

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS

Aline Meireles dos Santos

**EMPREGO DE DIFERENTES FONTES DE AMIDO COMO FONTE
EXÓGENA DE CARBONO EM BIOPRODUTOS MICROALGAIS**

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Aline Meireles dos Santos

EMPREGO DE DIFERENTES FONTES DE AMIDO COMO FONTE EXÓGENA DE CARBONO EM BIOPRODUTOS MICROALGAIS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Qualidade dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jacob Lopes

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Meireles dos Santos, Aline
EMPREGO DE DIFERENTES FONTES DE AMIDO COMO FONTE
EXÓGENA DE CARBONO EM BIOPRODUTOS MICROALGAIS / Aline
Meireles dos Santos.-2016.
59 p.; 30cm

Orientador: Eduardo Jacob Lopes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2016

1. Cianobactéria 2. Amido 3. Razão C/N 4. Velocidade
de agitação 5. Composição de ácidos graxos I. Jacob Lopes,
Eduardo II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Aline Meireles dos Santos. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

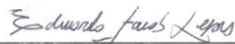
E-mail: alinemeirelessm@hotmail.com

Aline Meireles dos Santos

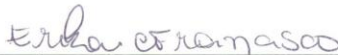
**EMPREGO DE DIFERENTES FONTES DE AMIDO COMO FONTE EXÓGENA DE
CARBONO EM BIOPRODUTOS MICROALGAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Qualidade de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 07 de março de 2016:



Eduardo Jacob Lopes, Prof. Dr. (Presidente/Orientador)



Érika Cristina Francisco, Prof.^a. Dr.^a. (UPF)



Alexandre José Chicoski, Prof. Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Eduardo Jacob Lopes, o qual tive o privilégio em tê-lo como orientador e sorte em tê-lo como amigo. Obrigada pelo apoio incondicional, ensinamentos e principalmente pelos conselhos.

Aos meus pais, Jorge e Nara, pelo respeito, incentivo e confiança. Por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui.

Aos professores Roger, Alexandre e Cristiano pela oportunidade de realização de análises em seus laboratórios.

Aos colegas de laboratório, em especial ao meu irmão Alberto, pelo apoio, conselhos e amizade.

À Karem e Rafaela pela disponibilidade e contribuição para o andamento desta pesquisa.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

EMPREGO DE DIFERENTES FONTES DE AMIDO COMO FONTE EXÓGENA DE CARBONO EM BIOPRODUTOS MICROALGAIS

AUTORA: ALINE MEIRELES DOS SANTOS

ORIENTADOR: EDUARDO JACOB LOPES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 07 de Março de 2016.

As microalgas são uma potencial fonte de biomoléculas de interesse comercial devido ao seu perfil metabólico diversificado capaz de sintetizar diferentes classes de compostos orgânicos. O gênero *Aphanothece microscopica Nägeli* é uma cianobactéria com habilidade de crescimento em cultivos heterotróficos mediante a adição de uma fonte de carbono exógena. Visando a possibilidade de valorização dos bioprodutos gerados nos biorreatores heterotróficos, este trabalho teve como objetivo a intensificação de bioprocessos microalgais suportados em amido como fonte exógena de carbono. Na primeira etapa foram avaliados amido de mandioca e amido de milho, como fontes de carbono exógena em diferentes quantidades absolutas de carbono e nitrogênio, em uma razão fixa de 20, para uso em cultivo heterotrófico. A razão C/N de 5000/250 utilizando amido de mandioca apresentou-se como a condição ideal do processo, resultando em produtividades celulares de 18,16 mg/L/h e eficiência de remoção de matéria orgânica de 83,57 % em um menor tempo de geração de 14,25 h. A segunda etapa concentrou-se no efeito das velocidades de agitação de 0, 100, 200 e 300 RPM na composição da biomassa e na qualidade do biocombustível produzido a partir de uma razão C/N de 5000/250. A velocidade de agitação de 200 RPM apresentou a melhor composição de biomassa, resultando em eficientes produtividades celulares (36,27 mg/L/h), eficiência de remoção de carbono orgânico e nitrogênio (94,87 % e 84,40%, respectivamente) e produtividade lipídica (3,31 mg/L/h). A composição deste óleo é predominantemente saturada e monoinsaturada, adequada para a síntese de biodiesel (teor de éster de 76%, número de cetano de 64,36, índice de iodo de 70,38 g100gl⁻¹, grau de insaturação de 71%, índice de saponificação de 161,01, fator saturados de cadeia longa de 3,5%, ponto de entupimento do filtro a frio em -5,48 °C, ponto de névoa em 5,53 °C, equivalentes de posição alílica de 52, equivalentes de posição bis-alílicos de 19, estabilidade de oxidação de 14,38 h, calor de combustão de 30,70, viscosidade cinemática de 1,02 mm² s⁻¹ e densidade de 0,68 gcm⁻³).

Palavras-chave: Cianobactéria, amido, razão C/N, velocidade de agitação, composição de ácidos graxos, biocombustível

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

EMPLOYMENT OF DIFFERENT STARCH SOURCES AS AN EXOGENOUS SOURCE OF ORGANIC CARBON IN MICROALGAE BIOPRODUCTS

AUTHOR: ALINE MEIRELES DOS SANTOS

ADVISOR: EDUARDO JACOB LOPES

Place and Date: Santa Maria, March 07, 2016.

