

PRODUÇÃO FOTOSSINTÉTICA DE *SPIRULINA PLATENSIS*. EFEITO DO TEMPO DE ALIMENTAÇÃO DA URÉIA

C. E. N. Sassano¹, J. C. M. Carvalho¹, A. Converti², S. Sato¹,
A. Del Borghi², A. Lodi², L. A. Gioielli²

¹Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580/B16, 05508-900, São Paulo, SP

²Dipartimento di Ingegneria Chimica e di Processo "G.B. Bonino", via Opera Pia 15, I-16145 Gênova, Itália, converti@unige.it

ABSTRACT

The results of *Spirulina platensis* cultivations using urea as nitrogen source are compared with those obtained with potassium nitrate. Urea was added according to the fed-batch process with exponentially increasing feeding rate in order to minimize inhibition. A kinetic and bioenergetic study was performed varying the feeding time ($9 < t_f < 15$ d) at fixed amount of added urea ($m_{at} = 500$ mg per liter of reactor volume).

1. INTRODUÇÃO

A cultura de *Spirulina platensis* pode representar uma vantajosa fonte alternativa de proteínas de apreciável valor biológico para consumo animal e humano. Ao lado de tal perspectiva, há possibilidade de obter pigmentos, carotenóides, esteróides, vitaminas, ácidos graxos polinsaturados e lipídeos (1-4).

O gênero *Spirulina* é representado por algas azuis-esverdeadas fotoautótrofas, pluricelulares, coloniais, de morfologia espiralada e filamentosa, presentes em habitat aquoso de elevada salinidade. A tendência atual é considerá-lo pertencente ao reino Monera, classe *Cyanophyceae*, família *Oscillatoriaceae* (5). *Spirulina* pode crescer rapidamente em lagos mornos, rasos e salobros. É um dos microrganismos (microalgas) mais comuns e abundantes em muitos lagos alcalinos na África e América (6). O gênero *Spirulina* vem sendo usado como alimento humano desde tempos remotos em certas regiões do México e África (6, 7). Estudos nutricionais demonstraram ser um dos microrganismos de maior teor protéico já encontrado, possuindo elevado valor nutricional, boa digestibilidade e todos os aminoácidos essenciais em proporções recomendadas pela FAO, com exceção da metionina (8, 9).

Numerosos fatores influenciam o crescimento do gênero *Spirulina*, entre os quais a fonte de nitrogênio. Em *Spirulina platensis* a deficiência de nitrogênio pode afetar o crescimento (10) e influenciar a composição da biomassa (11-13). A uréia, que é a fonte de nitrogênio de menor custo, tem mostrado ser efetiva para a produção de biomassa bem como para a produção do ácido graxo γ -linolênico (12). *Spirulina* cresce satisfatoriamente em meios pouco concentrados de uréia enquanto adições acima de 300-500 mg/l demonstraram-se fortemente inibitórias (14, 15).

A alimentação exponencialmente crescente utilizada neste estudo tem sido preferida para minimizar a

inibição do crescimento devido à uréia. Os resultados de ensaios executados variando o tempo de alimentação entre 9 e 15 dias e empregando um valor fixo da quantidade total de uréia alimentada ($m_{at} = 500$ mg por volume unitário de reator) têm sido usados neste trabalho para conduzir a um estudo bioenergético sobre o crescimento de *Spirulina platensis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A cepa *Spirulina platensis*, proveniente do Laboratório de Microbiologia Zootécnica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, foi mantida no meio mineral de Paoletti et al. (16). Após o repique, frascos de Erlenmeyer eram colocados em shakers (100 rpm) a 30°C, em presença de uma intensidade luminosa de 6,0 klux, garantida por meio de lâmpadas fluorescentes de 40 W. O inóculo era preparado filtrando a suspensão em crescimento exponencial e ressuspendendo-a em meio isento de nitrato. A concentração inicial (em massa seca) era 50 mg/l e o volume da suspensão de inóculo não excedia 10% do volume útil dos reatores. A quantidade de uréia total a ser adicionada foi 80 mg/L.

Foram adotados mini-tanques de forma alongada, construídos de lâminas de PVC, em que a movimentação da cultura era executada por pás rotativas na frequência de 23 rotações por minuto. A temperatura do meio em fermentação foi mantida a 25°C por aquecimento com auxílio de resistências e controlada por meio de termostatos numa sala a 17°C.

A concentração celular foi determinada por via espectrofotométrica a 560 nm enquanto a intensidade luminosa foi medida através de um fotômetro. O consumo de carbono total foi determinado convertendo a fonte de carbono para carbonato mediante adição de NaOH até pH 13 e titulando com ácido clorídrico. Amostras do meio de fermentação, previamente filtradas, eram sujeitas à leitura da concentração de amônia livre mediante um

eletrodo seletivo para amônia. Para a determinação da concentração de amônia total, realizou-se a hidrólise completa da uréia com ácido sulfúrico num bloco digestor. Por diferença, conseguiu-se determinar a quantidade de uréia residual.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 são apresentados os resultados de um ensaio padrão de crescimento descontínuo da microalga *Spirulina platensis*, empregando KNO_3 como fonte de nitrogênio, e de ensaios em que uma quantidade fixa de uréia ($m_{ur} = 500$ mg por litro de reator) era adicionada com frequência diária durante tempos de alimentação crescentes ($9 < t_f < 15$ d). Foi utilizada uma solução de uréia suficientemente concentrada de modo a implicar uma variação desprezível do volume de reação.

