

Área: Engenharia de Alimentos

INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO NO CRESCIMENTO E NO ACÚMULO DE CARBOIDRATOS DA MICROALGA *Spirulina* CULTIVADA EM TANQUES ABERTOS.

Gabriel Crivellaro Gonçalves, Grazieli Rodigheri, Francisco Magro, Ana Cláudia Margarites, Jorge Alberto Vieira Costa, Luciane Maria Colla*

Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia Ambiental, Faculdade de Engenharia e arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

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

RESUMO – As microalgas são um grupo de organismos distintos que possuem potencial econômico relevante. São capazes de produzir biocompostos importantes tanto para a indústria de alimentos, como para produção de energia e em processos ambientais. Os sistemas de agitação podem influenciar na composição bioquímica das microalgas, pois velocidades de agitação extremas podem ocasionar rompimentos celulares e dificultar a absorção de nutrientes e acesso à luminosidade. Com isso objetivou-se estudar a influência da agitação no crescimento e acúmulo de carboidratos intracelulares da microalga *Spirulina platensis*. As microalgas foram cultivadas em *raceways* de 10 L, em meio Zarrouk 20% e concentração inicial de 0,20 g.L⁻¹, sob agitação contínua por pás e fotoperíodo natural. A concentração de biomassa foi determinada a cada 24 h e a concentração de carboidratos foi analisada na fase estacionária e na fase de declínio. Para a velocidade de 0,15 m.s⁻¹ a microalga apresentou uma concentração de carboidratos menores quando comparada com o cultivo de 0,30 m.s⁻¹ em ambas as fases de crescimento. Neste último a biomassa extraída no início da fase estacionária obteve 30,6% de carboidratos e a retirada no início da fase declínio 38,59%. A velocidade de agitação influencia na concentração de carboidratos bem como a fase em que o cultivo se encontra.

Palavras-chave: produção de biocompostos, velocidade de agitação, condições de cultivo.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas consistem em uma variedade de organismos autotróficos, procarióticos ou eucarióticos e que possuem estrutura unicelular (CARDOSO, VIEIRA e MARQUES, 2011). São microrganismos fotossintéticos que combinam água e dióxido de carbono atmosférico com luz solar para produzirem várias formas de energia e então produzirem biomassa (polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos) (SCHMITZ, DAL MAGRO e COLLA, 2012). A principal vantagem do cultivo comercial das microalgas é a

obtenção de seus produtos metabólitos, os quais são utilizados na alimentação de organismos aquáticos e terrestres, como suplementos alimentares para os seres humanos, ou ainda em processos ambientais, como tratamento de águas residuais, fertilização dos solos e biocombustíveis (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

A composição das microalgas depende significativamente das condições de cultivo, o qual irá garantir a produção de massa microbiana. O cultivo das mesmas requer condições ambientais específicas, que podem variar de espécie para espécie. Entre os parâmetros principais que influenciam a produção de biomassa estão à intensidade da luz e comprimento de onda adequado, a temperatura, a concentração de CO₂, a quantidade de nutrientes, condições de mistura e contaminação (SINGH; DHAR, 2011).

A estratégia de limitação de nutrientes é considerada como sendo uma abordagem razoável para a produção de microalgas rica em carboidratos, sendo que este aumento pode viabilizar a utilização de microalgas para a produção de bioetanol (DRAGONE, 2011).

Conforme Macías et al (2009), os sistemas de cultura a céu aberto, também denominados *raceway ponds* consistem em tanques abertos ao ar livre que utilizam a luz do sol e no qual a cultura é mantida em circulação por pás mecânicas até atingir a densidade pretendida. A agitação e aeração também são parâmetros importantes de crescimento, visto que estes proporcionam a homogeneização da distribuição de células, do calor, e dos metabólitos, facilitam a transferência de gases, previnem a sedimentação e ajudam para um melhor contato entre as células e os nutrientes. Além disso, a manutenção de sistemas de agitação adequados podem evitar o declínio na produtividade celular e o rompimento de tricomas microalgais (LITCHFIELD, 1977).

