



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA DA MICROALGA *Haematococcus pluvialis*
CULTIVADA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Débora Louise Barros Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Prof.(a) Dr. Alfredo Olivera
Gálvez Orientador

Prof.(a) Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Co-orientador

Recife, Fevereiro/2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586p

Silva, Debora Louise Barros

Produção de proteína da microalga *Haematococcus pluvialis* cultivada em diferentes meios de cultura / Debora Louise Barros Silva. - 2020.

55 f. : il.

Orientador: Alfredo Olivera Galvez.

Coorientador: Ranilson de Souza .

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Recife, 2020.

1. Cultivo. 2. Vegetativo. 3. Autotrófico. 4. Mixotrófico. I. Galvez, Alfredo Olivera, orient. II. , Ranilson de Souza, coorient. III. Título

CDD 639.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA DA MICROALGA *Haematococcus pluvialis*
CULTIVADA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Débora Louise Barros Silva

Dissertação julgada adequada para obtenção
do título de mestre em Recursos
Pesqueiros e Aquicultura.
Defendida e aprovada em 14/02/2020 pela
seguinte Banca Examinadora.

Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez

Orientador

Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Juliana Ferreira dos Santos

Membro Titular Externo

Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Roberto Campagnoli de Oliveira Filho

Membro Titular Interno

Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família
por toda paciência e incentivo em
todas as decisões em minha vida

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus e à minha família, especialmente aos meus pais, Luiz Carlos e Maria Goret, e namorado, Braynner Rufino, por todo apoio durante o mestrado, sempre me dando forças. Pela paciência e atenção em todos as horas, principalmente nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra, pela orientação e confiança depositada para a realização desta pesquisa, assim como durante os anos de vivência em laboratório.

À toda equipe do Laboratório de Produção de Alimento Vivo - LAPAVI, antigos e membros recentes, estagiários e pós-graduandos, que contribuíram com o conhecimento e troca de experiências, além das amizades formadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de estudo de mestrado.

Aos professores Dra. Juliana Ferreira dos Santos e Dr. Paulo Roberto Campagnoli de Oliveira Filho pela participação na banca avaliadora deste trabalho e pelas contribuições, de grande importância para a finalização deste trabalho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, servidores do Departamento de Pesca e Aquicultura e professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, que tanto contribuíram para a minha formação acadêmica.

Ao Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ – UFRPE), pela disponibilização de equipamentos para realização de análises deste trabalho, assim como ao Laboratório de Análises Físico-Químicas, do Departamento de Ciências Domésticas; Ao Laboratório de Sanidades de Animais Aquáticos (LASAQ) e Laboratório de Limnologia (LALIMNO), do Departamento de Pesca e Aquicultura.

Resumo

Haematococcus pluvialis é uma microalga de água doce de alto potencial biotecnológico, podendo-se destacar a capacidade de acumular proteínas, cujo crescimento e acumulação deste biocomposto torna-se variável conforme as condições de cultivo, destacando-se a disponibilidade de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo. Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar a influência de diferentes meios de cultura na síntese de proteína e crescimento da *H. pluvialis*. O cultivo foi realizado em erlenmeyers de 2 litros, enriquecida com quatro meios de cultura: BBM, RM, BG11 e KM2 e adição de vitaminas do complexo B, em triplicata. Foi inoculada a $10 \cdot 10^4$ cél mL⁻¹, temperatura de 24 ± 1 ° C, fotoperíodo integral e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Amostras di\u00e1rias de 2 mL fixadas em formol (2%) foram coletadas para contagem celular e determina\u00e7\u00e3o das vari\u00e1veis de crescimento: Tempo de duplica\u00e7\u00e3o (TD), velocidade de crescimento (K), taxa de crescimento espec\u00edfico (μ), densidade celular m\u00e1xima (DCM) e elabora\u00e7\u00e3o das curvas de crescimento. Ao fim do cultivo, o volume produzido em cada unidade foi coletado e centrifugado a $3.500 \times g$ por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram congeladas e liofilizadas para obten\u00e7\u00e3o da biomassa seca. Para a an\u00e1lise de prote\u00ednas, foram avaliados o conte\u00fado em prote\u00edna total (PT, %), rendimento em prote\u00edna (g L^{-1}) e produtividade l\u00edquida ($\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$). Com base na composi\u00e7\u00e3o dos meios de cultura, c\u00e1lculos estequiom\u00e9tricos foram realizados para a an\u00e1lise da influ\u00eancia das concentra\u00e7\u00f5es de nitrog\u00e9nio (N), f\u00f3sforo (P) e rela\u00e7\u00e3o N:P. Houve diferen\u00e7a estat\u00edstica ($p < 0,05$) quanto a DCM, cuja concentra\u00e7\u00e3o m\u00e1xima foi verificada em BG11 ($142,13 \pm 29,52 \cdot 10^4$ cél mL⁻¹) e a menor em KM2 ($56,67 \pm 9,09 \cdot 10^4$ cél mL⁻¹). Para K, TD e μ foi observada diferen\u00e7a estat\u00edstica apenas para BG11, indicando um crescimento gradual neste meio de cultura, assim como observado nas curvas de crescimento. Em rela\u00e7\u00e3o \u00e0 PT, houve diferen\u00e7a estat\u00edstica ($p < 0,05$), com similaridade entre RM, BG11 e KM2, de $55,08 \pm 5,6$, $49,33 \pm 3,64$ e $58,37 \pm 2,8\%$, respectivamente, diferindo do BBM, que obteve o menor conte\u00fado, de $31,11 \pm 2,93\%$. Quanto ao rendimento em prote\u00edna, houve diferen\u00e7a estat\u00edstica ($p < 0,05$), em que o maior \u00edndice foi obtido em BG11 ($0,31 \text{ g L}^{-1}$), seguido do RM ($0,25 \text{ g L}^{-1}$), que foi similar a BG11 e KM2 ($0,22 \text{ g L}^{-1}$), sendo menor em BBM ($0,13 \text{ g L}^{-1}$). A maior densidade celular, dura\u00e7\u00e3o da fase vegetativa e rendimento em biomassa foi alcan\u00e7ada onde houve maior disponibilidade de nitrog\u00e9nio, em alta N:P, que tamb\u00e9m estimularam altos n\u00edveis de prote\u00edna total. Conclui-se que os meios de cultura influenciam no crescimento e s\u00edntese proteica da *H. pluvialis*, em que o crescimento, maior densidade celular, produ\u00e7\u00e3o de biomassa e prote\u00edna da microalga foi significativamente maior em meio BG11, que possu\u00eda maior conte\u00fado em nitrog\u00e9nio e maior rela\u00e7\u00e3o N:P comparada aos outros meios avaliados. Os resultados deste estudo sugerem que *H. pluvialis* \u00e9 uma esp\u00e9cie potencial para a obten\u00e7\u00e3o de prote\u00ednas e que o meio de cultura BG11 \u00e9 o mais indicado para maior produtividade em biomassa e prote\u00ednas para a microalga.

Palavras-chave: Cultivo. Vegetativo. Autotr\u00f3fico. Mixotr\u00f3fico.

Abstract

Haematococcus pluvialis is a freshwater microalgae of high biotechnological potential, with the ability to accumulate proteins being highlighted, whose growth and accumulation of this biocomposite becomes variable according to the growing conditions, highlighting the availability of nutrients, mainly nitrogen and phosphorus. Therefore, the present study aimed to evaluate the influence of different culture media on the protein synthesis and growth of *H. pluvialis*. The cultivation was carried out in 2 liter flasks, enriched with four culture media: BBM, RM, BG11 and KM2 and addition of B complex vitamins, in triplicate. It was inoculated at 10×10^4 cells mL^{-1} , temperature of 24 ± 1 ° C, full photoperiod and light intensity of $40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Daily samples (2 mL) fixed in formaldehyde (2%) were collected for cell count and determination of growth variables: doubling time (TD), growth rate (K), specific growth rate (μ), maximum cell density (DCM) and development of growth curves. At the end of cultivation, the volume produced in each unit was collected and centrifuged at $3.500 \times g$ for 10 minutes. Then, the samples were frozen and lyophilized to obtain dry biomass. For protein analysis, total protein content (PT,%), protein production (g L^{-1}) and yield ($\text{g L}^{-1} \text{day}^{-1}$) were evaluated. Based on the composition of the culture media, stoichiometric calculations were performed to analyze the influence of nitrogen (N), phosphorus (P) and N: P ratio. There was a statistical difference ($p < 0.05$) regarding DCM, whose maximum concentration was verified in BG11 ($142.13 \pm 29.52 \cdot 10^4$ cell mL^{-1}) and the lowest in KM2 ($56.67 \pm 9.09 \cdot 10^4$ cells mL^{-1}). For K, TD and μ , statistical difference was observed only for BG11, indicating a gradual growth in this culture medium, as observed in the growth curves. Regarding PT, there was a statistical difference ($p < 0.05$), with similarity between RM, BG11 and KM2, of 55.08 ± 5.6 , 49.33 ± 3.64 and $58.37 \pm 2.8\%$, respectively, differing from BBM, which had the lowest content, of $31, 11 \pm 2.93\%$. As for protein production, there was a statistical difference ($p < 0.05$), in which the highest index was obtained in BG11 (0.31 g L^{-1}), followed by RM (0.25 g L^{-1}), which it was similar to BG11 and KM2 (0.22 g L^{-1}), being smaller in BBM (0.13 g L^{-1}). The highest cell density, duration of the vegetative phase and biomass production were achieved where there was a greater availability of nitrogen, in high N: P, which also stimulated high levels of total protein. It is concluded that the culture media influence the growth and protein synthesis of *H. pluvialis*, in which the growth, higher cell density, biomass production and microalgae protein was significantly higher in BG11 medium, which had higher nitrogen content and greater N: P ratio compared to other evaluated media. The results of this study suggest that *H. pluvialis* is a potential species for obtaining proteins and BG11 medium is the most suitable for greater production in biomass and proteins for microalgae.

Key words: Cultivation. Vegetative. Autotrophic. Mixotrophic.

