

# INFLUÊNCIA DO TEOR DE NITROGÊNIO NO CULTIVO DE *Spirulina maxima* EM DOIS NÍVEIS DE TEMPERATURA – PARTE II: PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS<sup>1</sup>

Ricardo Verthein Tavares de MACEDO<sup>2,\*</sup>, Ranulfo Monte ALEGRE<sup>3</sup>

## RESUMO

A microalga *Spirulina maxima* foi cultivada em meios com 2,5g/L KNO<sub>3</sub> (2,5N), proposto por PAOLETTI *et al* [10] e considerado meio padrão, em meios com 0,2g/L KNO<sub>3</sub> (0,2N) e em ausência de nitrogênio (0,0N) nas temperaturas de 25°C e 35°C. A composição da biomassa celular seca apresentou a 35°C um aumento médio dos lipídios totais, de 2,8 vezes do meio com ausência de nitrogênio (0,0N) e 2,9 vezes do meio 0,2N em relação ao meio padrão. A 25°C apresentou um aumento médio de 3,1 vezes do meio com ausência de nitrogênio (0,0N) e 3,2 vezes do meio 0,2N em relação ao meio padrão. A biomassa em forma de gel de cada tratamento foi recolhida e feita a extração dos lipídios totais, os quais foram pesados em base seca. As análises estatísticas dos resultados, em estimativa não linear com superfície de resposta e regressão múltipla com análise de resíduos, mostraram para o aumento dos lipídios totais uma função linear com a temperatura (T) e não linear com o nitrogênio (N), ajustando-se a um modelo onde o coeficiente de regressão  $R=0,99459$  e a equação  $LIPT = A+B^2T+CN^2$ .

**Palavras-chave:** *Spirulina*; lipídios; nitrogênio; microalga.

## SUMMARY

INFLUENCE OF THE NITROGEN LEVEL IN THE CULTIVATION OF *Spirulina maxima* IN TWO LEVELS OF TEMPERATURES – PART II: "PRODUCTION OF LIPIDS". The microalgae *Spirulina maxima* was cultivated in medium with 2,5g/L KNO<sub>3</sub> (2,5N), proposed by PAOLETTI *et al* [10] and considered standard medium, in media with 0,2g/L KNO<sub>3</sub> (0,2N) and in absence of nitrogen (0,0N) in temperatures of 25°C and 35°C. The composition of the dry cellular biomass presented to 35°C a medium increase of the total lipids, of 2,8 times of the middle with absence of nitrogen (0,0N) and 2,9 times of the half 0,2N in relation to the standard medium. To 25°C it presented a medium increase of 3,1 times of the medium with absence of nitrogen (0,0N) and 3,2 times of the half 0,2N in relation to the standard medium. The biomass in form of gel of each treatment was picked up and made the extraction of the total lipids, which were heavy in base evaporate. The statistical analyses of the results, in estimate non lineal with answer surface and multiple regression with analysis of residues, showed for the increase of the total lipids a lineal function with the temperature (T) and not lineal with the nitrogen (N), being adjusted to a model where the regression coefficient  $R=0,99459$  and the equation  $LIPT = A+B^2T+CN^2$ .

**Keywords:** *Spirulina*; lipids; nitrogen; microalgae.

## 1 – INTRODUÇÃO

A microalga *Spirulina maxima* é cultivada principalmente para a produção de alimentos ricos em proteí-

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 17/10/00. Aceito para publicação em 04/07/01.

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos/UFRRJ, Seropédica – RJ, BR, CEP 23851-970. (0xx21) 2682-1210. E-mail: ricvtm@ufrrj.br

<sup>3</sup> Departamento de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, Campinas – SP, BR, CEP 13081-970.

\* A quem a correspondência deve ser enviada.

nas e usos terapêuticos, devido a esta produzir diversas substâncias como lipídios, vitaminas, sais minerais e pigmentos de interesse econômico, [2, 4, 5, 6, 12]. A *Spirulina* é uma cianobactéria utilizada principalmente como dieta alimentar e de emagrecimento. É uma das únicas a produzir quantidades elevadas de ácidos graxos apolares essenciais, de grande importância terapêutica, em sua fração lipídica. Estudos visando a obtenção de ficocianina e ácidos graxos essenciais foram desenvolvidos em Israel, França e Japão. As microalgas foram indicadas como alimentos que possam ser usados como fonte alternativa de lipídios comestíveis devido aos seus altos níveis de triglicerídios e sua alta produtividade [8].

