

## ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DO INÓCULO PARA O CULTIVO DA MICROALGA *Schizochytrium limacinum* SR21

PEREIRA, Aline Massia<sup>1</sup>; FURLAN, Valcenir Junior Mendes<sup>1</sup>; COSTA, Jorge Alberto Vieira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande; Escola de Química e Alimentos – Laboratório de Engenharia Bioquímica. E-mail: [alinemassia@hotmail.com](mailto:alinemassia@hotmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos poliinsaturados estão entre os nutrientes de maior demanda, por não serem sintetizados pelo organismo humano e proporcionarem diversos benefícios à saúde através de sua ingestão, como no desenvolvimento do cérebro e dos olhos na infância, na prevenção a incidência de diversas doenças, como acidentes cardiovasculares entre outras (WARD e SINGH, 2005). Vários grupos de microrganismos possuem a habilidade sintetizar grandes quantidades desses compostos bioativos, como o ácido graxo poliinsaturado DHA-C22:6  $\omega$ 3 (ácido docosahexaenóico), entre eles destaca-se a microalga *Schizochytrium*.

A composição da biomassa microalgal em termos de ácidos graxos insaturados do tipo  $\omega$ 3 está relacionada com as condições de cultivo do microrganismo. A otimização do meio e as condições de fermentação são importantes para estabelecer um protocolo para produção de biomassa e DHA (ZHU et al., 2007).

Baily et al. (2008) realizaram um estudo para a produção de ácidos graxos a partir de microrganismos eucarióticos de modo que quanto maior a produção de biomassa, maior a produção de ácidos graxos poliinsaturados, objetivando produzir no mínimo 100g/L de biomassa. Kamlangdee e Fan (2003) verificaram os níveis de ácidos graxos poliinsaturados, produzidos a partir de cinco cepas de *Schizochytrium limacinum* isoladas de três mangues em Hong Kong.

Na maioria dos cultivos, a obtenção do produto desejado está diretamente relacionada a diversos parâmetros. Um dos mais pesquisados é o número de células, visto que o crescimento de culturas microbianas compreende uma sequência de fases caracterizadas por variações nas taxas de crescimento celular (BORZANI, 1975). Logo, o estudo da concentração do inóculo é fundamental para atingir grandes quantidades de biomassa.

Este trabalho teve como objetivo estudar o tipo de meio e as condições de preparo de inóculo da *Schizochytrium limacinum*, de modo a obter os melhores resultados para o número de células e concentração celular, para posteriores estudos na obtenção de biomassa microalgal.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Células provenientes da microalga *Schizochytrium limacinum* SR21 (ATCC<sup>®</sup> MYA-1381<sup>™</sup>) foram incubadas em agitador orbital, a 30°C, 150 rpm, sem iluminação, segundo Baily et. al. (2003), com um meio composto (g/L): Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (12), KCl (0,5), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (2), K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,65), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,17), Glicose (7). Soluções traços de metais (mg/L): MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (3), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (3), CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,04), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,04), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (2), NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O (2),

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (10). Soluções de vitaminas (mg/L): Tiamina (9,5) e Pantotenato (3,2). Denominando-se este estudo de Experimento 1 (E<sub>1</sub>).

O Experimento 2 (E<sub>2</sub>) foi realizado de acordo com Kamlangdee e Fan (2003), onde células da microalga *Schizochytrium limacinum* SR21 foram incubadas em um meio contendo g/L: extrato de levedura (1), peptona (1), glicose (10) em água do mar 1,5% p/v, a 25°C, 200 rpm, sem iluminação em agitador orbital.

A determinação analítica foi acompanhada pelo número de células, utilizando-se câmara de Neubauer e determinação do peso celular seco como descrito por Olsson e Nielsen (1997). As análises foram realizadas a cada 12h.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tab. 1 são apresentados os valores obtidos para o Experimento 1. O maior número de células (331,25.10<sup>6</sup> cel/mL) foi alcançado em 36 h de incubação e o peso celular seco (2,01g/L) em 72h.

Tabela 1- Cinética de crescimento da *Schizochytrium limacinum* SR21 (ATCC<sup>®</sup> MYA-1381<sup>™</sup>) cultivada segundo a metodologia de Baily et al. (2003) (E<sub>1</sub>).

	Tempo de inóculo (h)							
	0	12	24	36	48	60	72	84
Contagem total de células (10 <sup>6</sup> cel/mL)	0,22 ±0,1 3	1 ±0,5 3	62,50 ±1,5	331,2 5 ±0,98	275 ±1,3	237,5 0 ±0,99	268,7 5 ±0,21	275 ±0,5 5
Peso celular seco (g/L)	0,47 ±0,1 0	0,58 ±0,0 4	0,68 ±0,18	1,81 ±0,03	1,90 ±0,11	1,77 ±0,01	2,01 ±0,08	1,81 ±0,1 1

\* Valores médios ± desvio padrão (3 repetições).

Os resultados do Experimento 2 são mostrados na Tab. 2, onde pode-se observar que o maior número de células de 525.10<sup>6</sup> cel/mL foi atingido em 48 h de cultivo e, em 72h foi registrado a maior quantidade de biomassa (4,14g/L).

Tabela 2- Cinética de crescimento da *Schizochytrium limacinum* SR21 (ATCC<sup>®</sup> MYA-1381<sup>™</sup>) cultivada pela metodologia proposta por Kamlangdee e Fan (2003) (E<sub>2</sub>).

