

**Área: Engenharia de Alimentos**

**ESTUDO DA SÍNTESE DE LIPÍDIOS E CARBOIDRATOS NA MICROALGA *Spirulina platensis* DURANTES AS FASES DO CRESCIMENTO MICROBIANO**

**Elenara de Araujo, Bruna F. Ribeiro, Noany Volpato, Ana Claudia Margarites, Luciane Maria Colla\***

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

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

**RESUMO** – As microalgas surgem como uma fonte promissora para produção de alimentos, cosméticos e energias renováveis por apresentarem em sua composição ácidos graxos poliinsaturados, polissacarídeos, e vitaminas. Ao utilizar subprodutos industriais pode-se contribuir no desenvolvimento de cultivos economicamente viáveis, promovendo o aumento na produção de biomassa e acúmulo de biocompostos. Objetivou-se estudar condições de cultivo que visam aumentar o teor de carboidratos e lipídios da *Spirulina platensis*. Os cultivos foram realizados com meio Zarrouk diluído a 50%, adicionados de permeado da ultrafiltração de soro de leite, com alterações nas concentrações de nitrogênio e fósforo. A adição do permeado da ultrafiltração de soro de leite, aumentou a produtividade em células da microalga. As modificações do meio de cultivo, as fases de crescimento e a adição do permeado da ultrafiltração de soro de leite, aumentaram o teor de carboidratos da *Spirulina platensis*. No entanto, não se mostraram favoráveis na produtividade em lipídios. Os ácidos graxos palmítico, linoléico, araquidônico e esteárico, apresentaram-se em maiores concentrações, caracterizando o perfil lipídico da microalga. Contudo, o crescimento celular pode ser mantido sob condições de estresse devido à adição do permeado da ultrafiltração de soro de leite e as restrições de nutrientes do meio de cultivo.

**Palavras-chave:** *Spirulina platensis*, ácidos graxos, cultivo mixotrófico.

## **1 INTRODUÇÃO**

As microalgas apresentam em sua composição corantes, ácidos graxos, polissacarídeos e vitaminas que são de grande interesse para indústrias alimentícia, farmacêuticas, têxtil, e além disso, podem ser utilizadas para a produção de biodiesel (D'OCA et al., 2008). As condições de cultivo influenciam na composição das microalgas e quando cultivadas em condições de estresse, como a presença ou ausência de nutrientes, pode-se estimular o acúmulo de certas substâncias (carboidratos, lipídios e proteínas) (MIRANDA, 2011). Além disso,

ressalta-se a importância de analisar as diferentes fases de crescimento, a fim de identificar em qual etapa pode ocorrer a maior síntese de carboidratos e lipídios.

A utilização de subprodutos agroindustriais no cultivo de microalgas pode ser uma alternativa para diminuir os custos da produção em grande escala. O permeado gerado no processo de ultrafiltração por membranas do soro de leite possui altas concentrações de sais e lactose, podendo adequar-se como substrato para o cultivo destes microrganismos (BUSS, 2015).

Considerando a diversidade de compostos sintetizados de microalgas, objetivou-se avaliar a influência da fase de crescimento e adição de subproduto da indústria láctea no acúmulo de carboidratos e lipídios intracelulares na microalga *Spirulina platensis* LEB52.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A microalga utilizada foi a *Spirulina platensis* LEB52. Os cultivos foram realizados em duplicata em fotobiorreatores fechados tipo erlenmeyer de 2 L, com concentração inicial de 0,2 g. L<sup>-1</sup>, e mantidos sob aeração constante, fotoperíodo de 12h claro/escuro e incubados a 30 °C em câmara termostaticada não estéril.

### 2.1 Estudo de condições de cultivo para acúmulo de lipídios e carboidratos microalgais

Para a avaliação da concentração de lipídios e carboidratos foi utilizado o cultivo da microalga em Zarrouk diluído a 50% e adicionando-se o permeado da ultrafiltração de soro de leite. Ainda, foram realizadas modificações nas concentrações de nitrogênio e fósforo do meio Zarrouk, segundo delineamento descrito a seguir.