The microalgae are a potential source of biomolecules of commercial interest due to its diverse metabolic profile able to synthesize different classes of organic compounds. The gender *Aphanothece microscopica Nægeli* is a cyanobacterium with growth capacity in heterotrophic cultivation by adding a source of exogenous carbon. Aiming at the possibility of valuation of products generated in heterotrophic bioreactors, this study had as objective the intensification of microalgae processes supported in starch as an exogenous carbon source. In the first stage we were evaluated cassava starch and corn starch as exogenous carbon sources at different absolute amounts of carbon and nitrogen, at a fixed ratio of 20, for use in heterotrophic cultivation. The C/N ratio of 5000/250 using cassava starch presented itself as the ideal condition of the process, resulting in cellular yield of 18.16 mg/L/h and removal efficiency of organic matter from 83.57% in a smaller generation time of 14.25 h. The second stage focused on the effect of agitation speeds of 0, 100, 200 and 300 RPM in the composition of the biomass and the quality of biodiesel produced from a C/N ratio of 5000/250. The stirring speed of 200 RPM showed the best composition biomass, resulting in efficient cellular productivities resulting in efficient cellular productivities (36.27 mg/L/h), organic carbon and nitrogen removal efficiency (94.87% and 84.40%, respectively) and lipid yield (3.31 mg/L/h). The composition of this oil is predominantly saturated and monounsaturated, appropriate for biodiesel synthesis (ester content of 76%, cetane number of 64.36, iodine value of 70.38 $\text{gl}_2\ 100\text{g}^{-1}$, degree of unsaturation of 71%, saponification value of 161.01, long-chain saturated factor of 3.5%, cold filter plugging point at 5.48°C, cloud point at 5.53°C, allylic position equivalents of 52, bis-allylic position equivalents of 19, oxidation stability of 14.38 h, higher heating value of 30.7, kinematic viscosity of 1.02 $\text{mm}^2\ \text{s}^{-1}$ and kinematic density of 0.68 $\text{g}\ \text{cm}^{-3}$).

Keywords: Cyanobacteria, starch, C/N ratio, stirring speed, composition of fatty acids, biofuel

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
CAPÍTULO 2	14
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1. INTENSIFICAÇÃO DE BIOPROCESSOS	15
2. MICROALGAS.....	16
3. CULTIVO HETEROTRÓFICO	17
4. PARÂMETROS OPERACIONAIS DO PROCESSO	18
4.1. Fonte exógena de carbono orgânico	18
4.2. Razão C/N	19
4.3. Agitação	20
5. BIOPRODUTOS MICROALGAIS.....	21
6. REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 3	29
ASSESSMENT OF ABSOLUTE AMOUNTS OF NUTRIENT IN HETEROTROPHIC GROWTH OF <i>APHANOTHECE MICROSCOPICA NÄGELI</i>	30
1. INTRODUCTION	30
2. MATERIALS AND METHODS	31
2.1. Microorganism and culture medium	31
2.2. Formulation of the culture media	32
2.3. Cultures in bioreactors	32
2.4. Kinetics parameters	33
2.5. Sampling and analytical methods	33
3. RESULTS AND DISCUSSION	34
4. CONCLUSION	38
5. REFERENCES	39
CAPÍTULO 4	42
BIODIESEL DE TERCEIRA GERAÇÃO A PARTIR DE MICROALGAS CULTIVADAS EM BIORREATORES AGITADOS MECANICAMENTE	43
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	45

2.1. Micro-organismo e meio de cultura.....	45
2.2. Razão C/N e velocidade de agitação.....	45
2.3. Cultivo em biorreator	45
2.4. Análise dos dados cinéticos	46
2.5. Amostragem e métodos analíticos.....	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1. Cinética de crescimento.....	48
3.2. Perfil de ácidos graxos	50
3.3. Propriedades do biodiesel.....	52
4. CONCLUSÃO	1
5. REFERÊNCIAS.....	2
CAPÍTULO 5	5
1. CONCLUSÃO GERAL.....	6

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A produção de microalgas em larga escala vem sendo estudada há décadas, tendo em vista a grande variedade de produtos metabólicos práticos e potenciais, tais como alimentos, suplementos, lipídeos, enzimas, biomassa, polímeros e pigmentos.

O crescimento autotrófico é o procedimento mais comum empregado no cultivo de microalgas. Por serem micro-organismos fotossintetizantes, as microalgas produzem energia através da luz e usam CO₂ atmosférico como fonte de carbono. Uma alternativa viável para culturas fototróficas, mas restrita a poucas espécies de microalgas, é o uso de cultivos heterotróficos. Cultivos heterotróficos podem fornecer uma relação custo-benefício uma vez que utilizam como única fonte de energia, o carbono orgânico, em sistemas independentes de luminosidade, possibilitando altas concentrações celulares e representativas produtividades.

Sistemas heterotróficos são conhecidos por serem empregados na obtenção de altas concentrações celulares. A fim de se obter altas produtividades de biomassa e de produtos são desenvolvidas estratégias de exploração das condições de cultivo e constituição do meio sintético, bem como diferentes modos de operação.

A disponibilidade de nutrientes vem sendo considerada, desde os primeiros estudos limnológicos, como uma das variáveis que controlam a estrutura e a biomassa de comunidades fitoplanctônicas bem como a sucessão sazonal de espécies. Macronutrientes como nitrogênio, fósforo e enxofre formam a maior fonte de nutrientes que influenciam no crescimento e divisão celular e na fase de crescimento primário.

Diferentes fontes de carbono orgânico são empregadas nos sistemas heterotróficos, as mais conhecidas são a glicose, galactose, manose, frutose e lactose, apresentando diferença na assimilação conforme a espécie utilizada. Uma alternativa potencial na direção de redução de custos de produção em cultivos heterotróficos é a utilização de substratos de baixo custo, como amidos e soluções de celulose hidrolisada, podendo reduzir os gastos em até 40%. Adicionalmente, as microalgas estão totalmente adaptadas a este substrato, uma vez que polissacarídeos tais como glicogênio e amido, são as principais reservas endógenas de substratos oxidáveis em cianobactérias, os quais servem para manter o

metabolismo microalgal quando o meio de cultura apresentar uma escassez de fonte exógena de carbono.

Um fator crucial no cultivo heterotrófico, principalmente os que apresentam altas densidades, é o suprimento com oxigênio, o qual é utilizado durante o metabolismo energético. Um fator que influencia o suprimento de oxigênio é a agitação adequada do meio de cultivo, pois favorece o intercâmbio gasoso entre células e o meio. Além disto, a agitação evita a sedimentação da biomassa e impede a formação de gradientes das condições de cultivo. Tipicamente, a agitação do meio de cultivo é realizada por aeração, movimentação de pás e/ou bombeamento do líquido. Essas considerações tornam fundamental a compreensão sobre a necessidade de agitar e aerar um meio de cultivo.