Com isso, objetivou-se estudar a influência da agitação no cultivo da microalga *Spirulina platensis* LEB 52 no crescimento e acúmulo de carboidrato pela mesma.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A microalga *Spirulina platensis* LEB 52 foi cultivada em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) em condições apropriadas para o acúmulo de carboidratos. Este meio foi preparado em uma concentração de 20%, de acordo com ensaios prévios realizados em laboratório. A concentração inicial do inóculo foi de 0,20 g.L⁻¹, de *Spirulina platensis* LEB 52, sendo o cultivo mantido em fotoperíodo natural.

Os cultivos foram realizados em *raceways* de 10 L e a agitação do fluido foi realizada pela rotação de pás. As rotações do sistema de agitação foram ajustadas para atingir as velocidades de 0,15 m.s⁻¹ e 0,30 m.s⁻¹ a fim de atingir uma mistura eficiente do meio de cultura, com uma transferência de massa adequada e, desta forma, examinar a influência da velocidade de agitação na produção da biomassa e na produtividade de carboidratos intracelulares da microalga.

A concentração de biomassa da microalga foi determinada a cada 24 h através da medida de densidade ótica em espectrofotômetro a 670 nm (COSTA et al., 2002), utilizando-se uma relação pré-estabelecida entre a massa seca de biomassa e a absorvância.

Durante os cultivos, os parâmetros avaliados foram a concentração final de biomassa (X_f, g.L⁻¹) e produtividade máxima de biomassa (P_{máx}, g.L⁻¹.d⁻¹), obtida segundo a Equação (1).

$$\text{Produtividade em biomassa}_{\text{máx}} (\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}) = (X - X_0) / (t - t_0) \quad (1)$$

Em que, X é concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t (d), e X_0 é a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t_0 (d).

A quantificação da concentração dos carboidratos na biomassa foi realizada a partir de duas coletas, uma no momento em que a microalga atingiu a fase estacionária de crescimento, sendo que nessa fase foi retirada parte do cultivo, e a outra quando o restante do cultivo atingiu a fase de declínio, a fim de avaliar se há influência das fases de crescimento no acúmulo de carboidrato intracelular. Para esta determinação, ao final dos cultivos, a microalga *Spirulina platensis* foi centrifugada para retenção da biomassa, e posteriormente seca em estufa a 60°C por 24 h.

Para a determinação dos carboidratos intracelulares, a biomassa seca da microalga foi submetida à hidrólise ácida com HCl 1,5N sob aquecimento (121°C , 30 min em autoclave), para liberação dos açúcares redutores, os quais após neutralização com NaOH foram determinados através do método que utiliza o ácido 3,5 dinitrossalicílico (MARGARITES e COSTA, 2014).

A produtividade em carboidratos nos cultivos ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi obtida de acordo com a Equação (2):

$$\text{Produtividade em carboidratos } (\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}) = (X_f \times \text{CHO}) / (100 \times t_c) \quad (2)$$

Em que, X_f é a concentração final de biomassa (g.L^{-1}), CHO é a concentração de carboidratos (%) e t_c é tempo de cultivo (d).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, através de análise de variância e teste Tukey, com nível de 5% de significância, visando examinar diferenças entre as médias de cada ensaio, realizados em duplicata, para a produtividade máxima em células, concentração de carboidratos e produtividade em carboidratos.

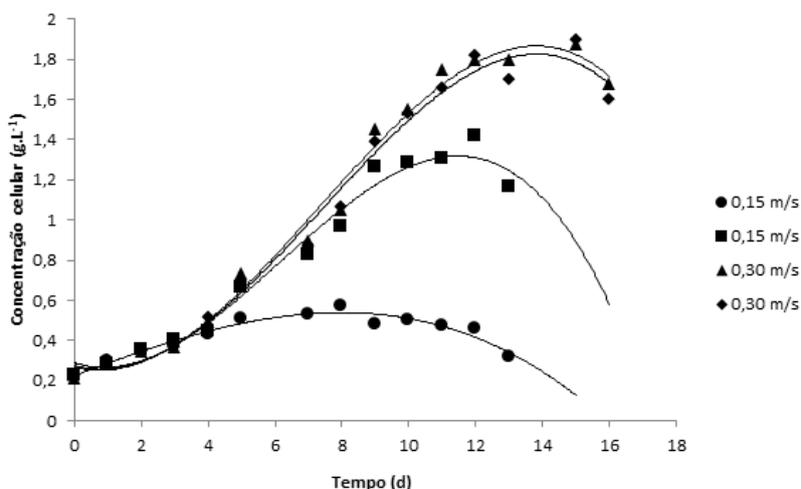
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tempo médio de insolação nos ensaios foi 10,3 h/d (INMET, 2015). A partir dos ensaios realizados podemos verificar que a velocidade de agitação dos biorreatores influencia na concentração final de células de *Spirulina*. A velocidade de agitação $0,30 \text{ m.s}^{-1}$ permite o desenvolvimento e crescimento mais acelerado da microalga. Isso se deve ao fato de que uma maior agitação permite maior contato das células com os nutrientes e com a luminosidade. Segundo Huang et. al. (2015) é importante promover uma mistura adequada para homogeneizar luz recebida por cada célula nos reatores.