O permeado da ultrafiltração do soro de leite foi obtido através do processo de ultrafiltração por membranas do soro de leite, o qual, é rico em lactose e sais e pode ser utilizado para o cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* a fim de fornecer uma fonte alternativa de carbono. O permeado foi pré-tratado, com a finalidade de reduzir a contaminação microbiana, e ocasionar a hidrólise da lactose para que a microalga pudesse mais facilmente utilizar os nutrientes. No pré tratamento, o permeado da ultrafiltração do soro de leite, foi submetido a uma hidrólise ácida, aquecido a 100 °C, e em seguida esterilizado em autoclave.

Para a realização dos ensaios 1, 2 e 3 os inóculos foram adaptados por 20 dias, com meio Zarrouk 50% e adição de 5 mL de permeado hidrolisado a cada 3 dias. Para os ensaios 4, 5 e 6, os inóculos foram adaptados por 20 dias, com meio Zarrouk 50%.

No Ensaio 1 a microalga foi cultivada com meio Zarrouk diluído em 50% com adição de 5% de permeado hidrolisado, em modo descontínuo, até início da fase estacionária de crescimento.

No Ensaio 2, a microalga foi cultivada nas mesmas condições do Ensaio 1, porém quando a microalga alcançou a fase estacionária, a biomassa foi centrifugada, lavada com água e posteriormente a biomassa foi adicionada novamente de meio Zarrouk diluído em 50%, porém sem adição do componente nitrogenado (2,5 g.L<sup>-1</sup>) e com adição do dobro das fontes de fósforo (1,0 g.L<sup>-1</sup>) estipuladas no meio padrão.

O ensaio 3 foi realizado com adição de meio Zarrouk 50% adicionado de 5% de permeado até a fase de declínio de crescimento, a fim de verificar a influência da fase de crescimento no acúmulo de lipídios e carboidratos quando comparado com o ensaio 1, o qual foi cultivado até o início da fase estacionária.

Os ensaios 4, 5 e 6 foram realizados nas mesmas condições que os ensaios 1, 2 e 3, porém sem a adição do permeado da ultrafiltração de soro de leite.

## 2.2 Determinações analíticas

Nos tempos pré-determinados os cultivos da microalga foram centrifugados para separação da biomassa, que foi posteriormente seca em estufa a 60 °C por 24 h.

A concentração celular das microalgas foi determinada a cada 24 h através da medida de densidade óptica em espectrofotômetro a 670 nm. As concentrações finais de biomassa ( $X_{\text{final}}$ ) e a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) foram obtidas a partir dos resultados de concentração de biomassa *versus* tempo. A velocidade específica máxima de crescimento  $\mu_{\text{Máx}}$  ( $\text{d}^{-1}$ ) foi determinada por regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento.

A concentração de carboidratos foi determinada através do método descrito por Margarites e Costa, (2014). O teor de lipídios foi determinado pelo método de Folch e Lees (1957) adaptado por Colla (2002). A produtividade em carboidratos e lipídios dos cultivos de microalgas foi determinada, visto que este parâmetro leva em consideração a concentração celular da microalga e o tempo de cultivo. O perfil dos ácidos graxos foi determinado através de análise cromatográfica, a gás com espectrômetro de massa. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões e quantificados por normalização de áreas sob os picos relevantes.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados para todos os parâmetros realizados obtidos para a microalga *Spirulina platensis* LEB-52.

Os ensaios cultivados com a adição do permeado da ultrafiltração de soro de leite (ensaios 1, 2, e 3) apresentaram menor tempo de cultivo (11, 25 e 38 dias, respectivamente), em relação aos cultivados sem a adição de permeado (42, 45 e 67 dias, respectivamente), o que pode explicar as maiores concentrações celulares obtidas em alguns destes ensaios.