	Tempo de inóculo (h)							
	0	12	24	36	48	60	72	84
Contagem total de células (10 <sup>6</sup> cel/mL)	0,47 ±0,0 4	2,88 ±0,8 0	115,6 3 ±0,95	387,5 0 ±0,99	525 ±0,83	512,5 0 ±0,87	468,75 ±0,99	337,50 ±0,54
Peso celular seco (g/L)	0,31 ±0,0 1	0,30 ±0,0 1	1,37 ±0,11	2,17 ±0,08	3,16 ±0,06	4,11 ±0,20	4,14 ±0,10	3,45 ±0,12

\* Valores médios ± desvio padrão (3 repetições).

Pode-se observar na Tab. 1 e 2 que o maior número de células nos dois estudos foram atingidos antes do tempo (h) para o máximo peso celular seco, isto

demonstra que essa microalga heterotrófica é um microrganismos oleaginoso, os quais apresentam um ciclo de vida dividido em duas fases durante seu cultivo. Na primeira fase há multiplicação celular, isto é maior número de seres vivos, porém com menor peso e na segunda fase, cada célula começa a acumular lipídios e conseqüentemente aumento de tamanho. Isto ocorre porque nas primeiras horas (1ª fase) há maior quantidade de fonte de carbono e nitrogênio, logo a rota bioquímica para multiplicação celular é priorizada. A segunda fase inicia quando há pouca fonte de nitrogênio e/ou oxigênio disponível e o acúmulo de lipídios é prioritário, com conseqüente aumento do peso.

Na Fig. 1 pode-se observar a cinética de multiplicação celular em relação ao tempo do cultivo para os experimentos 1 e 2.

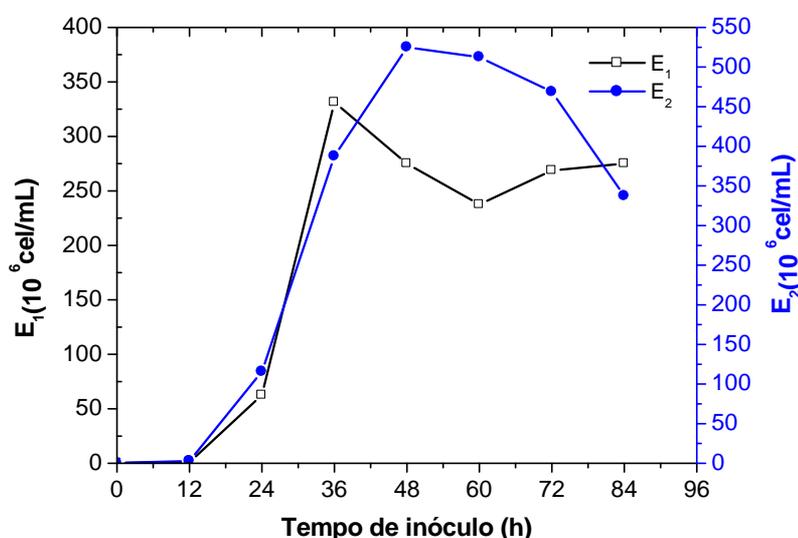


Figura 1: Cinética de crescimento de *Schizochytrium limacinum* SR21 (ATCC® MYA-1381™) para os experimentos 1 e 2.

Através da Fig. 1 pode-se verificar que a fase exponencial do crescimento celular foi entre 12-36 h para o Experimento 1 e entre 12-48 h para o Experimento 2. Pode-se observar que o Experimento 2 alcançou a maior número de células e não mostrou um rápido declínio quando comparado ao experimento 1.

#### 4 CONCLUSÃO

O experimento 2 foi o qual obteve-se maiores valores para o número de células  $525 \cdot 10^6$  cel/mL e peso celular seco 4,14 g/L quando comparado ao experimentos 1 ( $331,25 \cdot 10^6$  cel/mL e 3,16g/L peso celular seco).

Sabendo-se que a concentração inicial de células tem influência nos produtos do cultivo microalgal. Portanto, com 48 h de cultivo de inóculo da microalga *S. limacinum* nas condições de incubação propostas por Kamlangdee e Fan em um meio composto por g/L: extrato de levedura (1), peptona (1), glicose (10) em água do mar 1,5% p/v, a 25°C, 200 rpm, sem iluminação em agitador orbital, são as condições mais adequadas para o preparo do inóculo.

## 5 REFERÊNCIAS

BAILY, R. B.; DIMASI, D.; HANSEN, J. M. M.; MIRRASOUL, P. J.; RUECKER, C. M.; VEEDER, G. T.; et al. Enhanced production of lipids containing polyenoic fatty acid by very high density cultures of eukaryotic microbes in fermenters. United States Patent 6,607,900, 2003.

BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugenio. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 300 p.

KAMLANGDEE, Niyom; FAN, K. W. Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp. isolated from mangrove. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 25, n. 5, p. 643-650, 2003.

OLSSON, L.; NIELSEN, J. On-line and *in situ* monitoring of biomass in submerged cultivations. **Tibtech**, v. 15, p. 517-522, 1997.

WARD, Owen. P.; SINGH, Ajay. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. **Process Biochemistry**, Waterloo, v. 40, p. 3627-3652, 2005.

ZHU, Luying.; ZHANG, Xuecheng; JI, Lei; SONG, Xiaojin; KUANG, Chenghong. Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* in response to different temperatures and salinities. **Process Biochemistry**, v. 42, p.210–214, 2007.