Neste sentido, o objetivo do estudo é avaliar a composição da biomassa e consumo de substrato da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* a partir do cultivo heterotrófico, estudando a variação dos parâmetros operacionais, com foco na variação da fonte de carbono exógena, das quantidades absolutas de nutrientes e nas velocidades de agitação do meio de cultivo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Intensificar a produção de biomassa e lipídeos microalgais a partir de cultivos heterotróficos suportados em amido.

2.2. Objetivos específicos

Formular um meio de cultura sintético baseado em diferentes amidos para uso em cultivos heterotróficos;

Estudar o efeito das quantidades absolutas de carbono e nitrogênio em uma razão C/N de 20 no metabolismo heterotrófico;

Estudar o efeito de diferentes velocidades de agitação no metabolismo heterotrófico;

Avaliar a cinética de consumo de amido e produção de biomassa;

Caracterizar os lipídeos de natureza intracelular.

CAPÍTULO 2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTENSIFICAÇÃO DE BIOPROCESSOS

Nos últimos anos a biotecnologia industrial tem sido pressionada por uma tendência de intensificação e integração de processos, visando reduzir custos capitais e operacionais e aumentar o rendimento global de desempenho (SCHÜGERL & HUBBUCH, 2005).

O processo de intensificação consiste no desenvolvimento de novos aparelhos e técnicas que, em comparação com aquelas comumente empregados, são esperados para trazer melhorias na fabricação e processamento, diminuindo substancialmente a proporção de tamanho/capacidade de produção, consumo de energia, ou a produção de resíduos, e, finalmente resultando em tecnologias sustentáveis mais baratas (STANKIEWICZ & MOULIJN, 2000)

A necessidade crescente de produzir, de forma rápida e econômica, novos produtos biotecnológicos para o mercado usando tecnologias eficientes têm encorajado os fabricantes a procurar vantagens competitivas através da intensificação de bioprocessos. A intensificação de processo tem sido reconhecida como uma boa abordagem para otimizar a produtividade e custo-efetividade dos diferentes processos biológicos. No contexto de bioprocessos, existem possibilidades para o desenvolvimento de novos sistemas de cultivos, com a otimização e conversão de processos já empregados por tecnologias atuais com potencial de produzir unidades mais eficientes. O fator limitante para aceitação comercial dos metabólitos, gerados durante o processo, é uma produção eficaz em quantidades suficientes para aplicação em escala comercial (WRIGHT et al., 1999).

Segundo esses autores os processos químicos e físicos convencionais, utilizados para intensificar um processo, exigem uma análise cuidadosa do seu potencial de aplicação em bioprocessos devido à sensibilidade desse tipo de sistema. Os processos metabólicos podem ser prejudicados pela formação de produtos ou sub-produtos tóxicos durante o cultivo e, por vezes, a decomposição do produto durante a sua formação diminui o rendimento e produtividade do processo (SCHÜGERL & HUBBUCH, 2005).

2. MICROALGAS

O termo alga é completamente desprovido de valor taxonômico, pois designa organismos muito distintos entre si quanto à origem, composição química e morfologia. Envolve seres unicelulares e multicelulares, com hábitos plânctônicos e bentônicos. A partir dessas características derivam os termos de uso consagrado, tais como microalgas, que define seres microscópicos diversos presentes em sistemas aquáticos, em sua maioria com hábitos planctônicos (LOURENÇO, 2006).

Dez grandes grupos fazem parte da classificação geral de microalgas segundo Graham e Wilcox (2000), são eles: Cyanophyta, Chlorarachniophyta, Glaucophyta, Euglenophyta, Cryptophyta, Prymnesiophyta, Dinophyta, Ochrophyta, Rhodophyta e Chlorophyta. Como muitas das espécies que ocorrem na natureza ainda não foram identificadas e/ou caracterizadas fisiologicamente, seu potencial na produção biotecnológica de biomoléculas de alto valor ou biomassa enriquecida ainda necessita ser explorado (GUEDES et al., 2011; RAJA et al., 2008; ROSENBERG et al., 2008; WIJFFELS, 2008).

Sob o ponto de vista de aplicação biotecnológica, as cianobactérias são consideradas os organismos mais versáteis, uma vez que podem mediar até três metabolismos em paralelo para a obtenção de energia e manutenção de suas estruturas (QUEIROZ et al., 2013). A fotossíntese é a forma de obtenção de energia mais utilizada, e em casos que não há contato com a luz, a obtenção da energia ocorre por meio da respiração. Segundo Lourenço (2006) algumas cianobactérias filamentosas possuem células especializadas, chamadas de heterocitos, na fixação de nitrogênio molecular (N_2) quando não há concentração mínima de nitrogênio na forma iônica assimilável no meio, proporcionando-lhe vantagem competitiva em relação às outras espécies microalgais, que não possuem esta adaptação.

Muitas microalgas têm demonstrado facilidade em crescer rapidamente em cultivos heterotróficos. Tais microalgas apresentam a capacidade de crescimento na ausência de luz, substituindo a fixação de CO_2 atmosférico de culturas autotróficas por consumo de substratos orgânicos dissolvidos no meio de cultura. A cianobactéria *Aphanothece microscopica Nágeli* faz parte deste grupo com potencial de exploração do metabolismo heterotrófico. Esta microalga é característica dos estuários do sul do Brasil, pertencente à família *chroococaceae*, formadora de

colônias azul-esverdeadas adaptadas para flutuar, apresentando uma estrutura macroscópica mucilagínosa, amorfa e abundante, e células adultas em formato epitelial medindo 9.0-9.5 μ m X 4.0-4.2 μ m (ESTEVEZ, 1988).

3. CULTIVO HETEROTRÓFICO

O crescimento autotrófico é o procedimento mais comum empregado no cultivo de microalgas. Por serem micro-organismos fotossintetizantes, as microalgas produzem energia através da luz e usam CO₂ atmosférico como fonte de carbono. Uma alternativa viável para culturas fototróficas, mas restrita a poucas espécies de microalgas, é o uso de cultivos heterotróficos. O cultivo heterotrófico consiste na capacidade de crescimento na ausência de luz, substituindo a fixação de CO₂ atmosférico de culturas autotróficas por consumo de substratos orgânicos dissolvidos no meio de cultura (CHEN, 2006)

Muitas microalgas têm demonstrado facilidade em crescer rapidamente em cultivos heterotróficos. Geralmente, um organismo utilizado para produção heterotrófica deve possuir as seguintes características: (i) habilidade para se dividir e metabolizar na ausência de luz; (ii) possibilidade de crescer em meio de baixo custo; (iii) facilidade para se adaptar rapidamente em novos ambientes e (iv) capacidade para resistirem ao estresse hidrodinâmico do biorreator (WEN & CHEN, 2003).