Os ensaios 1 e 2, cultivados com adição do permeado da ultrafiltração, apresentaram valores superiores de velocidade específica máxima de crescimento, quando comparados aos experimentos 4 e 5, cultivados sem a adição do permeado da ultrafiltração de soro de leite. No entanto, no experimento 3, o permeado da ultrafiltração não teve influência positiva na velocidade específica máxima de crescimento, sendo esta igual ao ensaio realizado nas mesmas condições (ensaio 6), porém sem a adição do permeado da ultrafiltração. Nos cultivos 2 e 5, pode-se observar que após a lavagem de células, ocorreu a diminuição das velocidades específicas máxima de

crescimento ( $0,073 \pm 0,013 d^{-1}$  e  $0,052 \pm 0,026 d^{-1}$ , respectivamente) em virtude da retirada do componente nitrogenado.

Tabela 1 Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ,  $d^{-1}$ ), produtividade máxima em células ( $P_{\text{máx}}$ ,  $mg.L^{-1}.d^{-1}$ ), a produtividade em lipídios ( $mg.L^{-1}.d^{-1}$ ), e a produtividade em carboidratos ( $mg.L^{-1}.d^{-1}$ ), obtidos para a microalga *Spirulina platensis* LEB-52.

Ensaio	$\mu_{\text{máx}}$ ( $d^{-1}$ )	$P_{\text{máx}}$ ( $mg.L^{-1}.d^{-1}$ )	Lipídios (%)	Produtividade em Lipídios ( $mg.L^{-1}.d^{-1}$ )	Carboidratos (%)	Produtividade em carboidratos ( $mg.L^{-1}.d^{-1}$ )
1	$0,17 \pm 0,024^b$	$126,7 \pm 21,64^b$	$2,60 \pm 1,28^{ab}$	$1,78 \pm 0,85^{ab}$	$7,29 \pm 0,08^a$	$5,02 \pm 0,14^a$
2	$0,16 \pm 0,032^b$	$126,5 \pm 14,85^b$	$1,74 \pm 1,20^a$	$0,49 \pm 0,30^a$	$40,98 \pm 0,33^c$	$27,4 \pm 2,89^{ab}$
3	$0,05 \pm 0,007^a$	$116,0 \pm 2,83^{ab}$	$1,75 \pm 0,35^a$	$1,00 \pm 0,43^a$	$34,05 \pm 1,23^b$	$65,36 \pm 13,01^c$
4	$0,05 \pm 0,009^a$	$82,3 \pm 2,40^{ab}$	$4,15 \pm 0,35^{ab}$	$2,95 \pm 0,41^b$	$6,13 \pm 1,03^a$	$16,68 \pm 3,72^{ab}$
5	$0,11 \pm 0,021^{ab}$	$73,0 \pm 1,41^a$	$5,34 \pm 0,16^b$	$1,35 \pm 0,12^{ab}$	$34,75 \pm 3,01^b$	$35,74 \pm 1,05^b$
6	$0,05 \pm 0,005^a$	$84,0 \pm 11,31^{ab}$	$5,04 \pm 0,11^b$	$2,20 \pm 0,03^{ab}$	$5,37 \pm 0,39^a$	$14,31 \pm 0,91^{ab}$

\* Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste Tukey. Letras iguais na mesma coluna indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ).

Quanto à produtividade máxima em células, quando comparados os ensaios 1 (mantido até o início da fase estacionária) e 3 (mantido até o início da fase de declínio), adicionados de permeado da ultrafiltração de soro de leite, com os ensaios controles 4 e 6 (mantidos até as mesmas fases de crescimento, respectivamente, porém sem a adição de permeado), observa-se que estes ensaios obtiveram elevados valores de produtividade, mesmo com a adição do permeado da ultrafiltração e menor tempo de cultivo, mostrando que o cultivo mixotrófico não prejudicou a produtividade em células.