Lista de figuras

	Página
Figura 1 – Curvas logísticas de crescimento de <i>H. pluvialis</i> em diferentes meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2). Dados apresentados como média \pm desvio - padrão ($n = 3$).	22
Figura 2 - Rendimento em biomassa e proteína da microalga <i>H. pluvialis</i> em relação às diferentes concentrações de nitrogênio dos meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2)	24
Figura 3 – Densidade Celular Média (DCM) e rendimento em proteína da microalga <i>H. pluvialis</i> em relação as diferentes relações N:P para os diferentes meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2).	25

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1 - Concentração de nutrientes (mmol l^{-1}) dos meios de cultura utilizados em cultivos experimentais de <i>Haematococcus pluvialis</i> .	44
Tabela 2 - Concentração de macronutrientes (em mmol l^{-1}) dos meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2) empregado no cultivo de <i>H. pluvialis</i> , calculado por estequiometria.	46
Tabela 3 - Parâmetros de crescimento da microalga <i>H. pluvialis</i> sob diferentes meios de cultura.	47
Tabela 4 – Parâmetros de produção de proteína da microalga <i>H. pluvialis</i> sob diferentes meios de cultura.	48

Sumário

	Página
Dedicatória	03
Agradecimento	04
Resumo	05
Abstract	06
Lista de figuras	07
Lista de tabelas	08
1- Introdução	10
2- Avaliação dos crescimento e produção de proteína de <i>Haematococcus pluviialis</i> em diferentes meios de cultura	15
3- Considerações finais	52
4- Referências	53

1- Introdução

A *Haematococcus pluvialis* é uma microalga dulciaquícola, pertencente ao grupo clorofícea (WAYAMA et al., 2013), é unicelular, com células esféricas, elipsoidais ou em forma de pêra (LIU et al., 2016). O seu ciclo de vida está compreendido em duas fases (vegetativa e cisto) e quatro estágios celulares: microzooides, macrozooides, palmela e aplanósporo (SHAH et al., 2016). Podem apresentar motilidade devido à presença de flagelos quando se encontram em fase vegetativa, perdendo esta característica quando submetida à condição ambiental desfavorável (SHAH et al., 2016). Estas condições, que estimulam o encistamento da microalga, podem ser: elevação ou diminuição da temperatura (WAN et al., 2014), irradiação, estresse por adição de CO₂ (≥5%) (CHENG et al., 2016), deficiência em nutrientes, alta intensidade luminosa (CHRISTIAN et al., 2018) ou por interação entre os fatores. Assim, as células aumentam em volume e a parede celular se torna mais espessa, havendo maior acúmulo de carotenoides, principalmente a astaxantina (SHAH et al., 2016).

Esta microalga apresenta grande importância comercial devido a produção deste carotenoide, que apresenta valor de mercado superior a US\$200 milhões, alcançando US\$ 2500/Kg em 2004 (MILLEGE, 2011) e em 2014 o potencial de mercado global foi estimado em 280 toneladas, avaliado em US\$447 milhões (PÉREZ-LÓPEZ et al., 2014; PANIS e CARREON, 2016). A astaxantina vem sendo aplicada na aquicultura junto à alimentação de algumas espécies de organismos com interesse econômico. Avaliando o efeito de vários níveis de astaxantina e *H. pluvialis* na dieta da corvina *Pseudosciaena crocea*, Li et al. (2014) observaram melhor ganho de peso e resposta imune dos animais em comparação com a dieta controle (dieta base).

Outros estudos também foram realizados para avaliar o potencial na extração e encapsulação de carotenoides, importantes para aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica (MACHADO JR et al., 2016), sendo a astaxantina considerada o antioxidante mais poderoso da natureza, altamente eficiente na eliminação dos radicais livres acumulados no corpo humano (KOLLER et al., 2014).

Quanto a composição da *H. pluvialis*, em modo geral, podem sintetizar carboidratos, minerais, ácidos graxos e proteínas, além dos carotenoides (SAFI et al., 2013). Ao longo do desenvolvimento o maior crescimento, divisão celular e acúmulo de proteínas, clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides primários é dado em fase vegetativa.

Conforme o início do encistamento, há um aumento da produção de carboidratos, triacilgliceróis e síntese de carotenoides secundários, como a astaxantina, e consequente diminuição da concentração de proteínas e clorofilas sintetizadas, dada a formação completa dos cistos (aplanósporo) (WAYAMA et al., 2013; CARNEY e SORENSEN, 2016).

Grewe e Griehl (2012) relataram a composição típica, em biomassa seca da *Haematococcus pluvialis*, onde pode apresentar de 29 - 45% e 17 - 25% em proteínas, 20 - 25% e 32 - 37% em lipídeos totais, 15 - 17% e 36 - 40% em carboidratos e 0,5% e 2 - 5% em carotenoides totais, em seus estágios vegetativo e cístico, respectivamente. Assim, pode-se destacar a produção de proteínas em fase vegetativa, devido a potencial em acumular mais de 40% em seu conteúdo celular.

As proteínas são constituídas de longas cadeias de ligações peptídicas de aminoácidos, que podem ser essenciais e/ou não-essenciais (KOYANDE et al., 2019; WU, 2016) e estão localizadas em diferentes partes das células: representam parte da parede celular, bem como o citoplasma, o cloroplasto e demais organelas dentro do conteúdo celular (SAFI et al., 2015). A maioria dos estudos publicados quanto à concentração de proteínas algais tratam da proteína bruta (proteína total), comumente utilizada para avaliação e aplicação em alimentos e rações, cujo conteúdo pode ser superior a certas plantas convencionais incorporadas à dieta humana (BECKER, 2007). Além disso, a produção de proteínas a partir de microalgas em larga escala pode ser realizada em semanas, enquanto em culturas de plantas superiores podem ser dadas em meses ou anos (SPECHT et al., 2010).

As microalgas apresentam perfis completos de aminoácidos essenciais e conteúdo de proteína maior que fontes alimentares convencionais, como aves, carnes e produtos lácteos (KOYANDE et al., 2019). Ejike et al., (2017) tratam que da proteína microalgal podem ser derivados peptídeos bioativos, que consistem em alimentos funcionais com propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas. Para a *Haematococcus pluvialis*, Ba et al., (2016) demonstraram que a aplicação da proteína tem mostrado potencial para a formulação de alimentos, cosméticos e apresentação de propriedades emulsificantes importantes para uso industrial, além de conter perfil de aminoácidos de alta qualidade (SAFI et al., 2013) e potencial aplicação na aquicultura. No cultivo de *Litopenaeus vannamei*, a utilização de produto desengordurado derivado da *H. pluvialis* demonstrou

ser um valioso ingrediente proteico alternativo à farinha de peixe para o cultivo do camarão, proporcionando taxa de crescimento maior e menor conversão alimentar (JU et al., 2012).

Quanto ao cultivo das microalgas, este pode ser dado através da utilização de meios autotróficos, mixotróficos e heterotróficos (KIM et al., 2013). No sistema autotrófico utilizam carbono inorgânico (CO₂), nutrientes e luz como fonte de energia através da fotossíntese, sendo considerada a forma mais comum dentre os tipos de cultivo (LI et al., 2014). Sob crescimento heterotrófico, as microalgas dispõem dos nutrientes necessários para realização das atividades metabólicas, de modo que estes processos podem ser realizados sem a necessidade de fornecimento de luz e CO₂ (HU et al., 2018), utilizando como única fonte de energia o carbono orgânico (KIM et al., 2013), como o acetato de sódio (ZHANG et al., 2018), glucose, glicerol (LIANG e CUI, 2009) e xilose (SONG e PEI, 2018). Já em condição mixotrófica podem realizar fotossíntese, porém tanto o CO₂ como os compostos orgânicos são considerados fontes essenciais de carbono, verificando-se a presença de características autotróficas e heterotróficas (MATA et al., 2010; LIN e HU, 2015). De acordo com Shah et al., (2016), os meios de cultura mais comumente utilizados no cultivo de *H. pluvialis* são BG11, BBM e OHM, caracterizados como meios autotróficos; e KM1 e suas modificações.

Tanto o conteúdo bioquímico quanto o crescimento algal podem variar de acordo com as condições físico-químicas do cultivo, como: luz, pH, temperatura e aeração, destacando-se os nutrientes presentes no ambiente (DEMIREL et al., 2018). Assim, a obtenção de uma boa produtividade está diretamente ligada ao meio de cultura selecionado e ao balanço dos seus nutrientes, onde são considerados universalmente necessários às algas: nitrogênio, fósforo, magnésio, carbono, hidrogênio, oxigênio, cobre, zinco e molibdênio. Estes nutrientes presentes nos meios de cultura também consistem em fontes essenciais para as atividades metabólicas das células, formação estrutural, regulação osmótica, entre outros (LOURENÇO, 2006). Estudos têm sido bem aplicados quanto a influência do nitrogênio (N), fósforo (P) e relação N:P, bem como as fontes nutricionais em que são ofertados, por tratar-se de macroatomitos essenciais, apresentando ação sobre o crescimento, concentração de proteínas e

clorofilas, agindo sobre a síntese bioquímica da biomassa (XIN et al., 2010; BEUCKELS et al., 2015).

Além disto, para a obtenção destes compostos bioquímicos, como as proteínas, torna-se importante a adoção de métodos de extração eficientes. Há uma grande diversidade destes: Choque osmótico (YOO et al., 2012), campos elétricos (CARULLO et al., 2018), alta pressão (JUBEAU et al., 2013), tratamento químico, ultrassom, moagem manual (SAFI et al., 2014), entre outras técnicas. As técnicas de ruptura celular mais importantes utilizam a ação mecânica, como homogeneização de alta pressão e moinhos; ultrassons, tratamentos químicos, choques térmicos ou osmóticos (URSU et al., 2014). A escolha do método a ser aplicado deve ser adaptada ao ciclo de crescimento e particularidades de cada espécie, uma vez que composição química da microalga, suas características morfológicas e estruturais, principalmente quanto à composição da parede celular, também influenciam na eficiência da solubilização de proteínas (WILLIAMS e LAURENS, 2010; URSU et al., 2014).

Em relação à parede da *Haematococcus pluvialis*, pode-se observar diferenças quanto a sua estrutura física. Na fase vegetativa, quando flageladas, apresentam uma matriz extracelular gelatinosa distinta, com uma camada cristalina mediana. Durante a fase de transição para a formação de cisto, haverá a formação de uma nova camada, formando posteriormente uma bainha trilaminar, tornando-as mais resistentes (MONT SANT et al., 2001; HAGEN et al., 2002). Sendo a eficiência de extração variável conforme a fase do ciclo de vida em que a microalga se encontra (BA et al., 2016), diminuindo conforme a entrada da *H. pluvialis* em fase de cisto.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* em diferentes meios de cultura, com ênfase à influência do nitrogênio e fósforo no crescimento e produção em proteínas desta espécie em fase vegetativa, citada como fase onde há maior concentração proteica, como também avaliar os métodos de extração mais eficientes para a sua obtenção em meio aquoso.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de produção proteico da microalga *Haematococcus pluvialis*, através do cultivo em diferentes meios de cultura e aplicação de diferentes métodos de extração, promovida pela ruptura da parede celular.

1.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento da *H. pluvialis* em diferentes meios de cultura;
- Quantificar a proteína total da *H. pluvialis* cultivada em diferentes meios de cultura;
- Avaliar a eficiência de diferentes métodos de extração da proteína da *H. pluvialis*;
- Quantificar a proteína disponível em meio aquoso da *H. pluvialis* após submissão a diferentes métodos de extração;

1.2 Hipótese

Os meios de cultura influenciam na concentração de proteína, devido a composição de seus nutrientes, e o seu rendimento é influenciado pelo método de extração aplicado, já que a respectiva ação é diretamente ligada à resistência da parede celular da microalga.

