

Área: Engenharia de alimentos

Cultivo da microalga *Spirulina platensis* para a produção de bioetanol

Ana Cláudia Vieira Salla*, Ana Cláudia Margarites, Luiz Carlo Holz, Fábio Seibel, Luciane Maria Colla, Jorge Alberto Vieira Costa

Laboratório de Fermentações, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo,
Passo Fundo, RS

*E-mail: 98173@upf.br

RESUMO – As microalgas têm sido estudadas como matéria-prima alternativa sustentável para a produção de biocombustíveis por não competirem com alimentos por terrenos aráveis ou água potável e, por possibilitarem cultivos com elevados teores de bioprodutos. Altas produtividades em biomassa e acúmulo dos compostos de interesse associado ao uso de meios de cultivo de baixo custo são necessárias. Objetivou-se avaliar a influência da concentração do meio Zarrouk e da adição dos resíduos gerados no processo de concentração das proteínas do soro de leite na produtividade em carboidratos da microalga *Spirulina platensis*. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores de 1 L, a 30 °C e fotoperíodo de 12 h claro/escuro, concentração celular inicial de 0,15 g.L⁻¹, e agitação constante. Em todos os experimentos, zero%, 1,25% e 2,50% de resíduo foi adicionado em modo batelada alimentada. A redução de nutrientes do meio Zarrouk para 20% das concentrações iniciais, sem adição de fonte de carbono orgânica apresentou influência sobre a composição bioquímica das microalgas, sendo atingida uma produtividade de carboidratos 0,06 g.L⁻¹.d⁻¹. A adição de 2,5 % (v/v) de resíduos do processo de concentração das proteínas do soro de leite ao meio Zarrouk 20% implicou em uma concentração celular de biomassa de 3,22 g.L⁻¹, e em alta produtividade de carboidratos de 0,061 g.L⁻¹.d⁻¹. A adição de fonte de carbono orgânica ao meio de cultivo com redução de nutrientes ocasiona aumento da concentração de células e concentração intracelular de carboidratos, e possibilitam o uso da microalga *Spirulina* para uso como matéria-prima na produção de bioetanol.

Palavras-chave: Batelada alimentada. Carboidratos. Cultivo mixotrófico. Zarrouk diluído.

1 INTRODUÇÃO

A produção de bioetanol a partir de microalgas vem sendo estudada devido apresentarem alta taxa fotossintética e ampla variabilidade em sua composição bioquímica. As microalgas precisam apresentar elevada

produtividade em biomassa e capacidade de acumular carboidratos para ser considerada matéria-prima alternativa para a produção de bioetanol (Mussato et al., 2010). A produção de biocombustíveis a partir de microalgas apresenta vantagens como o menor impacto ambiental, não competindo por espaço com as culturas alimentares (Zhu et al., 2014), bem como a possibilidade de serem produzidas a partir de resíduos ou efluentes (Gong; Jiang, 2010).

A microalga *Spirulina* sp. apresenta em sua composição cerca de 15% de carboidratos. Porém, diferentes condições de cultivo influenciam no teor de carboidratos de microalgas. A indução do acúmulo de produtos de alto valor está associada a condições de estresse (Torzillo; Vonshak, 1994). Quando cultivadas em meios repletos de nutrientes, a maioria das microalgas são fontes de proteínas. Entretanto, se forem submetidas a condições de estresse, como restrição de alguns nutrientes, ou adição de diferentes fontes de carbono, elas podem ser estimuladas a produzir maior concentração de componentes desejados, alterando sua composição. Quando estas técnicas são utilizadas, a microalga deixa de sintetizar proteína e sintetiza produtos de reserva, como lipídeos e carboidratos (Dismukes et al., 2008).

O uso de efluentes ou subprodutos industriais, como o soro de leite, pode contribuir na diminuição dos custos de produção de microalgas, na agregação de valor ao subproduto e na mitigação dos efeitos destes efluentes no ambiente. Na produção de concentrado proteico de soro de leite é gerado um resíduo rico em sais e lactose. Este pode passar pelo processo de diálise, no qual são concentrados os teores de sais e lactose, que pode ser utilizado como fonte de nutrientes nos cultivos de microalgas. Este resíduo pode ser utilizado como fonte alternativa de carbono em cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina*. O emprego do cultivo mixotrófico pode levar as células à síntese de compostos característicos, como carboidratos e lipídeos, bem como, pode implicar em altas taxas de produção de biomassa (Ceron-garcia et al., 2005). Assim, este modo de cultivo uma alternativa para a redução de custos no processo de produção de biomassa.