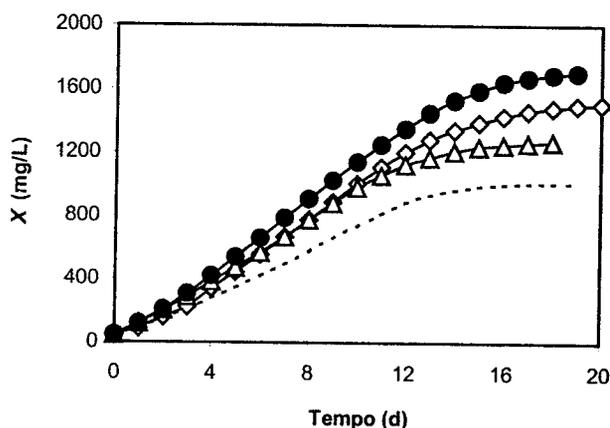


Figura 1. Comportamento da concentração celular em função do tempo de fermentação. $m_{ur} = 500$ mg/l. t_f (d): (Δ) 9; (●) 12; (◊) 15. (---) Ensaio padrão com KNO_3 .

A fonte de nitrogênio foi alimentada através de fluxo exponencialmente crescente de acordo com a equação:

$$m_a = m_o \exp(kt_f) \quad (1)$$

onde m_a e m_o indicam a massa de uréia alimentada por volume unitário de reator e aquela inicial (80 mg/L), t_f o tempo de alimentação (d) e k a constante de tempo (d^{-1}).

A Tabela 1 mostra os resultados cinéticos em termos de velocidade média de produção da biomassa, referida à metade da duração do cultivo, $(\Delta X/\Delta T)_{t/2}$, e ao tempo total de cultivo, $(\Delta X/\Delta T)_t$. Além de um efeito de limitação devido à fonte de nitrogênio para $m_{ur} < 500$ mg/L e de uma inibição acima deste patamar, que foram evidenciados num trabalho anterior variando o valor de m_{ur} (17), observa-se neste estudo um efeito oposto exercido pelo tempo de alimentação. Como esperado, em virtude de se trabalhar com adição exponencialmente crescente, os efeitos de carência da fonte de nitrogênio ($t_f = 15$ d) tendem a desaparecer no final do cultivo. De outro lado, para a mais rápida

alimentação ($t_f = 9$ d), houve inibição no começo e carência da fonte de nitrogênio na fase final do cultivo.

Tabela 1. Velocidades médias de produção de *S. platensis* obtidas variando o tempo de alimentação (t_f) e adicionando uma quantidade fixa de uréia ($m_{ur} = 500$ mg por litro de reator).

t_f (d)	$(\Delta X/\Delta T)_{t/2}$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	$(\Delta X/\Delta T)_t$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
9	93	68
12	109	75
15	95	73

Sendo desprezível a variação de volume, pode-se razoavelmente considerar a modelagem do processo como aquela do processo descontínuo. Os valores da velocidade específica de crescimento, μ , foram usados para a estimativa da energia de Gibbs necessária para o crescimento, $1/Y_{GX}$, mediante o método de Heijnen (18), que baseia-se na equação:

$$\frac{1}{Y_{GX}} = \frac{1}{Y_{GX}^{\max}} + \frac{m_G}{\mu} \quad (2)$$

onde $1/Y_{GX}^{\max}$ representa o valor limite que $1/Y_{GX}$ assumiria para $\mu \rightarrow \infty$ e m_G a velocidade específica de dissipação da energia de Gibbs para a manutenção celular, que para o sistema considerado, vale $4,5 \text{ kJ C-mol}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (18). O mesmo Heijnen tem recentemente proposto, seja para o metabolismo heterótrofo quanto para o autótrofo sem transporte inverso de elétrons (RET), uma correlação empírica que possibilita calcular $1/Y_{GX}^{\max}$ em função do tipo de fonte de carbono usada e, em particular, de seu grau de redução (γ_S) e do número de átomos de carbono por molécula (n_c) (18):

$$1/Y_{GX}^{\max} = 200 + 18(6 - n_c)^{1.8} + \exp[(3,8 - \gamma_S)^{0.32}(3,6 + 0,4n_c)] \quad (3)$$

Mediante esta relação, pode-se estimar, para o caso considerado ($\gamma_S = 0$; $n_c = 1$), uma dissipação de energia de Gibbs para o crescimento de 986 kJ/C-mol_X . Combinando as equações anteriores e os dados experimentais da concentração celular (X), foi possível estudar o andamento de Y_{GX} em função do tempo para os diversos ensaios de crescimento, executados mantendo constante a quantidade total de uréia alimentada por volume unitário ($m_{ur} = 500$ mg/L) e variando o tempo de alimentação entre 9 e 15 dias (Figura 2).