2- Título do Artigo Científico I

Parte dos resultados propostos entre os objetivos desta dissertação encontra-se no artigo intitulado:

Avaliação do crescimento e produção de proteína de *Haematococcus pluvialis* em diferentes meios de cultura

(Influence of culture medium on growth and protein production by *Haematococcus pluvialis*)

Artigo científico submetido à revista: **European Journal of Phycology**
(<https://www.tandfonline.com/loi/tejp20>),

Print ISSN: 0967-0262 Online ISSN: 1469-4433, Qualis A2

Todas as normas de redação e citação deste capítulo atendem as normas estabelecidas pela referida revista

Avaliação do crescimento e da produção de proteína de *Haematococcus pluvialis* em diferentes meios de cultura

RESUMO

As proteínas das microalgas são consideradas promissoras em aplicações na biotecnologia. A fim de avaliar esta produção e o crescimento celular sob condições nutricionais diversas, *Haematococcus pluvialis* foi cultivada em diferentes meios de cultura. Culturas em triplicata foram realizadas utilizando quatro meios de culturas: BBM, RM, BG11 e KM2, em frascos de vidro tipo Erlenmeyer de 2L. Os cultivos foram inoculados a 10×10^4 cél ml⁻¹ e estavam submetidos à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo integral e irradiância de $40 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O teor de proteínas foi determinado usando protocolo de Kjeldahl. O melhor desempenho de crescimento de *H. pluvialis* foi observado usando o meio BG11, em contraste, o menor desempenho foi encontrado para o meio KM2 ($56.67 \pm 9.09 \times 10^4$ cél ml⁻¹). Para a velocidade de crescimento, tempo de duplicação e taxa de crescimento específico o meio BG11 também apresentou vantagens versus os demais meios avaliados. Em relação à proteína total, houve diferença significativa ($p < 0,05$), com similaridade entre os meios RM, BG11 e KM2 com 55.08 ± 5.6 , 49.33 ± 3.64 e $58.37 \pm 2.8\%$, respectivamente; e menor conteúdo encontrado no crescimento usando o meio BBM ($31.11 \pm 2.93\%$). A maior densidade celular, duração da fase vegetativa e rendimento em biomassa foi alcançada onde houve maior disponibilidade de nitrogênio e alta relação nitrogênio: f\u00f3sforo. Os resultados do presente estudo sugerem que *H. pluvialis* \u00e9 uma esp\u00e9cie potencial para a obten\u00e7\u00e3o de prote\u00ednas e que o meio de cultura BG11 \u00e9 o mais indicado, entre os avaliados, para aumentar a produ\u00e7\u00e3o de biomassa e prote\u00ednas desta microalga.

Palavras-chave: Biomassa; Fotoautotr\u00f3fico; Mixotr\u00f3fico; Produtividade; Vegetativo.

Introdução

As microalgas são organismos fotossintetizantes, presentes em ambiente úmidos, de água doce e marinho, que assimilam nutrientes para a síntese de biomassa que é rica majoritariamente em carboidratos, lipídeos e proteínas, que na maioria das vezes possuem alto valor biológico (Batista *et al.*, 2013). Esses micro-organismos são considerados fontes promissoras para diversas aplicações, tais como: tratamento de águas residuais (Oliveira *et al.*, 2020a), nutrição humana (Sathasivam *et al.*, 2019), produção de fármacos (Dantas *et al.*, 2019), alimentação de organismos aquáticos (de Abreu *et al.*, 2019), produção de pigmentos (Tramontin *et al.*, 2019) e de biodiesel (Rizman *et al.*, 2018).

Entre diversas microalgas já estudadas, *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta, Volvocales) é uma espécie de água doce com um ciclo de vida complexo, compreendido em formas móveis, sésseis e encistadas, sendo esta denominada aplanósporo (Zhao *et al.*, 2015; Reinecke *et al.*, 2018). Essa microalga é utilizada principalmente na produção de astaxantina, um carotenoide que apresenta alta atividade antioxidante, produzido por esta alga após submissão a fatores estressantes (Machado Jr *et al.*, 2016). Além disso, quando a microalga se encontra na forma vegetativa, é capaz de produzir alto conteúdo em proteínas. De acordo com Grewe & Griehl (2012), *H. pluvialis* pode acumular entre 29% e 45% de proteína nas células. As proteínas derivadas de microalgas são utilizadas na alimentação humana e animal (Becker, 2007; Koyande *et al.*, 2019), além de gerar outros compostos de alto valor, como os peptídeos bioativos, com relevância nutracêutica (Soto-Sierra *et al.*, 2018). Porém, aspectos funcionais relacionados às proteínas de *H. pluvialis* ainda são pouco difundidos (Ba *et al.*, 2016).

A concentração de compostos bioquímicos, como as proteínas, é influenciada por diversos fatores físicos e químicos, como os nutrientes presentes no meio de cultura (Demirel *et al.*, 2018). Os meios de cultura se diferenciam quanto as fontes e as

concentrações, principalmente, de nitrogênio e fósforo, utilizados para o metabolismo e crescimento celular (Kim *et al.*, 2013; Cuellar-Bermudez *et al.*, 2017). Amônia, nitrito e nitrato são as fontes de nitrogênio mais comuns reportadas aos meios de cultura e elas têm efeitos diferentes na taxa de absorção, no crescimento celular e na composição bioquímica de microalgas – embora em todas estas formas, o nitrogênio esteja ligado à síntese de aminoácidos e lipídios. O fósforo, por sua vez, é convertido principalmente em ácidos nucleicos pelo armazenamento de energia química (principalmente na forma de carboidratos e adenosina trifosfato) e também participa ativamente nos mecanismos de regulação de proteínas (via fosforilação) (Fábregas *et al.*, 2000; Tocquin *et al.*, 2012; Beuckels *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2020b). Ademais, os meios de cultura diferenciam-se quanto às fontes de carbono, inorgânico e/ou orgânico, e da energia utilizada para o metabolismo celular, resultando em modos de cultivo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico (Kim *et al.*, 2013).

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo determinar a influência dos meios de cultura no crescimento e na produção de proteínas pela microalga *Haematococcus pluvialis*.

Materiais e Métodos

Delineamento Experimental

Haematococcus pluvialis foi obtida do banco de cepas de microalgas do Laboratório de Produção de Alimento Vivo e cultivos experimentais foram desenvolvidos usando os meios de cultura: BBM (Bold, 1949), BG11 (Stanier *et al.*, 1971), RM (Rudic & Dudnicenco, 2000) e KM2 (Tripathi *et al.* 1999) em triplicata. As composições dos meios de cultura são apresentadas na Tabela 1. Os meios de cultura foram preparados usando água destilada e autoclavados a 121°C, 1 atm por 20 minutos.

Com base na composição destes quatro meios de cultura, foram calculadas as concentrações dos macronutrientes nitrogênio (N) e fósforo (P) e da respectiva relação N:P (Tabela 2). A maior concentração de N é verificada em BG11 (17.700 mmol l⁻¹) e KM2 (6.128 mmol l⁻¹), seguidos de RM e BBM (3.433 e 2.857 mmol l⁻¹, respectivamente). Em relação a P, a maior concentração encontra-se em BBM (1.705 mmol l⁻¹), inferiores em RM (0.605 mmol l⁻¹) e BG11 (0.229 mmol l⁻¹) e ausente em KM2. Assim, pôde-se calcular as respectivas relações N:P, exceto para KM2.

Culturas experimentais foram realizadas em garrafas de vidro tipo Erlenmeyers de 2 l com água doce filtrada (0.2 micrometros) e autoclavada (121°C, 1 atm por 20 minutos); todos os meios foram enriquecidos com vitaminas do complexo B: tiamina (B1), piridoxina (B6) e cianocobalamina, em concentração de 0.2 ml l⁻¹. Células de *H. pluvialis* foram inoculadas à concentração inicial de 10 x 10⁴ células ml⁻¹. As culturas foram mantidas em 24 ± 1°C, sob aeração constante, irradiância de 40 μmol fótons m⁻² s⁻¹ em fotoperíodo integral. O pH foi mensurado em intervalos de 72 h.

Avaliação do Crescimento

Para avaliação do crescimento em fase vegetativa, amostras de 2 ml foram retiradas diariamente e imediatamente fixadas em formol (2%) para posterior quantificação utilizando um hemacitômetro em um microscópio óptico binocular (OLYMPUS CH30). A partir desses resultados, foram calculados os parâmetros de: Densidade Celular Máxima (DCM), Velocidade de crescimento (K) (eq. 1), Taxa de crescimento específico (μ) (eq. 2) e Tempo de duplicação (TD) (eq. 3) (Stein, 1973). Além disso, foram plotadas curvas de crescimento de *H. pluvialis* para cada meio de cultura.

$$K = \frac{3.322}{(t-t_0) \times \text{Log} (D \div D_0)} \quad (\text{eq. 1})$$

t = Tempo Final (dias); t₀ = Tempo Inicial (dias); D = Densidade Celular Final (cél ml⁻¹);

D₀ = Densidade Celular Inicial (cél ml⁻¹).

$$\mu = \frac{\ln(N(t) \div N_0)}{(t-t_0)} \quad (\text{eq. 2})$$

$N(t)$ = número de células no final da fase exponencial (cél ml⁻¹); N_0 = número de células no início da fase exponencial (cél ml⁻¹); t = tempo final da fase exponencial (dia); t_0 = tempo inicial da fase exponencial (dia).

$$TD = \frac{1}{K} \quad (\text{eq. 3})$$

Biomassa Seca

Ao fim dos cultivos, a biomassa produzida foi recuperada por centrifugação a 3500 x g por 10 min e em seguida de três lavagens com água destilada para retirar resíduos dos meios de cultura, seguidas de novas centrifugações. Após estes procedimentos, as amostras foram congeladas por 24 horas a -80°C (SANYO MDF U33V) e liofilizadas (ALPHA 1-4 LD PLUS) por 48 horas (Oliveira *et al.*, 2020c). Por fim, a biomassa foi pesada em balança analítica (0,001g) para a determinação do rendimento de biomassa (g l⁻¹), bem como a produtividade diária (g l⁻¹ dia⁻¹).

Quantificação da Proteína

A partir da biomassa seca, a concentração total de proteína (% PT) foi determinada por Kjeldahl (AOAC, 2012) eq. (4). O fator de conversão de nitrogênio (NCF) usado foi 6.25, conforme Safi *et al.* (2013) para *H. pluvialis*.

$$\% \text{ PT} = \frac{VA \times VB \times 0.14 \times \text{NCF}}{\text{Peso da amostra (mg)}} \times 6.25 \quad (\text{eq. 4})$$

Onde: VA = volume de ácido clorídrico padronizado 0.1N usado na titulação da amostra

VB = volume de ácido clorídrico padronizado 0.1N usado na titulação da amostra controle

NCF = fator de correção (0.97) da solução de ácido clorídrico 0.1N

Determinação do rendimento e produtividade de proteína

O rendimento de proteína foi calculado usando o rendimento de biomassa (g l^{-1}) e o conteúdo em proteína total (%):

$$\text{Rendimento em proteína (g l}^{-1}\text{)} = \text{Rendimento de Biomassa} \times \text{PT}$$

A produtividade de proteína foi calculada usando a eq. (5), relacionando a produtividade de biomassa ($\text{g l}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) com o teor de proteína total (%):

$$\text{Produtividade de proteína (g l}^{-1} \text{ dia}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Produtividade diária}}{\text{Teor de proteína total}}$$

Análise Estatística

A normalidade e a homogeneidade foram analisadas usando os testes Shapiro-Wilk e Cochran, respectivamente. Em seguida, os dados foram submetidos à uma análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas usando o software R 3.4 (R core team, 2015; Gross & Ligges, 2015; Wickham, 2016). A curva de crescimento logístico foi realizada usando o programa Curve Expert 1.4 (Hyams, 2010).