O objetivo foi avaliar utilização de resíduos do processo de filtração por membranas de soro de leite como fonte de açúcares para o cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* com foco no acúmulo de carboidratos para obtenção de biomassa que possa ser utilizada para a produção de bioetanol

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e condições de cultivo

Os cultivos da microalga *Spirulina platensis* LEB 52 foram realizados em fotobiorreatores fechados de 1 L, a 30 °C e fotoperíodo (12h claro/escuro), com concentração celular inicial de 0,15 g.L⁻¹. Para avaliar a influência das concentrações do meio Zarrouk e da adição do resíduo ultrafiltrado e dialisado de soro de leite sobre o crescimento celular e produtividade de carboidratos na biomassa da microalga realizou-se um Planejamento Fatorial Misto 2¹3¹. O resíduo foi adicionado em modo batelada alimentada após a concentração celular atingir 0,3 g.L⁻¹. Sempre que a concentração de lactose atingisse 0,15 g.L⁻¹ o resíduo era novamente adicionado. Os ensaios foram realizados em duplicata.

O resíduo do concentrado proteico do soro de leite foi gerado durante o processo de concentração das proteínas do soro de leite através de uma membrana de ultrafiltração. O permeado passa por um processo de diálise, para obtenção de uma fração rica em lactose e elevadas concentrações de sais. Este permeado da ultrafiltração é o resíduo do concentrado proteico de soro dialisado, o qual foi utilizado neste trabalho para a composição do meio de cultivo da microalga *Spirulina platensis* LEB 52.

2.2. Determinações analíticas

A concentração celular dos cultivos foi determinada a cada 48 h pela medida de densidade ótica a 670 nm e a concentração de lactose pelo método de 3,5 DNS (Miller, 1959), utilizada como indicador da concentração restante de resíduo no cultivo.

Ao final dos cultivos, a biomassa foi recuperada por filtração a vácuo em tela de poliéster de 180 fios e seca em estufa a 50 °C por 24 h. Foi determinado o teor de carboidratos na biomassa seca, e posteriormente calculada a produtividade destes. A concentração de carboidratos totais na biomassa foi avaliada ao final dos cultivos através do método descrito em Margarites e Costa (2014)

A produtividade em carboidrato dos cultivos de microalgas foram determinadas pela Equações 1.

$$P(g.L^{-1}.d^{-1}) = \frac{CHO \cdot X_f}{\Delta t} \quad (1)$$

Sendo: CHO: teor de carboidratos na biomassa seca (%); X_f : concentração celular final de microalga ($g.L^{-1}$); Δt : tempo de cultivo até atingir X_{final} (d);

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização dos resíduos

Apesar dos resíduos utilizados neste trabalho serem oriundos de processos distintos (ultrafiltração e nanofiltração de soro de leite) apresentaram uma composição química semelhante em relação ao teor de gordura e proteínas. O resíduo de nanofiltração devido ser submetido a um processo de concentração apresentou maiores teores de lactose, cálcio e magnésio que o resíduo da ultrafiltração (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização do resíduo dos processos de nanofiltração e ultrafiltração de soro de leite

	Retido da nanofiltração	Permeado da ultrafiltração
Sais (%)	0,33 ± 0,16	0,14 ± 0,07
Gordura (%)	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Proteína (%)	0,33 ± 0,19	0,25 ± 0,23
Lactose (%)	7,18 ± 2,26	3,73 ± 1,38
Sólidos Totais(%)	9,65 ± 0,63	5,49 ± 0,68
Ca ($mg.L^{-1}$)	502,96 ± 9,90	325,00 ± 20,63
Mg ($mg.L^{-1}$)	118,20 ± 1,41	87,05 ± 2,19
Na ($mg.L^{-1}$)	267,62 ± 2,85	907,48 ± 31,30
K ($mg.L^{-1}$)	779,92 ± 147,69	1646,49 ± 59,71

O emprego do cultivo mixotrófico utilizando meio Zarrouk em baixa concentração (20%) e adicionando 2,5% de volume de resíduo (ensaio N₅) implicou em uma elevada produção de biomassa (3,22 g.L⁻¹) (Tabela 2) e alta produtividade em carboidratos (0,061 gCHO.L⁻¹.d⁻¹) (Figura 1). A indução do acúmulo de carboidratos está associado à condição de estresse a qual a microalga foi submetida, ao reduzir a concentração dos nutrientes do meio Zarrouk. De acordo com Harun et al. (2010) a microalga *Spirulina platensis* apresenta, entre 8 % e 14 % de carboidratos em biomassa seca. Nesta condição de restrição de nutrientes e o uso do resíduo como fonte alternativa de carbono (ensaio N₅), a microalga apresentou alterações na sua composição bioquímica, sintetizando carboidratos preferencialmente, atingindo cerca de 37,84 % de carboidratos (Tabela 2).