Segundo Chen (1996) as culturas heterotróficas têm várias limitações importantes: (i) Existe um número limitado de espécies de microalgas que podem crescer heterotróficamente; (ii) O aumento das despesas e custos por adição de um substrato orgânico; (iii) A contaminação e competição com outros micro-organismos; (iv) A inibição do crescimento por excesso de substrato orgânico; e (v) Incapacidade de produzir metabólitos induzidos pela luz. No entanto, estudos recentes mostram que as culturas heterotróficas são de crescente interesse pela produção de uma vasta variedade de metabólitos microalgais em todas as escalas, a partir de experimentos de laboratório até escala industrial (APT & BEHRENS, 1999; YANG et al., 2000.; LEE, 2001; SANSAWA & ENDO, 2004; WEN & CHEN, 2003; LI et al., 2007; BRENNAN & OWENDE, 2010).

As microalgas podem crescer heterotroficamente usando os mesmos meios utilizados em culturas fototróficas, a diferença é a adição de carbono orgânico ao invés do fluxo contínuo de dióxido de carbono e luz (MORALES-SÁNCHEZ et al,

2013). A glicose é mais comumente usada, em função do seu teor energético mais elevado do que a maioria dos substratos orgânicos, porém seu uso pode implicar na elevação dos custos do meio de cultivo. Segundo Wei et al. (2009) uma das maneiras de reduzir custos no cultivo heterotrófico está na redução dos custos do substrato. Estes autores sugerem que o uso de materiais de baixo custo, como amidos é uma boa estratégia na direção de redução de custos.

Todos os compostos exógenos que suportam o crescimento heterotrófico podem ser metabolizados via oxidativa das pentoses-fosfato. Cianobactérias possuem mecanismos estruturais específicos para o transporte ativo desses substratos orgânicos para dentro da célula. Além da glicose, a absorção de outros carboidratos ocorre por esta via, mas para que isso ocorra dissacarídeos e polissacarídeos devem ser convertidos, por hidrólise, em monossacarídeos. Várias enzimas envolvidas nessas reações têm sido identificadas em cianobactérias (FRANCISCO et al., 2014).

4. PARÂMETROS OPERACIONAIS DO PROCESSO

4.1. Fonte exógena de carbono orgânico

As informações sobre fontes exógenas de carbono específicas para um desempenho metabólico ideal são muito dispersas para chegar a uma conclusão devido a dependência das espécies de cianobactérias e condições de cultivo (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Em relação à economia do processo, a fonte de carbono representa 80% do custo total do meio de cultura, podendo inviabilizar economicamente o processo (CHENG et al. 2009). Uma alternativa potencial na direção de redução de custos de produção é a substituição de determinadas fontes de carbono orgânico por substratos de baixo custo, como amidos e soluções de celulose hidrolisada, podendo reduzir os gastos em até 40% (XU et al., 2006; LI et al., 2007; WEI et al., 2009).

Devido à escassez de informações Francisco et al. (2014) avaliaram diferentes monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos como fontes de carbono exógenas para o cultivo heterotrófico de *Phormidium* sp. Os resultados indicaram o amido de mandioca e a maltodextrina como as fontes com maior potencial de

exploração para a produção de biomassa e lipídeos. Segundo esses autores, as cianobactérias dispõem de uma reserva de substrato endógeno, o chamado amido cianofício, que serve para manter o metabolismo microalgal quando o meio de cultura apresentar uma escassez de fonte exógena de carbono. Neste sentido, as células estão totalmente adaptadas a este substrato, e a sua utilização como fonte de carbono exógeno é adequado para o crescimento heterotrófico de cianobactérias.

4.2. Razão C/N

Em comparação com a cultura fotoautotrófica, o cultivo heterotrófico permite as microalgas acumularem uma maior proporção de lipídeos em menos tempo, o que torna o aumento de escala mais fácil. Em condições heterotróficas, o carbono orgânico foi demonstrado como um fator eficaz exibindo forte papel positivo no crescimento celular e acumulação de ácidos graxos celulares. No entanto, nenhuma atenção especial tem sido dada para as concentrações de nitrogênio e suas taxas de renovação, as quais podem ocasionar alteração no metabolismo de ácidos graxos sob condições heterotróficas (WANG et al., 2012).

Curiosamente, a produção de lipídios intracelulares é afetado criticamente pela relação carbono/nitrogênio (CHENG et al., 2009). A limitação de nitrogênio é geralmente utilizada nos estudos de acumulação de lipídeos em micro-organismos, sendo a condição mais fácil de controlar e é geralmente o tipo mais eficiente de limitação para induzir a acumulação de lipídeos em micro-organismos. Depleção de nitrogênio, juntamente com a disponibilidade de fonte de carbono alteram o fluxo de carbono celular a partir de síntese de proteínas para a síntese de lipídios (SHEEHAN et al., 1998; RATLEDGE & COHEN, 2008; CONVERTI et al., 2009).

Algumas vias são reprimidas (síntese de ácido nucleico e proteínas), ao passo que outras são induzidas (síntese de ácidos graxos e triglicerídeos) durante a transição entre a fase de crescimento e a fase de acúmulo de lipídeos (RATLEDGE & COHEN, 2008). Em condições adversas de crescimento, as microalgas são confrontadas com um excesso de NADPH que, sob condições normais, seriam empregados na proliferação celular. Sob estas circunstâncias adversas, uma excessiva cadeia de transporte de elétrons é impedida pelo acúmulo de compostos altamente reduzidos, como os triacilgliceróis (KLOK et al., 2014).

