a concentração desta é alta. Com esse modo de cultivo é possível a manutenção da cultura de crescimento por tempos mais prolongados, procedendo-se apenas a alimentação periódica de meio de cultivo novo (LOURENÇO, 2006).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 e avaliar a síntese de biopolímeros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e condições de cultivo

A microalga estudada foi a *Spirulina* sp. LEB-18, cultivada em meio Zarrouk. Os cultivos foram realizados em duplicata, sob condições controladas a 30 °C, 3200 lux e fotoperíodo 12 h claro/escuro (REICHERT et al., 2006), em fotobiorreatores tubulares verticais, com volume útil de 1,5 L.

A concentração inicial da biomassa foi 0,2 g.L⁻¹ e a taxa de renovação estudada nos cultivos foi de 20%. A concentração celular alcançada no final da fase exponencial de crescimento foi definida como concentração celular de corte.

2.2 Concentração de biomassa microalgal e monitoramento do pH

A cada 24 h foram coletadas amostras para determinação da concentração de biomassa, calculada através da densidade ótica a 670 nm (COLLA et al., 2007) em espectrofotômetro FEMTO modelo Plus 700 com curva de calibração relacionando densidade ótica e peso seco de biomassa. Também foi acompanhado o pH a cada 24 h, sendo a medição realizada através de pHmetro digital (Quimis Q400H, Brasil).

2.3 Parâmetros cinéticos

Foram avaliadas a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$) para cada ciclo de crescimento da microalga. A $\mu_{\text{máx}}$ foi obtida por regressão exponencial na fase logarítmica de crescimento celular, e a $P_{\text{máx}}$ calculada segundo a Eq. (1).

$$P = (X - X_0)/(t - t_0) \quad (1)$$

Onde: X (g.L^{-1}) é a concentração celular final, X_0 (g.L^{-1}) é a concentração celular inicial do cultivo, t (d) é o tempo final e t_0 (d) é o tempo inicial do cultivo.

2.4 Extração de biopolímeros

Ao final dos experimentos, foi realizada a extração de biopolímeros com a microalga *Spirulina* sp. LEB-18. A extração foi realizada através de digestão diferencial. O rendimento foi calculado, a partir da Eq. (2).

$$\eta = m_b * 100 / m \quad (2)$$

Onde: η é o rendimento de biopolímeros em relação à biomassa microalgal (%), m_b é a massa final de biopolímeros (g) e m é a biomassa microalgal (g).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a curva de crescimento do cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina* sp. LEB -18.

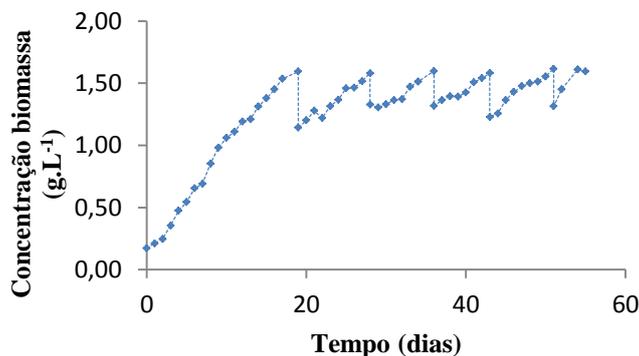


Figura 1. Concentração celular do cultivo semicontínuo em função do tempo, com concentração de corte de 1,6 g.L^{-1} e taxa de renovação de 20 %.

A partir da Figura 1, nota-se que não houve fase de adaptação. Pode-se dizer que essa situação ocorreu principalmente porque as células foram bem adaptadas aos parâmetros de crescimento (mesmo meio de cultura, intensidade de luz, agitação) (LOURENÇO, 2006). Contudo, a limitação do crescimento em culturas densas pode ocorrer devido ao sombreamento provocado pelas próprias células, impedindo que parte da cultura receba luz (FABREGAS et al., 2001). Apesar de a concentração celular de corte deste trabalho ser elevada quando comparada a outros (HENRARD et al., 2011; REICHERT et al., 2006) não foi percebida a influência desse fenômeno, uma vez que os experimentos mantiveram-se em elevadas velocidades de crescimento e produtividades (Tabela 1).

Tabela 1. Ciclo de crescimento (N), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}) e produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) da microalga *Spirulina* sp. LEB-18.

N	$\mu_{\text{máx}}$ *	$P_{\text{máx}}$ *
1°	0,140 ± 0,025	0,162 ± 0,071
2°	0,047 ± 0,009	0,093 ± 0,034
3°	0,030 ± 0,000	0,111 ± 0,004
4°	0,026 ± 0,007	0,083 ± 0,035
5°	0,037 ± 0,012	0,108 ± 0,096
6°	0,055 ± 0,014	0,247 ± 0,177

* média ± desvio padrão.