Um das repetições dos ensaios realizados a $0,15 \text{ m.s}^{-1}$ não atingiu a fase exponencial, devido à morte celular antes dos demais cultivos. Já a repetição que atingiu a fase exponencial obteve uma concentração celular máxima de $1,26 \text{ g.L}^{-1}$ e $\mu_{\text{máx}} 0,1740 \text{ d}^{-1}$.

Os cultivos realizados com agitação de $0,30 \text{ m.s}^{-1}$ iniciaram a fase exponencial após 5 dias de cultivo e atingiram concentração máxima em 11 dias com $1,80 \text{ g.L}^{-1}$ e $\mu_{\text{máx}} 0,1423 \text{ d}^{-1}$ (Figura 1).

Figura 1-Curva de crescimento das microalgas



A Tabela 1 apresenta os parâmetros cinéticos e concentração de carboidratos obtidos nos cultivos de *Spirulina platensis*.

Tabela 1- Tempo de cultivo, concentração final de biomassa, produtividade máxima em células, concentração e produtividade em carboidratos dos ensaios realizados com *Spirulina platensis*.

Fase do cultivo	Ensaio (m.s ⁻¹)	Tempo de cultivo (d)	Concentração o final de biomassa (g.L ⁻¹)	Produtividade máxima em células (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Carboidrato (%)	Produtividade carboidrato (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
Início da fase estacionária	0,15	13	1,25 ± 0,013	0,161 ± 0,038 ^a	30,60 ± 1,40 ^a	0,035 ± 0,0003 ^a
Início da fase de declínio	0,30	15	1,74 ± 0,071	0,187 ± 0,061 ^a	45,50 ± 1,28 ^b	0,040 ± 0,0025 ^b
Início da fase estacionária	0,15	15	1,16 ± 0,020	0,161 ± 0,038 ^a	38,59 ± 1,41 ^c	0,044 ± 0,0005 ^c
Início da fase de declínio	0,30	17	1,63 ± 0,016	0,187 ± 0,061 ^a	60,76 ± 0,93 ^d	0,058 ± 0,0005 ^d

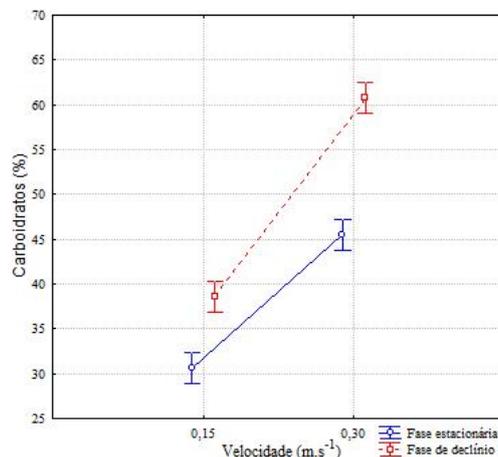
Valores médios de análise realizados em triplicata ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança (p>0,05).

Na velocidade de 0,15 m.s⁻¹ a microalga apresentou menor concentração de carboidratos intracelulares em comparação aos cultivos realizados a 0,30 m.s⁻¹ em ambas as fases de crescimento. Nos cultivos realizados a 0,30 m.s⁻¹ a biomassa extraída no início da fase estacionaria obteve 30,6% de carboidratos e a biomassa retirada no início da fase declínio obteve 38,59%, comprovando que a fase de crescimento na qual o cultivo é interrompido e a velocidade de agitação influenciam no acúmulo de carboidratos microalgais (Figura 2).