4.3. Agitação

Microalgas em cultivo heterotrófico não realizam fotossíntese, e por isto não necessitam de luz. A principal característica do metabolismo heterotrófico é a necessidade de uma fonte orgânica externa para a obtenção de energia e carbono. Ressalta-se que até mesmo as microalgas fotoautotróficas são capazes de oxidar compostos orgânicos para obter energia. O que difere estas microalgas das heterotróficas é a origem destes compostos orgânicos; nas fotoautotróficas o carbono orgânico tem origem do processo interno de fotossíntese, enquanto que nas heterotróficas, o carbono orgânico é captado do meio externo (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Em ambas células, fotossintéticas e heterotróficas, o aumento da taxa de assimilação primária do nitrogênio inorgânico em aminoácidos requer um aumento do fluxo de carbono através de vias respiratórias, o que afeta o metabolismo de toda a célula (HUPPE & TURPIN, 1994). O metabolismo respiratório em microalgas desempenha duas funções principais: serve como fonte exclusiva de energia para manutenção e biossíntese e fornece os blocos construtores de carbono para a biossíntese (GEIDER & OSBORNE, 1989; JACOB-LOPES et al., 2010).

Um fator crucial no cultivo heterotrófico, principalmente os que apresentam altas densidades, é o suprimento com oxigênio. Todas as microalgas heterotróficas são aeróbicas e quanto mais denso o cultivo, maior a demanda por oxigênio, o qual é utilizado durante o metabolismo energético (CHOJNACKA & MARQUEZ-ROCHA, 2004). Durante a respiração o oxigênio é consumido, com paralela produção de CO₂, sendo que a taxa respiratória dos substratos orgânicos está intimamente orientada para o crescimento e divisões celulares. Wu e Shi (2007) relatam que tiveram problemas com a aeração do sistema de cultivo e, como consequência, a produtividade final foi bem menor do que o esperado. Portanto, ao se projetar um sistema heterotrófico de microalgas é essencial considerar como será suprida esta alta demanda por oxigênio.

Um fator que influencia o suprimento de oxigênio é a agitação adequada do meio de cultivo, pois favorece o intercâmbio gasoso entre células e o meio. Além disto, a agitação evita a sedimentação da biomassa e impede a formação de gradientes das condições de cultivo (CARVALHO et al., 2006). Tipicamente, a agitação do meio de cultivo é realizada por aeração, movimentação de pás ou

bombeamento do líquido (BARSANTI & GUALTIERI, 2006), porém o estresse causado pela tensão de cisalhamento durante o processo pode dificultar o cultivo de células frágeis, como as microalgas filamentosas. Destaca-se que algumas cepas de microalgas são especialmente sensíveis a altas taxas de agitação (CAMACHO et al., 2011; RAVELONANDRO et al., 2011).

Neste sentido, para consolidar a rota heterotrófica como um processo competitivo, de produção de bioprodutos, no mercado precisa-se de novas pesquisas, visando o desenvolvimento e principalmente, o aperfeiçoamento dos sistemas de produção em escala comercial, a fim de reduzir custos e aumentar a produtividade.

5. BIOPRODUTOS MICROALGAIS

A biodiversidade e conseqüente variabilidade na composição bioquímica das microalgas, aliada ao emprego de melhoramento genético e ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala, vêm permitindo que as microalgas sejam utilizadas em diversas aplicações (BOROWITZKA, 1999; UMBLE & KETCHUM, 1997; ROSEMBERG et al., 2008). A composição bioquímica da biomassa microalgal possui características comercialmente interessantes, uma vez que apresenta significativas proporções de proteínas, lipídeos, carboidratos, pigmentos e ácidos nucléicos, podendo desta forma, serem utilizadas como ingrediente de alimentos destinados ao consumo humano, alimentação animal, extração de biomoléculas e produção de biocombustíveis (SPOLAORE et al., 2006).

O interesse pela fração lipídica destes organismos soma-se a fração protéica, em virtude principalmente, da qualidade dos ácidos graxos presentes. Neste sentido, os óleos unicelulares tem sido alvo de extensivos esforços em pesquisa e desenvolvimento, para tornar viável comercialmente a produção de ácidos graxos poliinsaturados como o ácido eicosapentaenóico, docoeicosapentaenóico, linoléico e linolênico (RATLEDGE & COHEN, 2008). O óleo de peixe marinho é a mais rica fonte de ácido eicosapentaenóico (EPA), no entanto, a recuperação do EPA do óleo de peixe é cara (BELARBI et al., 2000). As microalgas são produtoras primárias de ômega-3 e ácidos graxos poliinsaturados e os peixes geralmente obtêm o EPA via bioacumulação na cadeia alimentar. Muitos esforços estão sendo dedicados para o desenvolvimento de uma tecnologia comercialmente viável para produzir EPA

diretamente de microalgas (BARCLAY et al., 1994; LEBEAU & ROBERT, 2003; MOLINA GRIMA et al., 2003).

O uso desta biomassa em produtos de química fina inclui a indústria de cosméticos. Estes extratos celulares podem ser encontrados principalmente em produtos para a pele e face, ao qual são atribuídas ações anti-envelhecimento, emoliente, proteção solar, anti-irritante, estimulante da síntese de colágeno e estimulante de multiplicação celular (SPOLAORE et al., 2006). Devido a seu metabolismo fototrófico, as microalgas são expostas a altas tensões de oxigênio e radicais livres. Isto resultou no desenvolvimento de numerosos e eficientes sistemas de proteção contra o estresse oxidativo. Os mecanismos de proteção são capazes de impedir a acumulação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e, portanto, neutralizam as atividades que danificam as células. Uma vez que os componentes antioxidantes são originários de uma fonte natural, a sua aplicação em cosméticos para a preservação e fins de proteção está se desenvolvendo rapidamente (PULZ & GROSS, 2004)

O uso de cianobactérias e clorofíceas na nutrição humana estão vinculados à forma de tabletes, cápsulas e preparados líquidos, podendo ser também incorporado a massas e gomas, além de outros derivados alimentícios (YAMAGUCHI, 1997; LIANG et al., 2004). O uso da biomassa destes organismos como fonte nutricional deve-se basicamente ao elevado teor de proteína, associado ao excelente valor nutritivo (JACOB-LOPES et al., 2006) e ainda por representar uma fonte de corantes naturais (JACOB-LOPES et al., 2007). O isolamento de carotenóides representa outra importante parcela do uso. A importância nutricional e terapêutica destas moléculas está relacionada à sua atividade pró-vitáminica A, ação antiinflamatória e anticarcinogênica (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2005).