Em relação à concentração de lipídios, no ensaio 1 ( $2,60 \pm 1,28\%$ ), realizado com adição do permeado da ultrafiltração, esta foi igual às verificadas nos ensaios 4, 5 e 6 ( $4,15 \pm 0,35\%$ ,  $5,34 \pm 0,16\%$  e  $5,04 \pm 0,11\%$ , respectivamente), realizados sem adição do permeado da ultrafiltração. Este comportamento também foi observado quanto à produtividade em lipídios, demonstrando que as diferentes formas de condução dos ensaios não influenciaram a produtividade em lipídios quando da não adição do permeado de ultrafiltração, porém, quando houve esta adição, a produtividade é aumentada quando o ensaio é conduzido apenas até o início da fase estacionária de crescimento (Ensaio 4).

A maior concentração de carboidratos foi verificada no ensaio 2 ( $40,98 \pm 0,33\%$ ), este realizado com a adição do permeado da ultrafiltração e mantido até o início da fase estacionária de crescimento, com posterior lavagem das células e reiniciado sem a presença de nitrogênio. O ensaio 6 apresentou o menor teor de carboidratos ( $5,37 \pm 0,39\%$ ), entretanto, quando comparado ao ensaio 3, cultivado nas mesmas condições, porém adicionado de permeado da ultrafiltração, este apresentou alto teor de carboidratos ( $34,05 \pm 1,23\%$ ), verificando que o estresse provocado pela presença do permeado da ultrafiltração no meio de cultivo, promoveu o acúmulo de carboidratos.

Quando compara-se os ensaios 1 (com adição de permeado) e 4 (sem adição de permeado), onde ambos foram mantidos até o início da fase estacionária, observa-se que os mesmos apresentaram baixas concentrações de carboidratos ( $7,29 \pm 0,08\%$  e  $6,13 \pm 1,03\%$  respectivamente) fato que pode ter ocorrido, devido os ensaios serem mantidos somente até o início da fase estacionária. Além disso, quando o ensaio 3 é comparado ao 1, cultivados nas mesmas condições, porém o ensaio 1 foi mantido somente até o início da fase estacionária, observa-se que o maior acúmulo de carboidratos é verificado no início da fase de declínio (ensaio 3) e não no início da fase estacionária de crescimento.

A Tabela 2 apresenta o perfil dos ácidos graxos obtidos a partir dos lipídios obtidos da biomassa.

Tabela 1. Perfil dos ácidos graxos obtidos nos ensaios da microalga *Spirulina platensis* LEB 52.

		Concentração de ácidos graxos (%)				
Ácidos graxos		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6
Mirístico	C14:0	$1,62 \pm 0,99$	$1,13 \pm 0,59$	$0,41 \pm 0,54$	$0,79 \pm 0,14$	$0,59 \pm 0,07$
Palmítico	C16:0	$46,54 \pm 8,41$	$52,61 \pm 0,09$	$53,61 \pm 2,54$	$47,68 \pm 5,04$	$51,52 \pm 0,62$
Palmitoléico	C16:1	1,09	$1,62 \pm 0,42$	$1,60 \pm 0,22$	$1,13 \pm 0,02$	$1,75 \pm 0,07$
Esteárico	C18:0	$13,03 \pm 1,30$	$5,28 \pm 0,74$	$4,92 \pm 1,74$	$5,12 \pm 0,32$	$3,43 \pm 0,83$
Oleico	C18:1	19,87				
	C18:1 cis	5,89	$4,01 \pm 0,80$	$3,21 \pm 0,03$	$4,56 \pm 2,46$	$3,34 \pm 0,39$
Linoleico	C18:2 cis	$13,61 \pm 1,51$	$15,51 \pm 1,25$	$15,85 \pm 0,54$	$20,33 \pm 5,79$	$16,83 \pm 0,92$
$\gamma$ -linoleico	C18:3 cis	1,47	$0,56 \pm 0,13$	$0,26 \pm 0,12$		$0,34 \pm 0,01$
Araquidônico	C20:0	$10,09 \pm 3,45$	$16,76 \pm 0,95$	$17,63 \pm 1,08$	$16,73 \pm 3,16$	$19,20 \pm 0,04$
Saturados		$72,07 \pm 10,4$	$77,39 \pm 1,22$	$77,58 \pm 0,97$	$72,31 \pm 8,62$	$76,02 \pm 0,52$
Insaturados		$27,93 \pm 10,4$	$22,61 \pm 1,22$	$26,54 \pm 4,85$	$27,69 \pm 8,62$	$23,98 \pm 0,52$

\*A amostra 4 apresentou vestígios dos ácidos graxos C20:5, C21:0, e behênico. Também foram encontradas pequenas quantidades dos ácidos graxos láurico, pentadecílico, margárico, margaroleico, ( $\alpha$ -)linolênico, e eicosadienóico. Não foi determinado o perfil de ácidos graxos do ensaio 3.