Observa-se que a maior velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi obtida no 1° ciclo de crescimento (0,140 d^{-1}). O resultado foi semelhante ao encontrado por Reichert et al. (2006). Estes autores averiguaram que a $\mu_{\text{máx}}$ alcançada foi de 0,111 d^{-1} , quando a microalga *Spirulina* sp. LEB-52 foi cultivada em meio Zarrouk padrão, sendo a concentração de corte 0,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e taxa de renovação de 50%. Esses mesmos autores encontraram $P_{\text{máx}}$ de 0,0417 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Este valor foi superado ao ser estudada concentração de corte 1,6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e taxa de renovação de 20 %, obtendo-se $P_{\text{máx}}$ de 0,247 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ no último ciclo de crescimento (6°). Essa diferença pode ser justificada provavelmente pela necessidade de adaptação ao novo meio, ao se utilizar taxa de renovação de 50%. Além de apresentar $P_{\text{máx}}$ baixa, esta taxa de renovação torna o processo mais dispendioso com a utilização de maior volume de meio de cultura novo adicionado.

O pH dos cultivos variou de 9,92 a 10,66. Valores ótimos para o crescimento da *Spirulina* estão entre 9,5 e 10,5 (RICHMOND e GROBBELAAR, 1986). O pH elevado é importante para cultivos de *Spirulina*, pois torna o meio seletivo e previne a contaminação por outros micro-organismos (COSTA et al., 2004).

A biomassa e o rendimento em biopolímeros obtidos ao final do cultivo semicontínuo da *Spirulina* sp. LEB-18 são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Biomassa gerada (X_{biom} , $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e rendimento em biopolímero (R, %) da *Spirulina* sp. LEB-18.

X_{biom} *	R*
1,59 ± 0,32	15,5 ± 4,80

* média ± desvio padrão.

Nota-se que com a taxa de renovação de 20 %, foi possível obter rendimento em biopolímero de 15,5 %, sendo a biomassa de microalga gerada 1,59 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Na síntese de biopolímeros como os polihidroxialcanoatos (PHAs) três fases podem ser identificadas. Na primeira ocorre a absorção de uma fonte de carbono passível de participar da biossíntese do PHA. Essa absorção pode ser realizada por um sistema de transporte específico ou por difusão através da membrana celular. Uma segunda etapa é constituída por reações anabólicas e catabólicas, responsáveis pela produção de hidroxil-acil coenzima-A, que são substratos para a PHA sintase. Na terceira etapa, ocorre a biossíntese do PHA, na qual as PHA sintases usam os hidroxil-acil coenzima-A como substratos e

catalisam a formação da ligação éster do polímero, simultaneamente há liberação da coenzima-A (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

Dentre os PHAs o polihidroxibutirato (PHB) pode ser sintetizado por microalgas (MIYAKE, 1996; MORAIS, 2008; HAASE et al., 2012). Durante a síntese do PHB as moléculas de acetil-CoA são acopladas para formar acetoacetil-CoA em uma reação catalisada pela enzima 3- β -cetotiolase. Quando algum nutriente se torna limitante para a multiplicação do micro-organismo, a demanda de acetil diminui e, por consequência, os níveis de CoA livre também são reduzidos. Desse modo, diminui a inibição sobre o β cetotiolase, desencadeando a síntese do PHB (KHANNA e SRIVASTAVA 2005).

4 CONCLUSÃO

A microalga *Spirulina* sp. LEB-18 apresentou, em cultivo semicontínuo, μ_{\max} de 0,140 d⁻¹ e P_{\max} 0,247 g.L⁻¹.d⁻¹, nos 1º e 6º ciclo, respectivamente. Ao final do cultivo, foi alcançado rendimento de 15,5 % em biopolímeros sintetizados pela microalga. Além disso, com velocidade específica máxima de crescimento e produtividade elevadas apresentadas no cultivo semicontínuo, é possível a produção contínua de materiais poliméricos biodegradáveis.

5 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho, CNPq E CGTEE, ELETROBRAS.

6 REFERÊNCIAS

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM) D-883. Standard Terminology Relating to Plastics. 2012.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, 1489-1493, 2007.
- COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P.F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, 237–241, 2004.
- FÁBREGAS, J., OTERO, A., MASEDA, A., DOMINGUEZ, A. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**. v. 89, p. 67–71, 2001.
- HAASE S. M.; HUCHZERMEYER, B.; RATH, T. PHB accumulation in *Nostoc muscorum* under different carbon stress situations. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p. 157–162, 2012.
- HENRARD, A. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of *Cyanobium* sp. **Bioresource Technology**, p. 4897–4900, 2011.

- KHANNA, S., SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 4, p. 607 – 619, 2005.
- LEE , W. H.; LOO, C. Y.; NOMURA, C. T.; SUDESH, K. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p.6844–685, 2008.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações** – São Carlos: RiMa, 2006.
- MIYAKE, M.; ERATA, M.; ASADA, Y. A thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, capable of accumulating poly- β -hydroxybutyrate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 512–514, 1996.
- MORAIS, M. G. **Bioengenharia microalgal na utilização de gás de combustão e extração de biopolímeros para desenvolvimento de nanofibras**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2008.
- PANDA, B.; MALLICK, N. Enhanced poly-b-hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 194 –198, 2007.
- REICHERT C. C.; REINEHR C. O.; COSTA J. A. V., Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p.23–8, 2006.
- RICHMOND, A.; GROBBELAAR, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. **Biomass**, v. 10, p. 253–264, 1986.
- STEINBÜCHEL, A.; E VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 219-228, 1995.
- VONSHAK, A. ***Spirulina platensis* (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.