A *Spirulina* é uma microalga verde-azulada multicelular e filamentosa, cujos filamentos ou tricomas tem forma helicoidal, podendo variar as suas dimensões com as diversas espécies, ocorrendo polimorfismo dentro da mesma espécie, como exemplo a *Spirulina maxima* que encontramos com forma reta, predominante, e espiralada [3, 13]. Ela é mesofílica com temperatura ótima de crescimento de 35°C a 37°C, sendo que algumas cepas podem crescer de 18°C a 39°C, essencialmente fotoautotrófica, não crescendo no escuro, nem utilizando carbono orgânico e a sua principal fonte de nitrogênio na forma de nitratos, uréia ou sais de amônio com alta alcalinidade [13, 19].

Os lipídios correspondem em média a 11% em peso de *S. platensis* e 12% de *S. maxima*, em laboratório, sendo de grande importância para várias aplicações. São citadas como produtoras de ácidos graxos polinsaturados em sua fração lipídica, podendo ter de 20 a 30% desta fração em ácidos graxos essenciais, ceras, fosfolipídios [9, 11].

A *Spirulina* poderá ser a melhor opção, como alternativa para produção de biomassa alimentar em regiões áridas com escassez de água, pelo seu alto valor protéico (60 a 70%) por responder bem à radiação solar intensa, altas temperaturas, crescer bem em águas com alta salinidade, alcalinas, e além disso poder produzir maior conteúdo de lipídios através do controle de nitrogênio no meio, [1]. Já foi observado que o conteúdo de lipídios da *Spirulina* aumenta com a diminuição da concentração de nitrato no meio de cultivo e a redução da temperatura, efeito este que foi mais intenso que o obtido com a redução da temperatura apenas [7].

Estudos com 30 espécies de microalgas mostraram que algas verdes, com 17% de lipídios, aumentaram 2 ou 3 vezes o seu conteúdo lipídico após 4 a 9 dias de ausência de nitrogênio [14]. Quando nitrato, fosfato e bicarbonato estão em baixas concentrações, há au-

mento significativo na fração de carboidratos das células decrescendo a de proteína total, acompanhado de aumento da concentração de cloreto de sódio [15]. Observa-se também efeitos importantes com a ausência de nitrogênio no aumento da concentração de lipídios e ácidos graxos [16].

Foi mostrado que em um cultivo de *Spirulina* com diminuição do nitrogênio, a produtividade desta dobrou e a produção de lipídios triplicou em relação ao crescimento tradicional com 2,5g/L de KNO<sub>3</sub> [18].

Em relação à temperatura, promovendo-se um "stress" em cultura de *Spirulina*, observou-se que um aumento de 30°C para 42°C promoveu decréscimo de 58,6% para 45% do conteúdo de proteínas, aumento de 29,9% para 38,3% do conteúdo de carboidratos e aumento de 7,4% para 11,5% do conteúdo de lipídios totais [17].

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

Foi usada a cepa de *Spirulina maxima* não axênica, predominantemente reta, do Laboratório de Fermentações do Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFRRJ, cedida pelo Dr. Sunao Sato, USP.

As pré-culturas foram preparadas em erlenmeyers de 1000mL com 200mL do meio, que foram mantidas sob iluminação com duas lâmpadas fluorescentes de 40w, à distância de 40cm, e repicadas mensalmente para outro meio. Três fermentadores contendo 3000mL de meio foram inoculadas com um volume de pré-cultura que continha 100mg/L de massa celular seca, cujo controle foi feito através de determinações de densidade ótica (DO) a 560nm. Foram utilizadas temperaturas de 25 e 35°C e as dornas foram mantidas sob iluminação com 6 lâmpadas fluorescentes de 40w cada, correspondendo a 2400 lux, a uma distância de 40cm. Cada experimento foi feito em triplicata e em cada amostra foram feitas determinações de pH, DO, relação peso seco/densidade ótica e no final de cada experimento análise de lipídios totais.