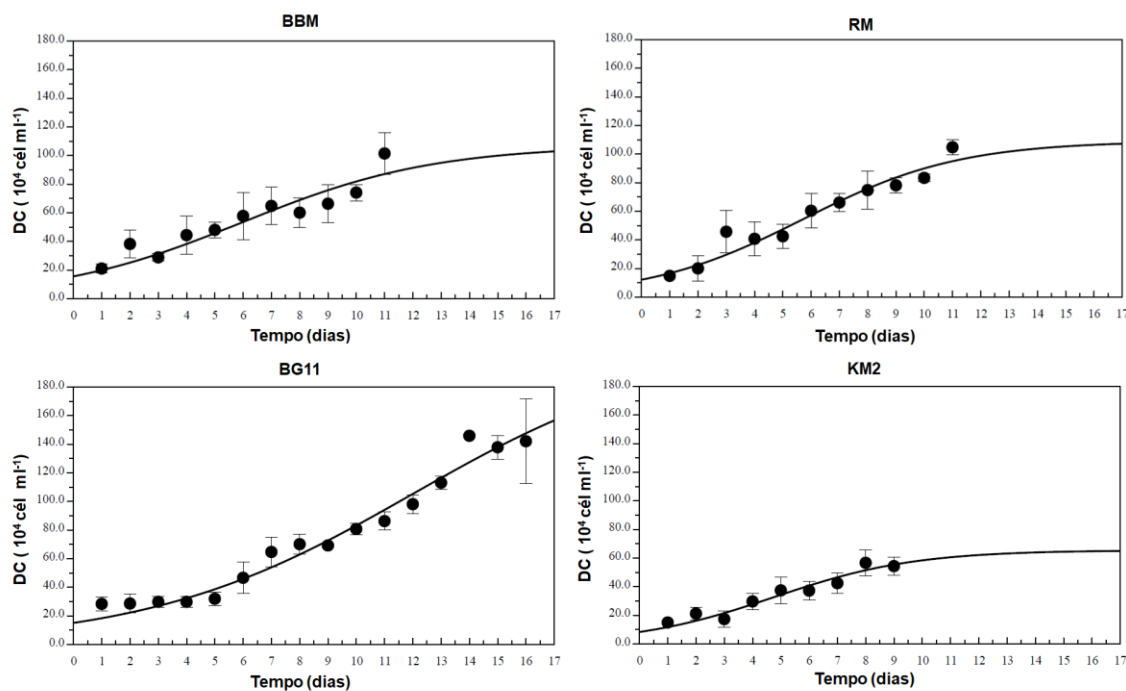
Resultados

Crescimento

Os parâmetros de crescimento de *H. pluvialis* são mostrados na Tabela 3. *H. pluvialis* apresentou maior DCM usando os meios de cultura BG11 ($142.13 \pm 29.52 \times 10^4 \text{ cél ml}^{-1}$), BBM (101.42 ± 14.68) ou RM ($104.83 \pm 5.34 \times 10^4 \text{ cél ml}^{-1}$) que em comparação ao meio de cultura KM2 ($56.67 \pm 9.09 \times 10^4 \text{ cél ml}^{-1}$). A biomassa alcançada ao final dos cultivos foi maior usando o meio BG11 ($0.64 \pm 0.07 \text{ g l}^{-1}$), enquanto não foi observado diferença significativa ($p > 0.05$) para a produtividade de biomassa entre os meios de cultura que permaneceu em aproximadamente $0,04 \text{ g l}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Quanto ao pH, também foi observada diferença significativa ($p < 0.05$), sendo mais elevado nos meios BG11 (9.23 ± 0.11) e KM2 (9.05 ± 0.08) e mais baixo para BBM (8.48 ± 0.04). O aumento

do pH ao longo dos dias de cultivo foi observado para todos os meios de cultura avaliados. Em contraste à produção de biomassa, os valores de K , TD e μ foram menores usando o meio BG11, indicando um crescimento mais lento de *H. pluvialis* devido ao maior tempo requerido para estabilização da curva de crescimento – transição da fase de crescimento exponencial para estacionária. Também se pode observar similaridade para as curvas de crescimento de *H. pluvialis* usando os meios BBM e RM, com uma curta fase lag de crescimento nos três primeiros dias de cultivo; nestes meios a fase de crescimento estacionária foi alcançada após 11 dias. No meio KM2, a microalga apresentou curva de crescimento menos acentuada, atingindo a DCM aos oito dias de cultivo, onde deu início a fase estacionária (Fig. 1).

Fig. 1. Curvas logísticas de crescimento de *H. pluvialis* em diferentes meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2). Dados apresentados como média \pm desvio - padrão ($n = 3$).



Proteína

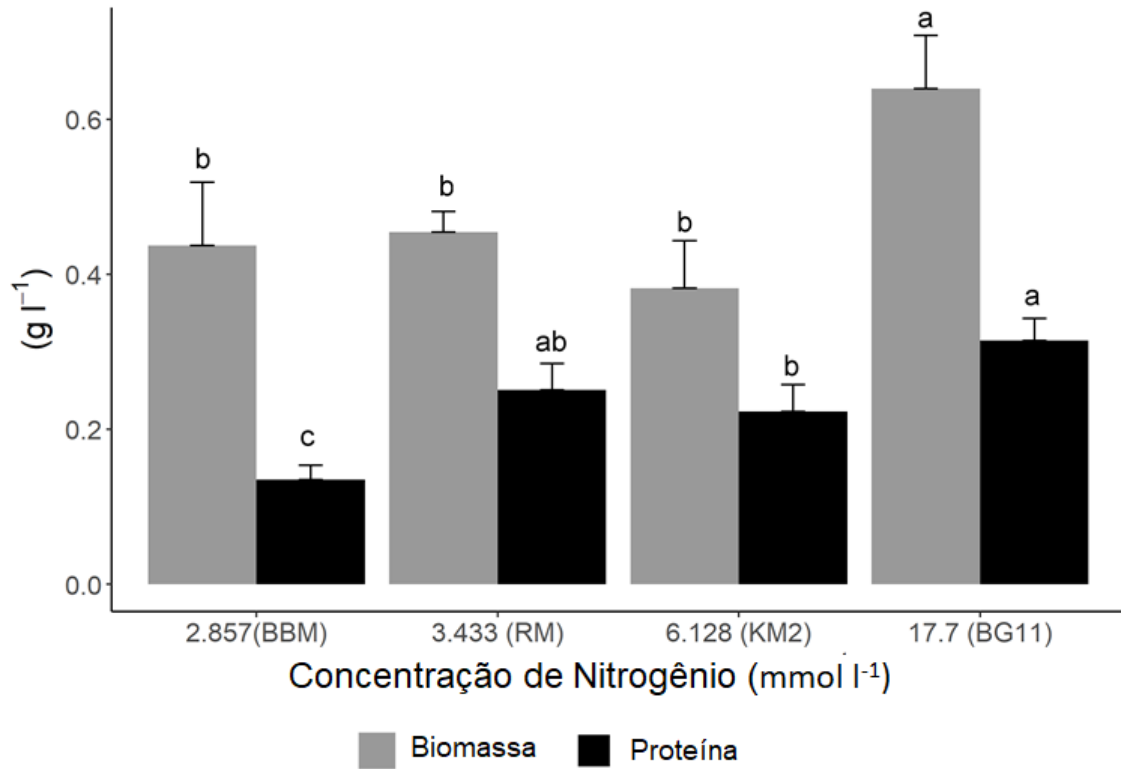
O teor (%) e a produtividade ($\text{g l}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) de proteína em *H. pluvialis* cultivada em diferentes meios de cultura são mostrados na Tabela 4. O meio de cultura também influenciou o teor de proteína de *H. pluvialis*, os maiores teores foram encontrados para os meios RM, BG11 e KM2 com 55.08%, 49.33% e 58.37%, respectivamente; valores significativamente superiores ao encontrado para o meio BBM ($31.11 \pm 2.93\%$). Como os tempos de cultivo foram diferentes para os meios de cultura, a produtividade de proteína também variou significativamente ($p < 0,05$): o meio KM2 obteve o melhor desempenho ($0.028 \pm 0.00 \text{ g l}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), similar à RM ($0.023 \pm 0.00 \text{ g l}^{-1} \text{ dia}^{-1}$); os meios BG11 ($0.02 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e BBM ($0.012 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) apresentaram os menores desempenho.

As maiores diferenças foram observadas através da análise do rendimento (g l^{-1}) e da produtividade ($\text{g l}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), uma vez que consideram a produção de biomassa e os dias de cultivo. Em relação ao rendimento em proteína, foi observada diferença estatística ($p < 0,05$), com maior índice em BG11 (0.31 g l^{-1}), seguido do RM (0.25 g l^{-1}), sendo este similar aos resultados obtidos por BG11 e KM2 (0.22 g l^{-1}). O menor rendimento foi obtido em BBM (0.13 g L^{-1}).