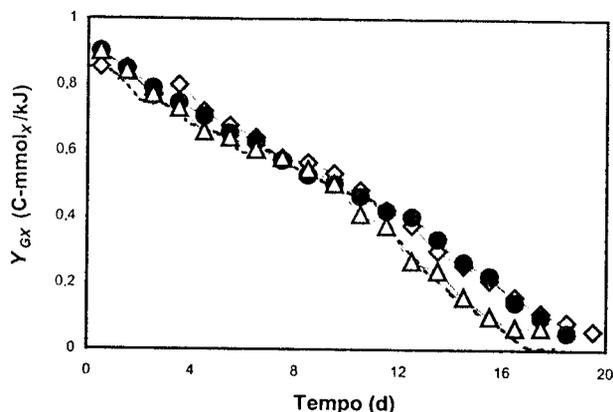


Figura 2. Rendimento de biomassa produzida por unidade de energia de Gibbs dissipada em função do tempo. $m_{at} = 500 \text{ mg/l}$. t_{fi} (d): (Δ) 9; (\bullet) 12; (\diamond) 15. (---) Ensaio padrão com KNO_3 .

O rendimento de biomassa produzida por unidade de energia de Gibbs dissipada decresce como consequência do progressivo empobrecimento do meio de cultivo. Os valores de Y_{GX} estimados são notavelmente inferiores aos de qualquer crescimento heterótrofo (cerca de $4 \text{ C-mmol}_X/\text{kJ}$) (18), de acordo com as maiores necessidades energéticas para o crescimento autótrofo a partir de CO_2 , devido a envolvimento de um maior número de vias anabólicas.

4. CONCLUSÃO

Como foi observado anteriormente variando a quantidade de uréia alimentada, um confronto entre as diversas curvas de crescimento obtidas a tempo de alimentação variável tem evidenciado as maiores diferenças bioenergéticas exatamente na fase final de cada cultivo, durante a qual a cultura que usava KNO_3 como fonte de nitrogênio mantinha uma velocidade de crescimento menor. Como no final do cultivo a elevada concentração celular pode levar a menor suprimento energético líquido, em particular nas camadas mais inferiores do reator, podemos concluir que a utilização de KNO_3 poderia ter sido dificultada pois envolve gasto energético para sua redução à amônia. Isto não aconteceu quando do uso da uréia, pois esta é espontaneamente hidrolisada a NH_3 em pH básico. Portanto, isto explicaria o melhor comportamento bioenergético do sistema no final do cultivo quando se usa uréia como fonte de nitrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cohen ZV, Vonshak A, Richmond A (1987) *Phytochemistry* **26**, 2255-2258.
- Roughan PG (1988) *J. Sci. Food Agric.* **47**, 85-93.
- Cohen ZV, Vonshak A (1990) *Phytochemistry* **30**, 205-206.
- Cohen ZV, Didi S, Heimer Y (1991) *Plant Physiol.* **98**, 569-572.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1994), Vol. 31, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, USA
- Richmond A (1983) In: Rehm H-J and Reed G, eds., *Biotechnology*, Dellweg (volume ed.) Vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim, Alemanha, pp. 109-143.
- Ciferri O, Tiboni O (1985) *Microbiol. (Italy)* **39**, 503-526.
- Balloni W, Tomaselli L, Giovannetti L, Margheri MC (1980) In: *Atti del Convegno Prospettive della coltura di Spirulina in Italia*. Firenze.
- Durand-Chastel H (1980) *Production and use of Spirulina in Mexico*. Biomedical Press, Amsterdam, p. 851.
- Piorreck M, Baasch KL, Pohl P (1984) *Phytochemistry* **23**, 207-213.
- Funteu F, Guet C, Wu B, Trémolières A (1997) *Plant Physiol. Biochem.* **35**, 63-71.
- Mahajan G, Kamat M (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 466-469.
- Pirt SJ, Walach MR, Bazin MJ (1987) *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 520-528.
- Faintuch B.L. (1989) Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo.
- Cezare E.A. (1998) Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo.
- Paoletti C, Pushparaj B, Tomaselli L (1975) In: *Atti del 17° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia*, Padova.
- Sassano CEN, Carvalho JCM, Converti A, Gioielli LA, Sato S, Torre P, Moraes IO (2002) Estudo bioenergético do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando uréia como fonte de nitrogênio. Resultados preliminares, *Farmácia e Química*, São Paulo, aceite para a publicação.
- Heijnen JJ (2001) In: Ratledge C and Kristiansen B, eds., *Basic Biotechnology*, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 45-58.