O meio de cultivo utilizado tinha a seguinte composição em g/L: 2,5 KNO<sub>3</sub>; 15,15 NaHCO<sub>3</sub>; 8,9 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1,9 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,92 NaCl; 0,25MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,05 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; e 1mL de solução 1 (microelementos) em g/L: 2,86 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1,81 MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 0,22 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,39 Na<sub>2</sub>Mo<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,079 CaSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,049 Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; e 1mL de solução 2 (Fe.EDTA): 29,8g/L de EDTA.Na, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O p/1000mL, (meio 2,5N) [10].

Para os experimentos limitantes em nitrogênio usou-se as concentrações do componente nitrogenado modificadas para 0,2g/L KNO<sub>3</sub> (meio 0,2N) e com ausência de KNO<sub>3</sub>, sendo que o pH inicial do meio foi de 9,49. No final de cada tratamento a biomassa em forma de gel foi recolhida em peneira de 44µm e filtrada a vácuo, sendo o gel lavado com solução salina para retirar o excesso de carbonatos. Da biomassa hidrolizada foi extraída a fração lipídica em extrator soxhlet e pesada em balança analítica.

Os resultados foram organizados em uma matriz e feitas as análises estatísticas de estimativa não linear com superfície de resposta e de regressão múltipla com dispersão dos resultados, através do software "Statistica".

## 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises da composição centesimal da massa celular seca estão apresentados na Tabela 1, para os cultivos a 35°C e a 25°C, sendo a matriz utilizada para as análises estatísticas do parâmetro lipídios totais foi composta com os valores de temperatura (T), teores de nitrogênio (N), repetições (rep) e lipídios totais (LIPT).

LIPT mostraram uma função linear com T e não linear com N. A redução da temperatura de 35°C para 25°C causou redução de 15,4% no teor de lipídios totais no meio 2,5N, enquanto que para o meio 0,2N e meio com ausência de nitrogênio, a redução do teor de lipídios foi de 5,7% e 6,4% respectivamente. Este pequeno decréscimo na concentração dos lipídios totais causados pela redução da temperatura, para uma mesma concentração de nitratos contraria, em parte o que foi observado por MENDES [7].

TABELA 1. Composição centesimal da biomassa seca

T °C	N g/L	rep	Proteínas %	Cinzas %	Carboidratos %	Lipt %
35	2,5	1	68,42	7,6	16,03	7,95
35	2,5	2	71,02	5,84	14,92	8,22
35	2,5	3	71,81	5,77	13,54	8,88
Média			70,42	6,40	14,83	8,35
Desvio padrão			1,77371	1,03693	1,24744	0,47843
35	0,2	1	53,28	5,76	18,18	22,78
35	0,2	2	52,46	5,58	17,65	24,31
35	0,2	3	44,56	8,25	22,15	25,04
Média			50,1	6,53	19,33	24,04
Desvio padrão			4,81527	1,49228	2,45940	1,15336
35	0	1	44,48	6,23	26,03	23,26
35	0	2	49,13	7,09	21,09	22,69
35	0	3	48,19	6,81	21,48	23,52
Média			47,27	6,71	22,87	23,16
Desvio padrão			2,45866	0,43863	2,74646	0,42454
25	2,5	1	70,74	7,34	14,98	6,94
25	2,5	2	72,33	6,52	14,88	6,27
25	2,5	3	71,19	6,96	12,87	7,98
Média			71,42	6,94	14,24	7,06
Desvio padrão			0,81957	0,41037	1,19039	0,86165
25	0,2	1	41,64	8,12	27,36	22,88
25	0,2	2	42,92	7,38	26,54	23,16
25	0,2	3	43,38	7,84	26,79	21,99
Média			42,65	7,78	26,90	22,68
Desvio padrão			0,90163	0,37363	0,42028	0,61093
25	0	1	44,74	6,65	26,56	22,35
25	0	2	44,81	7,39	25,96	21,84
25	0	3	41,09	8,91	29,15	20,85
Média			43,55	7,65	27,22	21,68
Desvio padrão			2,12783	1,15222	1,69530	0,76270

Para a variação de N a 35°C, os resultados mostraram que do meio 2,5N para o meio 0,2N houve aumento do teor de lipídios de 2,88 vezes e para o meio com ausência de N houve um aumento de 2,80 vezes, aproximadamente para valores médios. A 25°C, os resultados mostraram que do meio 2,5N para o meio 0,2N houve aumento do teor de lipídios totais de 3,21 vezes e para o meio com ausência de nitrogênio houve um aumento de 3,07 vezes, aproximadamente para os valores médios, estando de acordo com observação de TORRES [18].