Análise da Influência da Composição de Nutrientes dos Meios de Cultura no crescimento e proteína

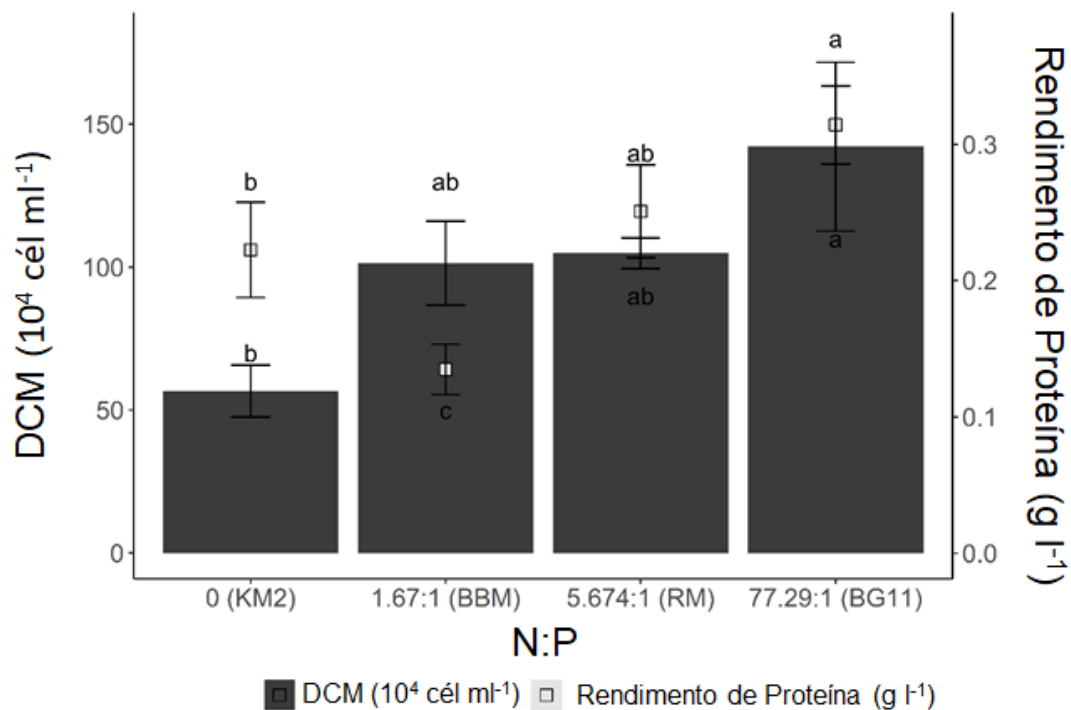
As concentrações de N e P, assim como a relação N:P (Tabela 2), foram relacionadas com crescimento e produção de proteína da *H. pluvialis* (Figs 2, 3). A maior produção de biomassa e proteína (g l^{-1}) foram obtidas nos meios em que houve maior conteúdo de N, assim como a fase vegetativa, que se tornou mais prolongada. Quanto ao conteúdo de P, a menor densidade celular foi observada em KM2, onde este nutriente estava ausente (Tabelas 3 e 4).

Fig. 2. Rendimento em biomassa e proteína da microalga *H. pluvialis* em relação às diferentes concentrações de nitrogênio dos meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2)



Letras distintas são indicativas de diferença estatística entre os tratamentos, analisados através do Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fig. 3. Densidade Celular Média (DCM) e rendimento em proteína da microalga *H. pluvialis* em relação as diferentes relações N:P para os diferentes meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2).



Letras distintas são indicativas de diferença estatística ($p < 0,05$), analisados por ANOVA e Teste de Tukey.

Foi observado crescimento similar entre os meios BG11, BBM e RM, que apresentam diferentes proporções de N:P, porém a maior densidade celular foi verificada em BG11, que apresentou maior relação N:P, assim como proporcionou maior conteúdo proteico (Fig. 3).

Discussão

Na produção de *Haematococcus pluvialis*, a adoção de processos de cultivo eficientes durante a fase vegetativa é crucial para a produção de biomassa (Shah *et al.*, 2016). O modo nutricional fotoautotrófico é considerado uma modalidade de cultivo que resulta em culturas com baixa densidade celular, enquanto os modos nutricionais

heterotrófico e mixotrófico são propostos como alternativas mais rápidas para a produção de biomassa de microalgas (Yu *et al.*, 2009). Melhores parâmetros de crescimento sob condições mixotróficas se deve à capacidade das células utilizarem simultaneamente fontes de carbono inorgânico e orgânico, através dos processos metabólicos da fotossíntese e respiração aeróbica, respectivamente (Yu *et al.*, 2009; D'Imporzano *et al.*, 2017). Porém, neste trabalho pôde-se observar maior densidade celular no meio sem a presença de carbono orgânico, BG11 ($142.13 \pm 29.52 \times 10^4$ cél ml⁻¹), enquanto menor índice foi obtido em meio contendo carbono orgânico, KM2 ($56.67 \pm 9.09 \times 10^4$ cél ml⁻¹), observados na Tabela 3.

Os resultados de densidade celular foram superiores e divergentes aos reportados por Tripathi *et al.* (1999), também em *H. pluvialis*, que observaram maior densidade celular usando KM2 (42×10^4 cél ml⁻¹), quando comparado a outros meios de cultura após 12 dias de cultivo. O melhor desempenho neste meio pode estar ligado à capacidade de seu desenvolvimento através da assimilação do carbono orgânico e inorgânico, enquanto em condições autotróficas utilizam apenas a fonte inorgânica associada à energia luminosa, onde no ensaio realizado por Tripathi *et al.* (1999) essa energia luminosa foi disponibilizada em baixa intensidade ($20.25 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$), comparada com a presente pesquisa ($40 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$). A influência da luminosidade nos parâmetros de crescimento foi observada por Sipa\u00faba-Tavares *et al.* (2015), empregando o cultivo alternativo da *H. pluvialis* em meio NPK, WC e adi\u00e7\u00e3o de extrato de macr\u00f3fita *Eichhornia crassipes* (M + NPK), que obtiveram melhor desempenho usando o meio NPK (54×10^4 cél ml⁻¹), sob intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$ ap\u00f3s 28 dias. Do 1\u00b0 ao 19\u00b0 dia, K foi quase que constante, de 0.16, 0.13 e 0.05 para os meios WC, NPK e M + NPK, respectivamente, sob $20 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$. J\u00e1 quando a irradi\u00e2ncia foi aumentada para $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$ o crescimento foi mais acelerado

nos meios NPK ($k = 0.22$) e M + NPK ($k = 0.13$) do que em meio WC ($k = 0.06$). Em nossa pesquisa, os resultados de velocidade de crescimento variaram entre 0.24 divisões dia⁻¹ (BG11) e 0.31 divisões dia⁻¹ (RM e KM2) (Tabela 3).

Em relação à biomassa produzida, o melhor resultado também foi alcançado usando o meio BG11 (0.639 ± 0.07 g l⁻¹) e apresentou similaridade em RM (0.455 ± 0.03 g l⁻¹), BBM (0.437 ± 0.08 g l⁻¹) e KM2 (0.382 ± 0.06 g l⁻¹). O maior rendimento de biomassa em BG11 também foi obtido por Dalay *et al.* (2007), de 0,64 g l⁻¹, mas sob maior irradiância ($75 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) após 12 dias de cultivo. Rendimento similar também foi obtido por Cheng *et al.* (2016), porém utilizando *H. pluvialis* submetida à irradiação por ⁶⁰Co- γ a 4000 Gy, cultivada em BBM, de 0.65 g l⁻¹ após a décima geração de cultivo com inserção de 15% de CO₂. Comparando estes resultados, seja em crescimento ou produção de biomassa, a utilização de $40 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ seria suficiente para o cultivo da *H. pluvialis*.

Conforme a análise das curvas de crescimento, um crescimento gradual e mais acentuado foi observado em BG11, cuja maior densidade celular foi alcançada após 14 dias de cultivo. Em meio BBM e RM atingiram a máxima densidade ambos em 11 dias, enquanto o crescimento menos acentuado e contínuo foi verificado em KM2, em 8 dias (Fig. 1). Minasyan (2018) também observaram que o cultivo de *H. pluvialis* em meio BG11 é capaz de atingir maior densidade com taxa de crescimento gradual. Nahidian *et al.* (2018), avaliando o desenvolvimento dos quatro estágios celulares da *H. pluvialis* em 35 dias de cultivo, também observaram um tempo de crescimento mais longo em meio BG11 quando comparadas ao cultivo com BBM, através da análise da morfologia celular.

As diferentes respostas em crescimento e produção de biomassa estão ligadas à composição nutricional dos meios de cultura, que consistem em fatores diretamente influentes para estes organismos (Demirel *et al.*, 2018). Estes nutrientes são normalmente

divididos em macronutrientes e micronutrientes, baseado na necessidade de maiores e menores concentrações, respectivamente. O fósforo é considerado um dos macroelementos que devem estar disponíveis para a assimilação pelas microalgas, uma vez que são essenciais para a síntese de estruturas celulares e crescimento (Tocquin *et al.*, 2012), assim como o nitrogênio, cuja privação pode impedir a divisão celular (Fábregas *et al.*, 2000), além da atuação direta na concentração de proteínas na biomassa (Beuckels *et al.*, 2015). Sob este aspecto nutricional, tanto a densidade celular máxima quanto o maior rendimento de biomassa observados em BG11, podem estar associados à maior concentração de nitrogênio. Como citado anteriormente, o fósforo também é essencial para o desenvolvimento das microalgas, onde este elemento estava indisponível na formulação do meio de cultura KM2, razão pela qual pode ser considerada responsável pela menor densidade celular observada neste meio de cultura. Portanto, é provável que o crescimento constatado no meio KM2 foi devido ao fósforo intracelular, armazenado previamente na produção do inóculo. Além disso, estes nutrientes também são citados como influentes na produção de células vegetativas de *H. pluvialis* (Tocquin *et al.*, 2012; Nahidian *et al.*, 2018), condição esta que justifica as diferentes respostas em crescimento observadas no presente estudo.

O reflexo da influência de diferentes concentrações e privação destes nutrientes no crescimento algal e duração da fase vegetativa podem ser observados em alguns estudos. Nahidian *et al.* (2018), avaliando diferentes concentrações de nitrato e fosfato no meio de cultura BBM para *H. pluvialis*, observaram que tanto o crescimento quanto a produtividade de biomassa dependem do conteúdo destes, onde a taxa de crescimento aumentou conforme o aumento da concentração de ambos. Avaliando a influência da depleção de nitrogênio em *Nannochloropsis salina*, *Chlorella* sp. e *H. pluvialis*, Baroni *et al.* (2019) observaram alterações na morfologia, tamanho e densidade destas espécies

quanto à disponibilidade de nitrato, com aumento lento, mas constante do tamanho celular e diminuição das densidades de células para as três espécies analisadas, conforme a diminuição do nitrato.

No desenvolvimento das microalgas, outros fatores físico-químicos, como o pH, possuem forte influência no cultivo, podendo ser um indicativo do crescimento algal dentro dos sistemas. Geralmente há uma tendência de aumento deste índice devido à atividade fotossintética. Cada espécie de microalga apresenta uma faixa ideal, que favorece o bom crescimento (Qiu *et al.*, 2017). Para *H. pluvialis*, o pH entre 7 e 8 proporciona melhores condições de crescimento (Sarada *et al.*, 2002). No entanto, Hanan *et al.* (2013) não observaram efeito significativo do pH no crescimento de *H. pluvialis* em intervalos de 5 a 9, estando os resultados do presente estudo dentro deste intervalo, cuja as amplitudes foram de 8.48 (BBM) e 9.23 (BG11) (Tabela 3).

Na análise de produção de proteínas, pôde ser observada a similaridade na produção total (%) entre os meios BG11, RM e KM2, que possuem maiores concentrações de nitrogênio, destacando BG11 como meio que possuía maior relação N:P. Quanto ao rendimento proteico, foi maior em BG11 e RM, porém ao relacionar o rendimento em proteínas com os dias de cultivo em fase vegetativa, as maiores produtividades foram verificadas em RM e KM2 (Tabela 4). Assim, foi observado que a maior disponibilidade de nitrogênio gerou maior rendimento de proteínas e biomassa, verificada em BG11 (Fig. 2).