Ao utilizar o meio Zarrouk 20% e sem adição de resíduo (N₅) a microalga atingiu 0,063 gCHO.L⁻¹.d⁻¹ de produtividade em carboidratos, (Figura 1) e uma concentração celular final de 2,17 g.L⁻¹. Isto indica que a redução da concentração do meio Zarrouk para 20 % apresentou uma influência positiva para o acúmulo de carboidratos na microalga *Spirulina*, porém se utilizar esta mesma concentração de meio Zarrouk (20 %) e a adição de 2,5 % de resíduo (ensaio N₅) a concentração celular final é maior (3,22 g.L⁻¹ Tabela 2). Entretanto, a condição utilizada no ensaio N₃ e N₅ não apresentam diferença significativa na produtividade em carboidratos. Assim, utilizando meio Zarrouk 20 % adicionado de 2,5 % de resíduo (ensaio N₅) é uma condição de cultivo apropriada para a microalga *Spirulina*. quando o produto de interesse é o bioetanol, devido a quantidade de resíduo adicionado, a elevada produtividade em carboidratos e alta concentração celular alcançada. A diluição do meio Zarrouk representa uma diminuição dos custos do processo e o volume de resíduo adicionado, faz com que o montante de resíduo que seria descartado ao meio ambiente seja reduzido.

Tabela 2: Dados dos ensaios do Planejamento Fatorial misto 2¹.3¹

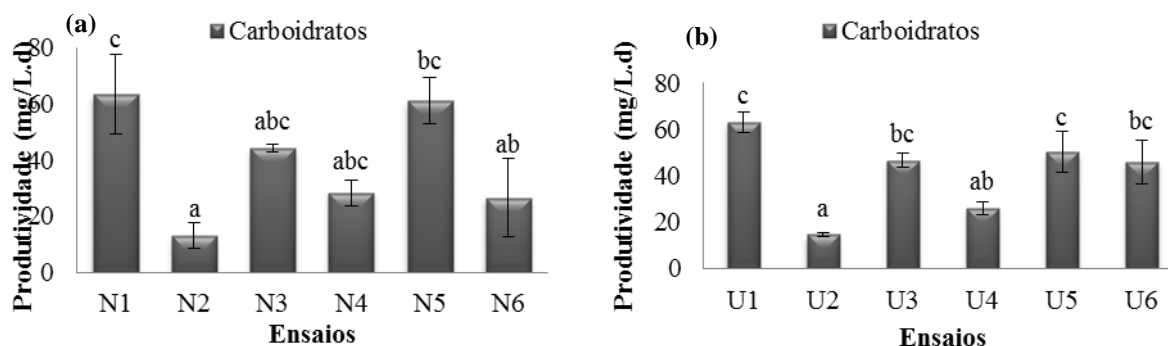
Ensaio	Zarrouk (% v/v)	Resíduo (% v/v)	μ _{máx} (dia ⁻¹)	X final (g.L ⁻¹)	Carboidratos (%)
Fonte de carbono: Retido da nanofiltração					
N ₁	(-1) 20	(-1) 0,00	0,12 ± 0,02 ^a	2,17 ± 0,34 ^a	58,17 ± 3,7 ^b
N ₂	(+1) 30	(-1) 0,00	0,10 ± 0,02 ^a	1,72 ± 0,24 ^{ab}	14,94 ± 3,20 ^c
N ₃	(-1) 20	(0) 1,25	0,12 ± 0,01 ^a	2,32 ± 0,01 ^a	37,94 ± 1,20 ^a
N ₄	(+1) 30	(0) 1,25	0,11 ± 0,01 ^a	1,96 ± 0,17 ^{ab}	28,68 ± 2,28 ^a
N ₅	(-1) 20	(+1) 2,50	0,13 ± 0,01 ^a	3,22 ± 0,19 ^c	37,84 ± 2,73 ^a
N ₆	(+1) 30	(+1) 2,50	0,15 ± 0,05 ^a	1,33 ± 0,07 ^b	39,43 ± 18,99 ^b
Fonte de carbono: Permeado da ultrafiltração					
U ₁	(-1) 20	(-1) 0,00	0,11 ± 0,01 ^A	3,47 ± 0,25 ^B	45,40 ± 0,10 ^{AB}
U ₂	(+1) 30	(-1) 0,00	0,09 ± 0,01 ^D	1,95 ± 0,03 ^A	17,16 ± 0,61 ^C
U ₃	(-1) 20	(0) 1,25	0,14 ± 0,01 ^C	2,64 ± 0,03 ^{AB}	44,02 ± 2,32 ^{AB}
U ₄	(+1) 30	(0) 1,25	0,11 ± 0,02 ^A	2,10 ± 0,16 ^{AB}	21,82 ± 8,36 ^D
U ₅	(-1) 20	(+1) 2,50	0,13 ± 0,01 ^{BC}	2,85 ± 0,31 ^{AB}	43,81 ± 3,02 ^{AB}
U ₆	(+1) 30	(+1) 2,50	0,12 ± 0,01 ^A	3,10 ± 0,75 ^{AB}	37,25 ± 1,50 ^A