Independente do uso na alimentação humana, o emprego em nutrição animal representa importante parcela do consumo mundial. A fabricação de rações empregadas na aquicultura, para alimentação de peixes, moluscos e crustáceos, associado à alimentação de animais domésticos de pequeno e grande porte, o que inclui pássaros, gatos, cães, cavalos e bois, representam uma fração de aproximadamente 30% da demanda mundial de biomassa microalgal (BECKER, 2004).

Finalmente, os sistemas globais usados na produção de biocombustíveis incluem primariamente a produção de biomassa. Esta produção pode ser mediada

via biotecnológica, no qual cianobactérias e clorofíceas apresentam importante potencial para a produção de óleos, adequados à manufatura de biodiesel (CHISTI, 2007). As vantagens que tornam estas espécies de microalgas ocasionalmente como uma nova e potencial matéria-prima para a geração de biocombustível são as suas altas taxas de crescimento e sua alta eficiência fotossintética quando cultivadas em ambientes específicos (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2013). Além disso, as microalgas podem ser cultivadas em terras não aráveis, ou mesmo no mar e, conseqüentemente, eles não competem por terras aráveis para a produção de alimentos (BRENNAN & OWENDE, 2013; SINGH et al., 2011). Desta forma, a terceira geração de biocombustíveis, expressa em termos do desenvolvimento de processos biotecnológicos para a produção de óleos tem se mostrado com amplo potencial de exploração, principalmente no que se refere ao uso de microalgas como matriz para a fabricação de biodiesel (GRESSEL, 2008).

6. REFERÊNCIAS

- APT, K. E.; BEHRENS, P. W. Commercial developments in microalgal biotechnology. **J. Phycol.**, v. 35, p. 215-226, 1999.
- BARCLAY, W. R.; MEAGER, K.M.; ABRIL, J. R. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. **J Appl Phycol**, v. 6, p. 123–129, 1994.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae and men. In: **Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology**. Taylor and Francis Group LLC, CRC Press., p. 251–291, 2006.
- BECKER, E.W. **Microalgae in human and animal nutrition**. A. Richmond (Ed.), Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Science, Oxford, pp. 312–351, 2004.
- BELARBI, E. H.; MOLINA, E.; CHISTI, Y. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. **Enzyme Microb Technol**, v. 26, p. 516– 529, 2000.
- BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313-321, 1999.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae e a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v. 14, p. 557-577, 2010.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. **Biofuels from microalgae: towards meeting advanced fuel standards**. In: Lee JW, editor. Advanced biofuels and bioproducts. New York: Springer. p. 553–99, 2013.
- CAMACHO, F. G.; RODRÍGUEZ, J. J. G.; MIRÓN, A. S.; BELARBIA, E. H.; CHISTI, Y.; GRIMA, E. M. Photobioreactor scale-up for a shear-sensitive dinoflagellate microalga. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 936-944, 2011.
- CARVALHO, A. P.; MEIRELES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. **Biotechnol Progress**, v. 22, p. 1490–1506, 2006.
- CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends Biotechnol.** v. 14, p. 412- 426, 1996.
- CHEN, T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y. S. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 103–107, 2006.
- CHENG, Y.; ZHOU, W.; GAO, C.; LAN, K.; GAO, Y.; WU, Q. Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tuber by heterotrophic

microalgae *Chlorella protothecoides*. **Journal of Chemistry and Technology Biotechnology**, v. 84, p. 777-781, 2009.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F.J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnol.** v. 3, p. 21-34, 2004.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing**, v. 48, p. 1146–1151, 2009.

ESTEVEZ, F.A., in: Rio de Janeiro (Ed.), **Fundamentos de limnologia**, Internacional, 1988.

FRANCISCO, E. C.; FRANCO, T.T.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E. Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 37, p. 1497-1505, 2014.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; MORENO, J.; MANZANO, J. C.; FLORENCIO, F. J.; GUERRERO, M. G. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. **J. Biotechnol.**, v. 115, p. 81–90, 2005.

GEIDER, R. J.; OSBORNE, B. A. Respiration and microalgal growth: a review of the quantitative relationship between dark respiration and growth. **New Phytologist Trust**, v. 112, p. 327-341, 1989.

GRAHAM, L. E. & WILCOX, L. W. **Algae**. New Delhi: Prentice Hall, 640 p., 2000.

GRESSEL, J. Transgenics are imperative for biofuel crops. **Plant Science**, v. 174, p. 246–263, 2008.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as Source of Carotenoids. **Marine Drugs**, v. 9, p. 625-644, 2011.

HUPPE, H. C.; TURPIN, D. H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 45, p. 577-507, 1994.

JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; NETTO, F. M. Caracterização da fração protéica da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 482-488, 2006.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G.; QUEIROZ, M. I.; FRANCO, T. T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors, **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 894-900, 2010.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I.; PINTO, L. A. A. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 63-69, 2007.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; CHISTI, Y.; BENEMANN, J. R.; LEWIS, D. A matter of detail: assessing the true potential of microalgal biofuels. **Biotechnol Bioeng.**, v. 110, p. 2317–2322, 2013.

KLOK, A. J.; LAMERS, P. P.; MARTENS, D. E.; DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. H. Edible oils from microalgae: insights in TAG accumulation. *Trends in Biotechnology*, v. 32, p. 521–528, 2014.

LEBEAU, T.; ROBERT, J. M. Diatom cultivation and biotechnology relevant products: Part II. Current and putative products. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 60, p. 624–632, 2003.

LEE, Y. -K. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. **J. Appl. Phycol.**, v. 13, p. 307-315, 2001.

LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 98, p. 764-771, 2007.

LIANG, S.; XUEMING, L.; CHEN, F.; CHEN, Z. Current microalgal health food R&D activities in China. **Hydrobiologia**, v. 512, p. 45–48, 2004.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 606p., 2006.

MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIE'N FERNA'NDEZ, F.G.; ROBLES MEDINA, A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnol Adv.**, v. 20, p. 491– 515, 2003.

MORALES-SÁNCHEZ, D.; TINOCO-VALENCIA, R.; MARTINEZ, A. Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundandans* using glucose as a carbon source. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-12, 2013.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M.; MANETTI, A. G. S.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. **Biosystems Engineering**, v. 115, p. 195–202, 2013.