Essa relação nutricional também foi verificada em outros estudos, como por Ranadheer *et al.* (2019) no cultivo de *Scenedesmus* sp., em que a produção de proteínas e biomassa é diretamente proporcional a concentração de nitrato. Sipaúba-Tavares *et al.* (2015), avaliando a produção de proteína em meio NPK, WC e adição de extrato de macrófita *Eichhornia crassipes* (M + NPK), observaram que o teor de proteína total

variou aproximadamente entre 30 e 48% da biomassa seca, onde as maiores concentrações foram associadas ao maior teor de nitrogênio. Colusse *et al.* (2019) observaram a variação do conteúdo em proteína da *H. pluvialis* em WC, CHU e BG11 de $10.9 \pm 1.09\%$, $34.2 \pm 0.50\%$ e $41.4 \pm 2.02\%$, respectivamente, cuja maior produção de proteína, assim como neste trabalho, também foi verificada em meio BG11. Pang *et al.* (2019), utilizando o meio BG11 com adição de carbono orgânico (D-ribose, acetato de sódio e gluconato de sódio), sob condições mixotróficas, não verificaram efeito significativo das fontes de carbono orgânico na síntese de proteína intracelular. Assim, é mais provável que a concentração em proteínas é diretamente ligada ao conteúdo de nitrogênio disponível nos meios de cultura.

Além da disponibilidade de fósforo e nitrogênio sobre concentrações adequadas, a fonte utilizada, seja orgânica ou inorgânica, também pode surtir efeito no crescimento e composição bioquímica (Shanti *et al.*, 2018). Quanto ao nitrogênio, foi predominante o uso de nitrato de sódio em BBM, RM e BG11, e L-asparagina ($C_4H_8N_2O_3$), um L-aminoácido orgânico, em KM2.

O processo de utilização dos nutrientes essenciais envolve dois mecanismos: a captação e a assimilação. A captação consiste no transporte do nutriente através da membrana plasmática e a assimilação é referente aos processos metabólicos celulares em que os íons inorgânicos são utilizados na síntese de compostos orgânicos. Quando a fonte de nitrogênio empregada é o nitrato, a primeira etapa do processo metabólico trata-se da redução do nitrato a nitrito, atividade catalisada pela enzima nitrato redutase (Lobban *et al.*, 1985). Todo o processo de redução do nitrato a nitrito ocorre no citoplasma da célula. Em seguida, o nitrito é reduzido em íon amônio (NH_4^+), através da atividade enzimática da ferredoxina-nitrito redutase, realizada no cloroplasto celular (Pajuelo *et al.*, 1995; Giordano & Raven, 2014). Assim, o nitrogênio que foi assimilado é direcionado para a

síntese de aminoácidos, e por consequência de proteínas, ou para o metabolismo energético celular, através da via da glutamina sintase/glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase (Ranadheer *et al.*, 2019), a partir da atuação das enzimas glutamato desidrogenase (GDH), glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOCAT); como também é direcionado para a produção de aspartato através da transaminação com oxaloacetato. Através destas vias, aspartato, glutamina e glutamato contribuem para a produção de clorofilas, aminoácidos, nucleotídeos, alcaloides e poliaminas, compostos orgânicos de nitrogênio (Inokuchi *et al.*, 2002). Além de nitrato, outras formas inorgânicas podem ser aproveitadas: nitrito e amônia (Sanz-Luque *et al.*, 2015). Assim como, há possibilidade de utilização de nitrogênio através de fontes orgânicas, como a L-asparagina. No processo assimilatório da asparagina há a hidrólise em amônia e aspartato a partir da atividade enzimática da asparaginase (Paul & Cooksey, 1979). Avaliando a utilização de diferentes L-aminoácidos, entre eles a L-asparagina, como fonte única de nitrogênio no crescimento de *Chlamydomonas* sp., Paul & Cooksey (1979) observaram resposta em crescimento similar em comparação ao cultivo utilizando apenas nitrato. Neste trabalho, o meio de cultura KM2 também continha L-asparagina como fonte de nitrogênio, promovendo crescimento celular e proporcionando alta produção em conteúdo proteico.

No presente estudo, as fontes de fósforo presentes nos meios de cultura foram KH_2PO_4 e K_2HPO_4 , contidas nos meios BBM, RM e BG11. O fosfato é a principal fonte de fósforo inorgânico utilizada em formulações de meios de cultura. O consumo, além do crescimento e transferência de energia, é direcionado para a constituição de compostos essenciais como ácidos nucleicos, fosfolípidos e nucleotídeos (Powell *et al.*, 2008). A captação deste nutriente é controlada através de transportadores presentes na membrana celular (Dyhrman, 2016), sendo incorporado em metabólitos fosforilados ou estocados intracelularmente, como em polifosfato (Lobban *et al.*, 1985; Powell *et al.*, 2008), através

da atividade da polifosfato quinase, e consiste na ligação de grupos ortofosfato em cadeia fosfoanidreto; o fósforo também pode ser encontrado sob as formas de fosfodiéster (C-O-P-O-C), fosfomonoéster (P-O-C) e fosfonato (C-P) (Dyhrman, 2016). Tocquin *et al.* (2012) observaram a presença de grânulos de polifosfato em células vegetativas de *H. pluvialis* cultivadas em meio de cultura com baixa relação N:P. O acúmulo de polifosfato é realizado quando há alto conteúdo de fósforo no meio, funcionando como reserva, sendo metabolizado quando este encontra-se em baixa concentração no sistema de cultivo (Solovchenko *et al.*, 2019).

Os meios de cultura proporcionam diferentes resultados no cultivo, seja maiores rendimentos de biomassa ou alta produção de determinados compostos com aplicações biotecnológicas, como astaxantina, proteínas ou lipídeos. A utilização de proteínas derivadas de microalgas tem demonstrado ser essencial por serem constituídas de compostos de alto valor biológico, como os peptídeos bioativos e proteínas recombinantes. Os peptídeos bioativos são formados por cadeias curtas de aminoácidos, com importante função na área nutracêutica por apresentar ações antitumoral, anti-hipertensiva, imunomodulatória, entre outras propriedades (Soto-Sierra *et al.*, 2018). A presença de proteínas recombinantes, como verificada por Gong *et al.* (2011) em *Chlamydomonas reinhardtii*, apresenta aplicações na área farmacêutica, sendo encontrada cerca de 20 proteínas terapêuticas de alto valor para esta espécie. Porém, pesquisas deste âmbito atualmente ainda são escassas em relação à *Haematococcus pluvialis*.

Sendo assim, considerando os resultados obtidos no presente trabalho, maior densidade celular, produção de biomassa e proteína da microalga foram obtidas utilizando o meio BG11 - que possui maior relação N:P comparada aos outros meios avaliados no presente estudo. Portanto, este estudo sugere que o meio de cultura BG11 é o mais indicado para maior produção de biomassa e de proteínas em *H. pluvialis*. Com base nestes

resultados, pesquisas futuras são recomendadas para viabilizar a aplicação da proteína da *H. pluvialis* como fonte nutricional, avaliação das propriedades funcionais destas proteínas, análise da presença de peptídeos bioativos e proteínas recombinantes, de alta relevância para o campo da biotecnologia.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado oferecida a Débora Louise durante esta pesquisa e pelo auxílio concedido ao professor Alfredo Olivera Gálvez (PQ 308063 / 2019-8). À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Pesca e Aquicultura (DEPAq), Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) e Laboratório de Análises Físico-Químicas do Departamento de Ciências Domésticas, por fornecerem sua estrutura e disponibilização de equipamentos.

Informações Suplementares

Tabela 1. Concentração de nutrientes (mmol l^{-1}) dos meios de cultura utilizados em cultivos experimentais de *Haematococcus pluvialis*.

Tabela 2. Concentração de macronutrientes (em mmol l^{-1}) dos meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2) empregado no cultivo de *H. pluvialis*, calculado por estequiometria.

Tabela 3. Parâmetros de crescimento da microalga *H. pluvialis* sob diferentes meios de cultura.

Tabela 4. Parâmetros de produção de proteína da microalga *H. pluvialis* sob diferentes meios de cultura.

Fig. 1. Curvas logísticas de crescimento de *H. pluviialis* em diferentes meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2). Dados apresentados como média \pm desvio - padrão ($n = 3$).

Fig. 2. Rendimento em biomassa e proteína da microalga *H. pluviialis* em relação às diferentes concentrações de nitrogênio dos meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2)

Fig. 3. Densidade Celular Média (DCM) e rendimento em proteína da microalga *H. pluviialis* em relação as diferentes relações N:P para os diferentes meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2).

Referências

de Abreu, J.L., Brito, L.O., de Lima, P.C.M., Silva, S.M.B.C., Severi, W., & Gálvez, A.O. (2019). Effects of addition of *Navicula* sp.(diatom) in different densities to postlarvae of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system: Growth, survival, productivity and fatty acid profile. *Aquaculture Research*, 50(8): 2231-2239.

Aoac. (2012). *Official methods of analysis of AOAC International*, 19nd edition. Aoac international, Gaithersburg.

Ba, F., Ursu, A.V., Laroche, C., & Djelveh, G. (2016). *Haematococcus pluviialis* soluble proteins: Extraction, characterization, concentration/fractionation and emulsifying properties. *Bioresource Technology*, 200:147-152.

Baroni, E.G., Yap, K.Y., Webley, P.A., Scales, P.J. & Martin, G.J.O. (2019). The effect of nitrogen depletion on the cell size, shape, density and gravitational settling of *Nannochloropsis salina*, *Chlorella* sp. (marine) and *Haematococcus pluviialis*. *Algal Research*, 39:101454.

Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Franco, J.M. & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2: 164-173.

Becker, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25:207-210.

Beuckels, A., Smolders, E. & Muylaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*, 77:98-106.

Bold, H.C. (1949). The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 76: 101-108

Cheng, J., Li, K., Yang, Z., Lu, H., Zhou, J. & Cen, K. (2016). Gradient domestication of *Haematococcus pluvialis* mutant with 15% CO₂ to promote biomass growth and astaxanthin yield. *Bioresource Technology*, 216: 340-344.

Colusse, G.A., Duarte, M.E.R., Carvalho, J.C. & Nosedá, M.D. (2019). Media effects on laboratory scale production costs of *Haematococcus pluvialis* biomass. *Bioresource Technology*, 7: 100236.

Cuellar-bermudez, S.P., Aleman-Nava, G.S., Chandra, R., Garcia-Perez, J.S., Contreras-Angulo, J.R., Markou, G., Muylaert, K., Rittmann, B.E. & Parra-Salvidar, R. (2017).

Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater. *Algal Research*, 24: 438-449.

D'Imporzano, G., Silvia, S., Davide, V., Barbara, S. & Fabrizio, A. (2017). Microalgae Mixotrophic Growth: Opportunity for Stream Depuration and Carbon Recovery. In *Prospects and Challenges in Algal Biotechnology* (Tripathi, B. & Kumar, D., editors), 141-177. Springer, Singapore.