O aumento na concentração de carboidratos da biomassa mantida até o início da fase de declínio em comparação aos mantidos até o início da fase estacionária de crescimento pode estar relacionada ao maior tempo que as células ficaram sob influência da restrição de nutrientes, pois segundo Lourenço (2006), a medida que o nutriente vai se esgotando no meio, fica mais difícil para a célula utilizar este nutriente. O fato de a célula ter aprimorado seus sistemas de captação para manter sua velocidade de crescimento, e não haver disponibilidade do nutriente para isso ocorrer, gera um estresse fisiológico que aumenta a medida que a concentração dos

nutrientes diminuí. Esse estresse altera o metabolismo microalgal, direcionando os processos metabólicos para a produção de carboidratos ou lipídios de reserva para preparar a célula para o período de privação.

Figura 2- Interação da velocidade de agitação e da fase de cultivo no acúmulo de carboidrato na célula.



A concentração de carboidratos elevada obtida nos ensaios realizados na velocidade de 0,30 m.s⁻¹ deve-se possivelmente a maior agitação da cultura resultante desta velocidade, pois proporcionou às células maior disponibilidade de luz. Em geral é conhecido que as altas intensidades de luz resultam em aumento do teor de carboidratos (HU, 2004). Em culturas de *Spirulina* um aumento de cerca de até 58% em carboidratos foi obtido quando a luminosidade foi aumentada de 24 para 192 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LEE et al, 2012).

A produtividade em carboidrato também teve diferença significativa entre os cultivos tanto em cultivos realizados em velocidade diferentes como para as diferentes fases de cultivo, sendo que a maior produtividade foi obtida com a velocidade de agitação de 0,30 m.s⁻¹ e no início da fase de declínio no qual a produtividade em carboidratos obtida foi 0,058 g.L⁻¹.d⁻¹.

4 CONCLUSÃO

Podemos concluir que a velocidade de agitação dos reatores influencia na concentração de carboidratos intracelulares. Os cultivos realizados com velocidades mais elevadas (0,30 m.s⁻¹) apresentaram maiores teores de carboidratos, chegando a 60%.

Outro fator que influenciou no acúmulo de polissacarídeos foi a fase em que o cultivo se encontrava no momento da extração da biomassa. Nos cultivos mantidos até o início da fase de declínio o teor de carboidratos foi mais elevado, isto deve-se ao estresse em que a microalga foi submetida pelo baixo teor de nutrientes no meio de cultivo nesta fase do cultivo.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Universidade de Passo Fundo e ao CNPq.

6 REFERÊNCIAS

- CARDOSO, A. S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.9, n.4, Ago, 2011. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1797>>. Acesso em: 10 ago. 2015.
- COSTA, J.A.V. et al. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.
- DRAGONE, G. et al. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3331-3335, 2011.
- HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: **Richmond A (ed) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2004.
- HUANG J. et al. Investigation on the performance of raceway ponds with internal structures by the means of CFD simulations and experiments. **Algal Research**, v. 10, p. 64-71, 2015.
- INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo2/verProximosDias&code=4314100>>. Acesso em 15/05/2015.
- LITCHFIELD, J. H. Single cell protein. **Food Technology**, v. 31, p. 175-179. 1977.
- LEE, M.C; CHEN, Y.C; PENG, T.C. Two-stage culture method for optimized polysaccharide production in *Spirulina platensis*. **J Sci Food Agric**, v. 92, p. 1562-1569, 2012.
- LOURENÇO, Sergio O. **Cultivo de Microalgas Marinhas** - princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006.
- MACÍAS, S. C. et al. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. **Talanta, Espanha**, v.77, p.948-952, Jul. 2009.
- MARGARITES, A.C.F. e COSTA, J.A.V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. **International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA)**, v. 4, ed. 3, p. 80-86, 2014.
- SCHMITZ, R.; MAGRO, C. M.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC – UPF**, vol. 4 (1), p.48-60, 2012.
- SINGH, N. K.; DHAR, D. W. Microalgae as second generation biofuel. A review. **Agronomy Sustainable Development**, v. 31, p. 31:605-629, 2011.
- ZARROUK, C. **Contribution à l'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.