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S.; KUMAR, N. A.; SRIDHAR, S. KUMAR, N. A.; SRIDHAR, S.; RENGASAMY, R. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. **Crit Rev Microbiol**, v. 34, p. 77–88, 2008.

RATLEDGE C.; COHEN, Z. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? **Lipid Technology**, v. 20, p. 155-160, 2008.

RAVELONANDRO, P. H.; RATIANARIVO, D. H.; JOANNIS-CASSAN, C.; ISAMBERT, A.; RAHERIMANDIMBY, M. Improvement of the growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* from Toliara (Madagascar): effect of agitation, salinity and CO₂ addition. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 206-216, 2011.

ROSENBERG J. N.; OYLER, G. A.; WILKINSON, L.; BETENBAUGH M. J. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 430–436, 2008.

SANSAWA, H.; ENDO, H. Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 98, p. 437-444, 2004.

SCHÜGERL, K.; HUBBUCH, J. Integrated bioprocesses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 294–300, 2005.

SING, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. **Bioresour Technol**, v. 102, p. 10–16, 2011.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Review: Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.

STANKIEWICZ, A. I., MOULIJN, J. A. Process Intensification: Transforming Chemical Engineering. **Chemical Engineering Progress**, p. 22-34, 2000.

UMBLE, A. K.; KETCHUM, L. H. Jr. A strategy for coupling municipal wastewater treatment using the sequencing batch reactor with effluent nutrient recovery through aquaculture. **Wat. Sci. Tech.**, v. 35, p. 177 – 184. 1997.

WANG, B.; LAN, C.; HORSMAN, M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. **Biotechnol. Adv.**, v. 30, p. 904–912, 2012.

WEI, A. L.; ZHANG, X. W.; WEI, D.; CHEN, G.; WU, Q. Y.; YANG, S. -T. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1383–1389, 2009.

WEN, Z. -Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnol. Adv.** v. 21, p. 273-294, 2003.

WEN, Z. -Y.; CHEN, F. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. **Enzyme Microb. Technol.** v. 29, p. 341-347. 2001.

WIJFFELS, R. H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. **Trends Biotechnol**, v. 26, p. 26–31, 2008.

WRIGHT, P. C.; STEVENSON, C.; McEVOY, E.; BURGESS, J. G. Opportunities for marine bioprocess intensification using novel bioreactor design: frequency of barotolerance in microorganisms obtained from surface waters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 343–349, 1999.

WU, Z.; SHI, X. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. **Letters in Applied Microbiology, Cardiff**, v. 44, p. 13-18, 2007.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 499-507, 2006.

YAMAGUCHI, K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. **J. Appl. Phycol.**, v. 8, p. 487–502, 1997.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochem. Eng. J.** v. 6, p. 87- 102, 2000.

CAPÍTULO 3

ASSESSMENT OF ABSOLUTE AMOUNTS OF NUTRIENT IN HETEROTROPHIC
GROWTH OF *APHANOTHECE MICROSCOPICA NÄGELI*

ASSESSMENT OF ABSOLUTE AMOUNTS OF NUTRIENT IN HETEROTROPHIC GROWTH OF *APHANOTHECE MICROSCOPICA NÄGELI*

Abstract: The ability of microalgae to adapt their metabolism to varying culture conditions provides opportunities to modify, control and thereby maximise the formation of targeted compounds. Due to limited information about the use of different carbohydrates as carbon sources to support cyanobacterial heterotrophic metabolism, the objective of this work was to evaluate the absolute amounts of nutrient in heterotrophic growth of *Aphanothece microscopica Nägeli*. Aiming at the economic viability of the process were employed, cassava starch and corn starch as organic carbon sources and sodium nitrate as nitrogen source. An experimental design was conducted to determine different absolute amounts of carbon and nitrogen in a constant C/N ratio of 20. The results indicated that the C/N ratio of 5000/250 using cassava starch presented itself as the ideal condition of the process, resulting in a biomass productivity of 18.16 mg/L/ h and high conversion of organic carbon of 83.57% in a generation time of 14.25

Keywords: Cyanobacteria, starch, exogenous organic carbon

1. INTRODUCTION

Microalgae enables numerous uses for biotechnological industries, they can produce products with high value like pigments, carbohydrates, lipids, proteins and vitamins, that have application in feed supplements, cosmetic, health, food, chemical and pharmaceutical industries (SUALI AND SARBATLY, 2012). In addition these microorganisms can be applied in the bioenergy industry (ONCEL, 2013; MATA et al., 2010). Independent of destined application, biomass productivity of the process is the determining factor, once the majority of applications are associated with intracellular components of the biomass.

The availability of nutrients has been considered, since the first limnological studies, such as the variables that control the structure and biomass of phytoplankton communities and the seasonal succession of species (TILMAN et al., 1982). The hypothesis of the relative importance of nutritional reasons in relation to the absolute concentration of nutrients in water bodies has frequently been discussed by some authors. Reynolds (1999) reports that phytoplankton species are not able to select

the nutritional reasons that favor their growth, but use absolute concentrations that are diluted in medium. Droop (1973) and Rhee (1978) show that the phytoplankton species respond to existing nutritional proportions in the medium where they are and that each species has a great nutritional ratio for their own development. This ratio would be the minimum nutritional requirement that each species need to perform cell division.

The study of biological systems and microbial kinetic can help clarify the intracellular mechanisms to optimize the production of commercially important molecules. The metabolic pathways are regulated at several levels, intra and extracellular. The effect of changes in environmental conditions in cultures of many species of microalgae has been studied for a better understanding of its physiology and to answer specific questions with respect the growth of the cultures (SHI et al., 2000; MOHAN et al., 2015; RUANGSOMBOON, 2015). Macronutrients such as nitrogen, phosphorus and sulfur are the largest source of nutrients that influence the growth and cell division and in the primary growth phase (CHANDRA et al., 2014).