Além da influência do uso de fontes de carbono e sais provenientes de resíduos sobre as concentrações celulares, é importante a avaliação da influência destas sobre a composição química da microalga, visto ser esta que norteia a aplicação da biomassa. Assim, avaliou-se a produtividades em carboidratos da biomassa obtida em cada ensaio (Figura 1). Nos ensaios U₁ e N₁ atingiu-se uma produtividade de 60 mg_{carboidratos}.L⁻¹.d⁻¹, os ensaios e U₁, N₁ e U₅ e N₅ não apresentam diferença significativa entre si (p<0,005) (Figura 1). Ao utilizar o meio Zarrouk

20%, adicionado ou não de resíduos, atingiu-se uma elevada produtividade em carboidratos. A redução dos nutrientes do meio Zarrouk para 20% ocasionou um efeito positivo na produtividade em carboidratos. Quanto menor a concentração de Zarrouk, maior foi a produtividade em carboidratos. As condições experimentais investigadas nos ensaios U₁, N₁ e U₅ e N₅ são consideradas apropriadas para a produção da biomassa microalgal da *Spirulina* quando o interesse é que esta biomassa seja utilizada como matéria-prima para a produção de bioetanol.

Indiferente do tipo do resíduo utilizado percebe-se que nos ensaios utilizando Zarrouk 30% adicionado de 2,5% de resíduo (Figura 1) obteve-se a maior produtividade em carboidratos quando comparado aos ensaios com a mesma concentração de Zarrouk (30%), porém, sem a adição de resíduo. A produtividade em carboidratos no ensaio U₆ foi aproximadamente 3 vezes maior que no ensaio U₂, e ambos foram cultivados com Zarrouk 30%, porém o ensaio U₂ não foi adicionado de resíduo. Assim pode-se afirmar que a adição de resíduo no meio Zarrouk 30% causou um efeito positivo na produtividade em carboidratos, sendo que quanto maior a adição de resíduo, maior a produtividade em carboidratos.

Figura 1: Produtividade em carboidratos a partir da biomassa obtida nos ensaios do Planejamento Experimental 21.3.1 adicionados do retido da nanofiltração (a), e nos ensaios adicionados do permeado da ultrafiltração



4 CONCLUSÃO

Ao utilizar o meio Zarrouk com uma concentração celular foi possível atingir elevada concentração de carboidratos, cerca de 58%, concentração celular de $2,17 \text{ g.L}^{-1}$, e com isso, alta produtividade em carboidratos ($60 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). E ao adicionar 2,5% de resíduo proveniente do processo de ultrafiltração e nanofiltração das proteínas do soro de leite, a produtividade em carboidratos permaneceu $60 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

As condições de cultivo estudadas para microalga *Spirulina platensis*, demonstram que a microalga é uma matéria-prima promissora para a produção de bioetanol, devido à elevada produtividade em carboidratos atingida. A diluição do meio Zarrouk diminui os custos de produção da microalga e o maior volume de resíduo adicionado diminui o montante que seria descartado no meio ambiente.

5 REFERÊNCIAS

- CERON-GARCIA, M.C. et al. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylumtricornutum*. Influence of diferente nitrogen and organic carbono sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry** v. 40, p. 297-305, 2005.
- DISMUKES, G. C. et al., Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, p. 235-240, 2008.
- GONG, Y.; JIANG, M. Biodiesel Production with Microalgae as Feedstock: from Strains to Biodiesel. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1269-1284, 2011.
- HARUN, R., JASON, W.S.Y., CHERRINGTON, T., DANQUAH, M.K.. Microalgal biomss as a cellulosic fermentation feedstock for bioethanol production. *Renewable Sustainable Energy* , v. 85, p. 199-203, 2010
- MARGARITES, A.C.F. e COSTA, J.A.V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. **Igera**, v. 4, ed. 3, p. 80-86, 2014.
- MILLER, G. L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**., v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959
- MUSSATO, S. I., G. DRAGONE, P. M. R. GUIMARÃES, J. P.A. SILVA, L. M. CARNEIRO, I. C.ROBERTO, A.VICENTE, L. DOMINGUES e J. A. TEIXEIRA. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production-R1. **Biotechnology Advances** v. 28, n. 6, p. 817-830, 2010.
- TORZILLO, G.,VONSHAK, A. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 6, n. 5, p. 399-403, 1994
- ZHU, L.D.; Hiltunen, E.; ANTILA, E.; ZHONG, J.J.; YUAN, Z.H.; WANG, Z.M. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 30, p. 1035-1046, 2014.