Dalay, M.C., Imamoglu, E. & Demirel, Z. (2007). Agricultural fertilizers as economical alternative for cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17:393-397.

Dantas, D.M.M., Oliveira, C.Y.B., Costa, R.M.P.B., Carneiro-da-Cunha, M.G., Gálvez, A.O., & Bezerra, R.D.S. (2019). Evaluation of antioxidant and antibacterial capacity of green microalgae *Scenedesmus subspicatus*. *Food Science and Technology International*, 25(4), 318-326.

Demirel, Z., Yilmaz, F.F., Ozdemir, G. & Dalay, M.C. (2018). Influence of media and temperature on the growth and the biological activities of *Desmodesmus protuberans* (F.E. Fritsch & M.F. Rich) E. Hegewald. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18: 1195-1203.

Dyhrman, S.T. (2016). Nutrients and Their Acquisition: Phosphorus Physiology in Microalgae. In *The Physiology of Microalgae. Developments in Applied Phycology* (In Borowitzka, M., Beardall, J. & Raven, J., editors), 155-183. Springer, Cham.

Fábregas, J., Domínguez, A., Regueiro, M., Maseda, A. & Otero, A. (2000). Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 530-535.

Giordano, M. & Raven, J.A. (2014). Nitrogen and sulfur assimilation in plants and algae. *Aquatic Botany*, 118: 45-61.

Grewe, C.B. & Griehl, C. (2012). The carotenoid astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. In *Microalgal Biotechnology: Integration and Economy* (Posten, C. & Göttingen, C., editors), 129-144. De Gruyter, Berlin.

Gross, J. & Ligges, U. (2015). Nortest: Tests for Normality. R package version 1.0-4. <https://CRAN.R-project.org/package=nortest> Access on 02 november 2019

Gong, Y., Hu, H., Gao, Y., Xu, X. & Gao, H. (2011). Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38:1879-1890.

Hanan, N.A., Al-Shorgani, N.K., Shukor, H., Rahman, N.A. & Kalil, M.S. (2013). Pre-optimization conditions for *Haematococcus pluvialis* growth. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*, 3:70-73.

Hyams, D.G. (2010). CurveExpert Basic-Release 1.4. <http://www.curveexpert.net>. Access on 02 september 2019

Inokuchi, R., Kuma, K., Miyata, T. & Okada, M. (2002). Nitrogen-assimilating enzymes in land plants and algae: phylogenic and physiological perspectives. *Physiologia Plantarum*, 116:1-11.

Koyande, A.K., Chew, K.W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D. & Show, P. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science Human Wellness*, 8:16-24.

Lobban, C.S., Harrison, P.J. & Duncan, M.J. (1985). The physiological ecology of seaweeds. Cambridge University Press, UK.

Machado Jr, F.R.S., Trevisol, T.C., Boschetto, D.L., Burkert, J.F.M., Ferreira, S.R.S., Oliveira, J.V. & Burkert, C.A.V. (2016). Technological process for cell disruption, extraction and encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*, 218: 108-114.

Minasyan, A. (2018). Stimulated growth of green algae *Haematococcus pluvialis* under different environmental conditions. *Annals of Valahia University of Targoviste, Geographical Series*, 18: 53-61.

Nahidian, B., Ghanati, F., Shahbazi, M. & Soltani, N. (2018). Effect of nutrients on the growth and physiological features of newly isolated *Haematococcus pluvialis* TMU1. *Bioresource Technology*, 255: 229-237.

Oliveira, C.Y.B., Lima, J., Oliveira, C.D.L., Lima, P.C., Gálvez, A.O., Dantas, D.M.M. (2020a). Growth of *Chlorella vulgaris* using wastewater from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farming in a low-salinity biofloc system. *Acta Scientiarum. Technology*, 42: e46232.

Oliveira, C.Y.B., Viegas, T.L., Silva, M.F., Fracalossi, D.M. & Derner, R.B. (2020b). Effect of trace metals on growth performance and accumulation of lipids, proteins and carbohydrates on the green microalga *Scenedesmus obliquus*. *Aquaculture International*, 28(4).

Oliveira, C.Y.B., Viegas, T.L., Lopes, R.G., Cella, H., Menezes, R.S., Soares, A.T., Antoniosi Filho, N.R. & Derner, R. B. (2020c). A comparison of harvesting and drying methodologies on fatty acids composition of the green microalga *Scenedesmus obliquus*. *Biomass and Bioenergy*, 132: 105437.

Pajuelo, E., Pajuelo, P., Clemente, M.T. & Márquez, A.J. (1995). Regulation of the expression of ferredoxin-nitrite reductase in synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1249: 72-78.

Pang, N., Fu, X., Fernandez, J.S.M. & Chen, S. (2019). Multilevel heuristic LED regime for stimulating lipid and bioproducts biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, 288: 121525.

Paul, J.H. & Cooksey, K.E. (1979). Asparagine metabolism and asparaginase activity in a euryhaline *Chlamydomonas* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 25:1443-1451.

Powell, N., Shilton, A.N., Pratt, S. & Chisti, Y. (2008). Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. *Environmental Science & Technology*, 42: 5958-5962.

Qiu, R., Gao, S., Lopez, P.A. & Ogden, K.L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 28:192-199.

R Core Team. (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Access on 02 november 2019.

Ranadheer, P., Kona, R., Sreeharsha, V. & Mohan, S.V. (2019). Non-lethal nitrate supplementation enhances photosystem II efficiency in mixotrophic microalgae towards the synthesis of proteins and lipids. *Bioresource Technology*, 283: 373-377.

Reinecke, D.L., Castillo-Flores, A., Boussiba, S. & Zarka, A. (2018). Polyploid polynuclear consecutive cell-cycle enables large genome-size in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 33: 456-461.

Renstrom, B., Borch, G., Skulberg, O.M. & Jensen, S.L. (1981). Optical purity of (3S, 3'S) astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Phytochemistry*, 20: 2561-2564.

Rizwan, M., Mujtaba, G., Memom, S.A., Lee, K. & Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92:394-404.

Rudic, V. & Dudnicenco T (2000) Process for cultivation of green alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow). MD Patent Nr. a 2000 0154

Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C. & Pontalier, P. (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Applied Phycology*, 25:523-529.

Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A. & Fernandez, E. (2015). Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1-17.

Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E.F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4): 709-722.

Shah, M.M.R., Liang, Y., Cheng, J.J. & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-27.

Shanthi, G., Premalatha, M. & Anantharaman, N. (2018). Effects of L-amino acids as organic nitrogen source on the growth rate, biochemical composition and polyphenol content of *Spirulina platensis*. *Algal Research*, 35:471-478.

Sipaúba-Tavares, L.H., Berchielli-Morais, F.A. & Scardoeli-Truzzi, B. (2015). Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. *Brazilian Journal of Biology*, 75: 796-803.

Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Selyakh, I., Semenova, L., Ismagulova, T., Lukyanov, A., Mamedov, I., Vinogradova, E., Karpova, O., Konyukhov, I., Vasilieva, S., Mojzes, P., Dijkema, C., Vecherskaya, M., Zvyagin, I., Nedbal, L. & Gorelova, O. (2019). Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited. *Algal Research*, 43: 101651.

Soto-Sierra, L., Stoykova, P. & Nikolov, Z.L. (2018). Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Research*, 36: 175-192.

Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order *Chroococcales*). *Bacteriological Reviews*, 35: 171–205

Stein, J.R., Hellebust, J.A. & Craigie, J.S. (1973). *Handbook of phycological methods: Physiological and biochemical methods*. Cambridge University Press, Cambridge, p.460.

Tramontin, L.R.R., Kildegaard, K.R., Sudarsan, S., & Borodina, I. (2019). Enhancement of astaxanthin biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* via microalgal pathway. *Microorganisms*, 7(10): 472.

Tripathi, U., Sarada, R., Rao, S.R. & Ravishankar, G.A. (1999). Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology*, 68: 197-199.

Tocquin, P., Fratamico, A. & Franck, F. (2012). Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. *Journal of Applied Phycology*, 24: 365-373.

Wickham, H. (2016). Readxl: Read Excel Files. R package version 0.1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl> Access on 10 november 2019.

Yu, H., Jia, S. & Dai, Y. (2009). Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 21: 127-133.

Zhao, Y., Shang, M., Xu, J., Zhao, P., Li, T. & Yu, X. (2015). Enhanced astaxanthin production from a novel strain of *Haematococcus pluvialis* using fulvic acid. *Process Biochemistry*, 50: 2072-2077.

Tabelas**Tabela 1.** Concentração de nutrientes (mmol l^{-1}) dos meios de cultura utilizados em cultivos experimentais de *Haematococcus pluvialis*.

Nutrientes	BBM	BG11	RM	KM2
NaNO_3	29.414	176.482	35.296	-
KH_2PO_4	12.860	-	0.1470	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.1700	0.2449	0.3979	0.1360
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.3043	0.3043	0.0041	-
K_2HPO_4	0.4305	0.2296	0.4592	-
NaCl	0.4278	-	0.3422	-
KOH	0.5525	-	-	-
EDTA	0.1711	0.0034	0.0257	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.0180	-	-	0.0360
H_3BO_3	0.1844	0.0463	0.0049	0.0010*
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.0049	0.0008	0.0003	0.0001*
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.0008	0.0016	-	0.00005*
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.0010	0.0091	10.106	0.001*
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.0008	0.0003	0.0003	0.0001*
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	-	0.0312	-	-
$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$	-	0.0226	-	-
Na_2CO_3	-	0.1887	-	-
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	0.0099	-
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	0.0002	-
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0004	0.0003	0.0014	0.00008*

NH_4VO_3	-	-	-	0.00001*
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	0.0629	-
CH_3COONa	-	-	-	242.090
$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$	-	-	-	30.650

* Concentrações de elementos-traço baseadas em Renstrom *et al.*, (1981)

Tabela 2. Concentração de macronutrientes (em mmol l⁻¹) dos meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2) empregado no cultivo de *H. pluvialis*, calculado por estequiometria.

Nutrientes	BBM	RM	BG11	KM2
Nitrogênio	2.857	3.433	17.700	6.128
Fósforo	1.705	0.605	0.229	-
N:P	1.67:1	5.674	77.29:1	-

Tabela 3. Parâmetros de crescimento da microalga *H. pluvialis* sob diferentes meios de cultura.