SHIFRIN e CHISHOLM [14] por outro lado, constataram que o conteúdo de lipídios de várias espécies de microalgas sob ausência de nitrogênio após 4 a 9 dias de cultivo aumentaram 2 a 3 vezes o conteúdo de lipídios, corroborando com os resultados encontrados. TORRES [18] também constatou aumento de 2,14 vezes com a redução de nitratos de 2,5 para 0,2g/L, e de 3,7 vezes para o meio com ausência de nitrogênio, em cultivo de *Spirulina maxima*, confirmando estas observações.

Para lipídios totais (LIPT), o desvio padrão mostrou valores uma ordem de grandeza menores do que os dos respectivos parâmetros, o teste t aproximadamente 4 vezes o valor mínimo de B, o nível p mostrou que não acarretou erro entre os parâmetros com valores << 5% e a correlação dos parâmetros estimados e análise de resíduos apresentou pouca dispersão entre os resultados, conforme Tabela 2. Portanto, a função proposta mostrou excelente relação com os valores experimentais com o coeficiente de correlação  $R = 0,99459$ , cuja equação é "  $LIPT = A + B \cdot T + D \cdot N^2$  ", Figura 1.

TABELA 2. Parâmetros para superfície de resposta

	A	B	D
Estimados	18,80721	-0,37099	-2,43620
Erro padrão	1,18178	0,05200	0,06600
Teste t(15)	15,91432	-7,13447	-36,91950
Nível p	0,00000	0,00000	0,00000

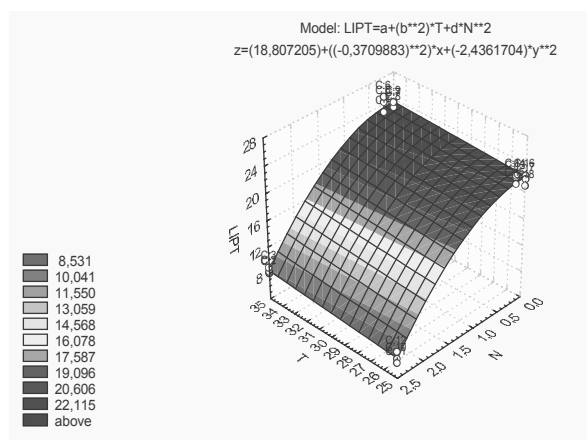


FIGURA 1. Superfície de resposta

TABELA 3. Matriz de correlação de parâmetros estimados

	A	B	D
A	1,00000	0,97949	-0,11707
B	0,97949	1,00000	0,00000
D	-0,11707	0,00000	1,00000

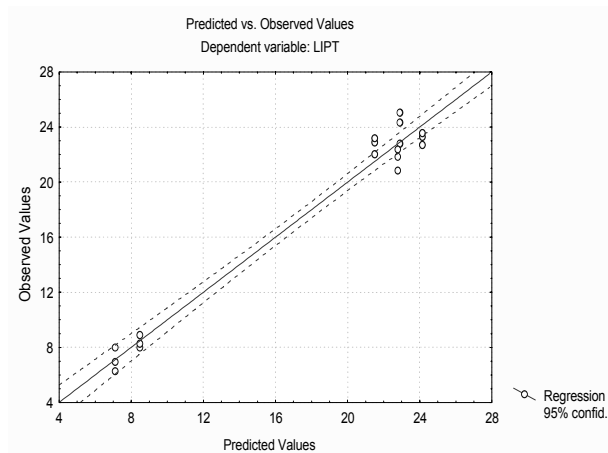


FIGURA 2. Parâmetros estimados.

Conforme a Tabela 3 e Figura 2, houve uma boa correlação entre os valores estimados, com pouca dispersão dos resultados.