De acordo com a Tabela 2, observa-se que o ácido graxo palmítico foi o predominante entre os ensaios, sendo o mais abundante, seguido por linolênico e linoléico.

Os ácidos graxos poliinsaturados essenciais como o araquidônico e o linoléico também foram verificados em quantidades significativas em todas as amostras.

O ácido graxo palmitoléico apesar de estar presente em pequenas quantidades, foi verificado em todas as amostras analisadas. Este ácido graxo possui grande importância nutricional, pois pode auxiliar no equilíbrio de diversas doenças, como, por exemplo, as cardiovasculares (WILLIS et al., 1998).

Os ácidos graxos saturados encontram-se em maiores quantidades que os insaturados em todos os ensaios, isso pode ter ocorrido devido a síntese de ácidos graxos iniciar-se pelos saturados. Estes são os mais indicados para a produção de biodiesel (CANAKCI, 2007). Os ácidos graxos insaturados os quais apresentam-se em menores quantidades, podem ser utilizados para elaboração de produtos alimentícios.

## 4 CONCLUSÃO

A adição do permeado da ultrafiltração do soro de leite contribuiu para o aumento da produtividade máxima em células. As modificações do meio de cultivo, as fases de crescimento, a adição do permeado da ultrafiltração de soro de leite, promoveram o aumento do teor de carboidratos da microalga *Spirulina platensis*.

A redução do nitrogênio e duplicação do fósforo relacionada com o acúmulo de carboidratos apresentou influência nos ensaios realizados com e sem ultrafiltrado. Quando o microrganismo permaneceu até o final da fase estacionária obteve-se o maior acúmulo de carboidratos. No entanto, estas alterações não mostraram-se favoráveis para a produtividade em lipídios. Contudo, foi possível observar que o crescimento celular pode ser mantido mesmo sob condições de estresse devido à adição do permeado da ultrafiltração de soro de leite e as restrições de nutrientes do meio de cultivo.

Dentre os ácidos graxos que caracterizam o perfil lipídico da microalga *Spirulina*, o ácido graxo palmítico apresentou-se em maiores concentrações, seguido de linoléico, araquidônico e esteárico. .

## 5 REFERÊNCIAS

- BUSS, D. A.; HENKES, J. A. Estudo dos impactos ambientais causados por laticínios com foco no reaproveitamento dos resíduos gerados. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, v. 3, n. 2, p. 384 - 395, 2015.
- CANAKCI, M. The potencial of restaurant waste lipids as biodiesel feeds tocks. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 183-190, 2007.
- COLLA, L. M.; ALVAREZ, J.; PRATO, C.; MUCHILLO-BAISCH, A. L.; COSTA, J. A. V. **Influência das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu potencial na redução da hipercolesterolemia**. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos. FURG, RS, Brasil, 2002.
- D'OCA, M. G. M.; FARIAS, S. P.; LEMÕES, J. S.; ALVES SOBRINHO, R. C. M. Extração de óleo da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de biodiesel. In: XVI Encontro de Química da Região Sul, **Anais**. Rio Grande, Jan. 2008.
- MARGARITES, A.C.F. e COSTA, J.A.V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol lproduction. **International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA)**, v. 4, ed. 3, p. 80-86, 2014.
- MIRANDA, J. R. P.C. **Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus***. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia). Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa, Universidade Nova de Lisboa, 2011.
- WILLIS, W. M.; LENCKI, R. E.; MARANGONI, A. G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. **Criticals Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 38, p. 639-674, 1998.