Variáveis	Meios de cultura			
	BBM	BG11	RM	KM2
DCM (x10 ⁴ cél ml ⁻¹)	101.42 ± 14.68 ^{ab}	142.13 ± 29.52 ^a	104.83 ± 5.34 ^{ab}	56.67 ± 9.09 ^b
K (div dia ⁻¹)	0.30 ± 0.02 ^a	0.24 ± 0.02 ^b	0.31 ± 0.01 ^a	0.31 ± 0.03 ^a
TD (dias div ⁻¹)	3.31 ± 0.20 ^a	4.21 ± 0.33 ^b	3.25 ± 0.07 ^a	3.24 ± 0.33 ^a
dDCM	11	14	11	8
μ (dia ⁻¹)	0.16 ± 0.00 ^a	0.11 ± 0.03 ^b	0.19 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.02 ^a
pH	8.48 ± 0,04 ^c	9.23 ± 0.11 ^a	8.83 ± 0.13 ^b	9.05 ± 0.08 ^{ab}
Rendimento em Biomassa (g l ⁻¹)	0.437 ± 0.08 ^b	0.639 ± 0.07 ^a	0.455 ± 0.03 ^b	0.382 ± 0.06 ^b
Produtividade em Biomassa (g l ⁻¹ dia ⁻¹)	0.04 ± 0.01	0.045 ± 0.00	0.041 ± 0,00	0.048 ± 0,01

Dados apresentados como média ± desvio padrão ($n = 3$). Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos usando Teste de Tukey ($p < 0,05$). Densidade Celular Média (DCM); Velocidade de Crescimento (K); Tempo de Duplicação (TD); Velocidade de Crescimento específico (μ); dia da Densidade Celular Máxima (dDCM).

Tabela 4. Parâmetros de produção de proteína da microalga *H. pluvialis* sob diferentes meios de cultura.

Variáveis	Meios de Cultura			
	BBM	RM	BG11	KM2
Proteína total (%)	31.11 ± 2.93 ^b	55.08 ± 5.6 ^a	49.33 ± 3.64 ^a	58.37 ± 2.8 ^a
Rendimento em proteína (g l ⁻¹)	0.13 ± 0.02 ^c	0.25 ± 0.03 ^{ab}	0.31 ± 0.03 ^a	0.22 ± 0.03 ^b
Produtividade de proteína (g l ⁻¹ dia ⁻¹)	0.012 ± 0.00 ^c	0.023 ± 0.00 ^{ab}	0.022 ± 0.00 ^{bc}	0.028 ± 0.00 ^a

Dados apresentados como média ± desvio padrão ($n = 3$). Letras distintas indicam de diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo Teste de Tukey.

Legenda de Figuras

Fig. 1. Curvas logísticas de crescimento de *H. pluvialis* em diferentes meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2). Dados apresentados como média \pm desvio - padrão ($n = 3$).

Fig. 2. Rendimento em biomassa e proteína da microalga *H. pluvialis* em relação às diferentes concentrações de nitrogênio dos meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2)

Fig. 3. Densidade Celular Média (DCM) e rendimento em proteína da microalga *H. pluvialis* em relação as diferentes relações N:P para os diferentes meios de cultura (BBM, RM, BG11 e KM2).

3- Considerações finais

Neste presente trabalho, pôde-se observar a diferença do crescimento celular e da produção de biomassa em *Haematococcus pluvialis*, influenciada pelas diferentes composições dos meios de cultura. Foi verificada a maior produção, seja em crescimento como proteína em meio BG11. A adoção de meios de cultura adequados que proporcionem maiores rendimentos de biomassa é diretamente ligada seja à produção de proteínas como de astaxantina ou lipídeos para aplicações biotecnológicas. Porém, para seleção mais refinada do meio de cultura, também é indicada a avaliação de custo dos seus nutrientes em relação a qualidade do produto final que deseja ser obtido, assim como o reflexo gerado nas aplicações para produções em larga escala.

Pôde ser verificada a alta capacidade de produção de proteínas da microalga *H. pluvialis*, destacando-se a concentração de nitrogênio, assim como já foi constatada a importância do fornecimento de proteínas obtidas a partir de microalgas na dieta em cultivo de organismos aquáticos e como fonte alimentar alternativa. Trabalhos científicos publicados demonstraram que microalgas podem conter qualidade e níveis semelhantes de proteína em comparação a fontes tradicionais como ovo, leite, carne e soja. Quanto a *H. pluvialis*, há necessidade de maiores pesquisas quanto a avaliação das propriedades funcionais destas proteínas, como: proporção, disponibilidade e digestibilidade de seus aminoácidos, assim como já vêm sendo determinadas em outras espécies de microalgas, além da análise de bioatividade e presença de proteínas recombinantes. Os peptídeos bioativos são formados por cadeias curtas de aminoácidos que apresentam importante função nutracêutica em humanos, como: ação antitumoral, imunomodulatória, anti-hipertensiva, anticoagulante, entre outras (SOTO-SIERRA et al., 2018). A presença de proteínas recombinantes, como verificada em *Chlamydomonas reinhardtii*, apresenta aplicações nas áreas farmacêutica, vacinas e hormônios, e foram encontradas cerca de 20 proteínas terapêuticas de alto valor para esta espécie (GONG et al., 2011). A análise de métodos de extração e purificação destas proteínas também tornam-se de grande valor para que estas possam ser aplicadas em sistemas de produção industriais.

4- Referências

BA, F.; URSU, A. V.; LAROCHE, C.; DJELVEH, G. *Haematococcus pluvialis* soluble proteins: Extraction, characterization, concentration/fractionation and emulsifying properties. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 147-152, 2016.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 207-210, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>

BEUCKELS, A.; SMOLDERS, E.; MUYLAERT, K. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. **Water Research**, v. 77, p. 98-106, 2015
CARNEY, L.; SORENSEN, K. *Haematococcus pluvialis* culture compositions. United States Patent, **Helliae Development LLC**, Gilbert, AZ (US), 2016.

CARNEY, L.; SORENSEN, K. *Haematococcus pluvialis* culture compositions. United States Patent, **Helliae Development LLC**, Gilbert, AZ (US), 2016.

CARULLO, D.; ABERA, B. D.; CASAZZA, A. A.; DONSI, F.; PEREGO, P.; FERRARI, G.; PATARO, G. Effect of pulsed electric fields and high pressure homogenization on the aqueous extraction of intracellular compounds from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 31, p. 60-69, 2018.

CHENG, J.; LI, K.; YANG, Z.; ZHOU, J.; CEN, K. Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 49-54, 2016.

CHRISTIAN, D.; ZHANG, J.; SAWDON, A. J.; PENG, C. Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 548-551, 2018.

DEMIREL, Z.; YILMAZ, F. F.; OZDEMIR, G.; DALAY, M. C. Influence of media and temperature on the growth and the biological activities of *Desmodesmus protuberans* (F.E.

Fritsch & M.F. Rich) E. Hegewald. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 18,p. 1195-1203, 2018.

EJIKE, C. E. C. C.; COLLINS, S. A.; BALASURIYA, N.; SWANSON, A. K.; MASON, B.; UDENIGWE, C.C. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 59,p.30-36, 2017.

GREWE, C. B.; GRIEHL, C. The carotenoid astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Microalgal Biotechnology: Integration and Economy**. Ed. C. Posten and C. Walter, p. 129-144, 2012.

GONG, Y.; HU, H.; GAO, Y.; XU, X.; GAO, H. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 1879-1890, 2011.

HAGEN, C.; SIEGMUND, S.; BRAUNE, W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. **European Journal of Phycology**, v. 37, p. 217-226, 2002.

JU, Z. Y.; DENG, D.; DOMINY, W. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). **Aquaculture**, v. 354-355, p. 50-55, 2012.

JUBEAU, S.; MARCHAL, L.; PRUVOST, J.; JAOUEN, P.; LEGRAND, J.; FLEURENCE, J. High pressure disruption: a two-step treatment for selective extraction of intracellular components from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 983-989, 2013.

KIM, S.; PARK, J. E.; CHO, Y. B.; HWANG, S. J. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 8-13, 2013.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, p. 52-63, 2014.

KOYANDE, A. K.; CHEW, K. W.; RAMBABU, K.; TAO, Y.; CHU, D.; SHOW, P. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, p. 16-24, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>

LI, M.; WU, W.; ZHOU, P.; XIE, F.; ZHOU, Q.; MAI, K. Comparison effect of dietary astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* on growth performance, antioxidant status and immune response of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. **Aquaculture**, v. 434, p. 227-232, 2014.

LIU, J.; VAN DER MEER, J. P.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. In: SLOCOMBE, S. P.; BENEMANN, J.R. Microalgal production for biomass and high-value products. CRC Press, p. 267-293, 2016.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006, p. 175-188.

MACHADO JR, F. R. S.; TREVISOL, T. C.; BOSCHETTO, D. L.; BURKERT, J. F. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V.; BURKERT, C. A. V. Technological process for cell disruption, extraction and encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v.218, p.108-114, 2016.

MILLEDDGE, J. Commercial application of microalgae other than as biofuel: a brief review. **Reviews in Environmental Science and BioTechnology**, v. 10, p. 31-41, 2011.

MONTSANT, A.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. Presence of a Nonhydrolyzable Biopolymer in the Cell Wall of vegetative Cells and Astaxanthin-Rich Cysts of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Marine Biotechnology**, v. 3, p. 515-521, 2001.

PANIS, G.; CARREON, J.R. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. **Algal Research**, v. 18, p. 175-190, 2016.

PÉREZ-LÓPEZ, P.; GONZÁLEZ-GARCÍA, S.; JEFFRYES, C.; AGATHOS, S. N.; MCHUGH, E.; WALSH, D.; MURRAY, P.; MOANE, S.; FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T. Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale. **Journal of Cleaner Production**, v. 64, p. 332-344, 2014.

SAFI, C.; CHARTON, M.; PIGNOLET, O.; SILVESTRE, F.; VACA-GARCIA, C.; PONTALIER, P. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 523-529, 2013.

SAFI, C.; FRANCES, C.; URSU, A.V.; LAROCHE, C.; POUZET, C.; VACA-GARCIA, C.; PONTALIER, P. Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. **Algal Research**, v. 8, p. 61-68, 2015.

SHAH, M. M. R.; LIANG, Y.; CHENG, J. J.; DAROCH, M. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-27, 2016.

SOTO-SIERRA, L.; STOYKOVA, P.; NIKOLOV, Z. L. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. **Algal Research**, v. 36, p. 175-192, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.023>

SPECHT, E.; MIYAKE-STONER, S.; MAYFIELD, S. Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1373-1383, 2010.

URSU, A.; MARCATI, A.; SAYD, T.; SANTE-LHOUTELLIER, V.; DJELVEH, G.; MICHAUD, P. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 134-139, 2014.

WAN, M.; ZHANG, J.; HOU, D.; FAN, J.; LI, Y.; HUANG, J.; WANG, J. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation. **Bioresource Technology**, v. 167, p.276-283, 2014.

WAYAMA, M.; OTA, S.; MATSUURA, H.; NANGO, N.; HIRATA, A.; KAWANO, S. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **PLoS ONE**, v. 8, e53618, 2013.

WILLIAMS, P. le B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, v.3, p. 554-590, 2010.

WU, G. Dietary protein intake and human health. **Food & Function**, v.7, p. 1251-1265, 2016. DOI: 10.1039/C5FO01530H

XIN, L.; HONG-YING, H.; KE, G.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5494-5500, 2010.

YOO, G.; PARK, W.; KIM, C. W.; CHOI, Y.; YANG, J. Direct lipid extraction from wet *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using osmotic shock. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 717-722, 2012.