#### 4 – CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que houve um aumento de aproximadamente 3 vezes do conteúdo de lipídios, quando diminuiu-se o teor de nitrogênio com o abaixamento da temperatura, sendo porém mais efetivo com a diminuição da concentração de nitrogênio, levando a crer que é viável o cultivo da *Spirulina* em condições limitantes como as apresentadas, visando a produção de lipídios ricos em ácidos graxos polinsaturados essenciais.

Os parâmetros cinéticos apontam para a possibilidade de ampliação da escala para volumes em que seja possível a produção de maior quantidade de uma biomassa rica em lipídios e nestes ácidos graxos, bem como para a extração de produtos de interesse de forma econômica.

#### 5 –REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Micro Algae groomed for future chemical production. **Chemical Engineering**, p.67, 1980.
- [2] BOROWITZKA, M. A. – Algal biotechnology products and processes-matching science and economics. **Applied Phycology**, v.4, n.3, p.267-279, 1992.
- [3] CIFERRI, O. – Spirulina, the edible microorganism (algae, single-cell protein). **Microbiological Review**, v.47, n.4, p.551-578, 1983.
- [4] CIFERRI, O.; TIBONI, O. – The biochemistry and industrial potential of Spirulina. **Annals Review Microbiology**, v.39, p.503-526, 1985.

- [5] COHEN, Z. – Products from microalgae. In: RICHMOND, A., **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Florida, USA: CRC Press, p. 421-454, 1986.
- [6] HANSEN, M. – La Spirulina, un sorprendente suplemento dietético natural. **Edaf Mexicana S/A**. 76 pg., 1984.
- [7] MENDES, L. B. B. – Biossíntese de produtos de química fina: ácido gama-linolênico a partir da microalga *Spirulina maxima*. 1992, p. 89. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.
- [8] METZER, P.; DESCOULS, N.; CASADO, N. – Microalgal as a source of triglicerides. **Comm. Eur. Communities**. p.339, 1983.
- [9] NICHOLS, B. W.; WOOD, B. T. B. – The occurrence and biosynthesis of gamma-linolenic acid in blue-green alg. *Spirulina platensis*. **Lipids**, v.3, p.46, 1968.
- [10] PAOLETTI, C.; PUSHARAJ, B.; TOMASELLI, F. L. – Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. **Atti XVII Congr. Naz. Soc. It. Microbiol.**, Padova, 26-28 ott., v.2, p.845-853, 1975.
- [11] PAOLETTI, C.; VICENZINI, M.; BOCCI, F. – Composizione biochimica generale delle biomasse di *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima*. In: MATERASSI, R. (ed). **Prospective della Ricerche**. Accademia Dei Georgofili. Firenze, v.20-21 nov., p.111-125, 1980.
- [12] RICHMOND, A. – Cell response to environmental factors. In: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p 69-99, 1986.
- [13] RICHMOND, A. – Spirulina. In: Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds). **Microalgal Biotechnology**. Cambridge University Press, Cambridge, New York, p.85-121, 1988.
- [14] SHIFRIN, I. S.; CHISHOLM, S. W. – Phytoplankton lipids: Inespecific differences and effects of nitrate, silicate and light dark cycles. **T. Phycology**. v.17, p.374-384, 1981.
- [15] TADROS, M.- Chemical composition of cyanobacteria: *Spirulina maxima* in response to nutrients, in bath cultures. **Second Internationl Marine Biotechnology Conference (IMBC/91)**, Baltimore, USA, p.13-16, oct., 1991.
- [16] TEDESCO, M.A.; DUERR, E.O. – Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. **Applied Phycology**, v.1, n.3, p.201-209, 1989.
- [17] TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; TORZILLO, G. – Physiology of stress response in *Spirulina* spp. In: DOUMENGE, F.; DURAND- CHASTEL, H. & TOULEMONT, A. (eds). **Spiruline Algue de Vie**. Bulletin de L'Institut Océanographique, Monaco, n.12, p. 65-75, 1993.
- [18] TORRES, C. G. – Influência da Concentração de Nitrogênio na produção de lipídios e ácido gama-linolênico em *Spirulina maxima*. 1994, p. 77. Mestrado, do Curso de Pós-Graduação em Ciência de Tecnologia de Alimentos (UFRRJ).
- [19] ZAROUK, C. – Contribution A L'etude D'une cyanophyceae. (Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. PhD Thesis, University of Paris, France, 1966.