The culture medium is estimated at about 80% of the production costs can therefore make this an economically not viable process. A potential alternative in direction of lower production costs is the replacement of certain sources of organic carbon for low cost substrates such as starch and hydrolyzed cellulose solutions that can reduce costs by up to 40% (XU et al., 2006; LI et al., 2007; Wei et al., 2009). In addition, microalgae are fully adapted to this substrate, since polysaccharides such as glycogen and starch are the main endogenous reserves of oxidizable substrates of cyanobacteria, which serve to keep the microalgal metabolism when the culture medium provide scarcity of exogenous carbon source (FRANCISCO et al., 2014).

In this sense, the objective of this work was to evaluate the absolute amounts of nutrient in heterotrophic growth of *Aphanothece microscopica Nägeli*, using different starches aiming at the economic viability of the process.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Microorganism and culture medium

Unialgal cultures of *Aphanothece microscopica Nägeli* (RSMAN92) were originally isolated from the Patos Lagoon estuary, Rio Grande do Sul State, Brazil

(32°01'S–52°05'W). After purification, the stock cultures were maintained in test tubes containing synthetic medium BG11 (RIPPKA et al., 1979) solidified with agar (20gL⁻¹). Maintenance conditions were 25 ° C and constant light intensity 15µmolm⁻²s⁻¹.

2.2. Formulation of the culture media

The synthetic BG11 medium supplemented with cassava starch and corn starch as sources of exogenous organic carbon and sodium nitrate as nitrogen source, they were used as culture medium. Growing conditions studied were different absolute amounts of nutrients, in a C/N ratio of 20 fixed (10000/500, 5000/250, 2500/125, 1200/60 and 600/30). The different absolute amounts of nutrients (C/N=20) were obtained from the stoichiometry of the medium and a standard curve constructed with various concentrations of cassava starch and corn starch, expressed in terms of total organic carbon (TOC).

As responses were evaluated biomass productivity, the substrate consumption rate, the conversion ratio of substrate in cells and the efficiency of organic carbon conversion.

2.3. Cultures in bioreactors

Measurements were made in a bubble column bioreactor. The system was built of borosilicate glass and had an external diameter of 12.5 cm and a height of 16 cm, resulting in a height/diameter (h/D) ratio equal to 1.28 and a nominal working volume of 2.0 L. The dispersion system consisted of the reactor 2.5 cm diameter air diffuser located inside the bioreactor. The air flow was controlled by flow meter (KI key Instruments®, Trevose, PA, USA) and the inlet of air and outlet of gases were filtered through filtering units made up of polypropylene membrane with a pore diameter of 0.22 µm and total diameter of 50 mm (Millex FG®, Billerica-MA, USA). The cultivation conditions were: initial cell concentration 100mgL⁻¹, constant aeration 1,0 VVM (volume of air per volume of medium per minute), pH adjusted to 7.6, temperature 30°C and absence of ligh. It adopted a C / N ratio of 20 fixed, varying the absolute amounts between carbon and nitrogen by the addition of different concentrations of cassava starch and corn starch as carbon sources, and sodium

nitrate as nitrogen source for the reasons for 10000/500, 5000/250, 2500/125, 1200/60 and 600/30.

2.4. Kinetics parameters

Biomass data were used to calculate the biomass productivity [$P_X = (X_i - X_{i-1}) / (t_i - t_{i-1})^{-1}$, mg/L/day], the maximum specific growth rate [$\ln(X_i/X_0) = \mu_{\max} \cdot t$, 1/d], the generation time [$t_g = 0.693/\mu_{\max}$, d] and the lipid productivity [$P_L = P_X \cdot L_C$, mg/L/day], in which X_0 is the initial biomass concentration, X_i is the biomass concentration at the time t_i and X_{i-1} is the biomass concentration at the time t_{i-1} , t is the residence time, μ_{\max} is the maximum specific growth rate and L_C is the lipid content of the biomass (%). The different organic carbon sources were used to calculate the substrate consumption rate ($r_S = dS/dt$, mg/L/day), the conversion efficiency ($CE = (S_0 - S)/S_0$, %) and the substrate yield coefficient ($Y_{X/S} = dX/dS$, mg_{biomass}/mg_{substrate}), where S_0 is the initial organic carbon concentration (mg/L), S is the organic carbon concentration (mg/L) and t is the time (d).

2.5. Sampling and analytical methods

Samples were collected aseptically in a previously sterilized laminar flow hood. The tips used for sample collection were previously sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min. The cell biomass, the dynamics of pH and the consumption of organic carbon were monitored every 24 h during the growth phase of microorganism. The experiments were performed twice, and in duplicate for each substrate. Therefore, kinetic data refer to the mean value of four repetitions.

The pH values were determined by potentiometer (Mettler-Toledo, São Paulo-SP, Brazil). Cell biomass was determined gravimetrically, filtering a known volume of culture through a 0.45 µm membrane filter (Millex FG[®], Billerica-MA, USA), and drying at 60 °C for 24 h.

Measurements of total carbon were carried out on a carbon analyzer TOC-VCSN (Shimadzu, Kyoto, Japan) with a normal sensibility catalyst (platinum on 1/800" Alumina Pellets) to measure total carbon (TC) and inorganic carbon (IC), containing a unit for nitrogen analysis. Organic carbon (OC) was calculated by the difference between TC and IC. In the analysis of total carbon, 27 mL samples were carried to

the combustion tube at 680 °C, where the catalytic oxidization to CO₂ occurred. For the analysis of inorganic carbon, samples of 27 mL reacted with hydrochloric acid 2 M to convert all the inorganic carbon into CO₂. In both cases, the carbon dioxide was quantified by non-dispersive infrared absorption and the concentrations were calculated through analytical curves (peak area × concentration) previously constructed with standard solutions of potassium hydrogen phthalate for TC and sodium hydrogen carbonate for IC. For measurements of total nitrogen (TN) the sample containing nitrogen was carried to the combustion tube at 720°C. The oxidative pyrolysis caused the conversion of nitrogen in nitric oxide (NO). NO is oxidized in the presence of ozone to nitrogen dioxide (NO₂). During this chemical reaction energy is transformed into electromagnetic energy, detected by the detector.

At the end of the process, the biomass was separated from the culture medium by decantation, followed by centrifugation, drying and milling. The total lipid concentration of the biomass was determined gravimetrically by modified Bligh and Dyer method, using the ratio between methanol, chloroform and distilled water of 2:1:0.8 (v/v/v).

2.6. Statistical analysis

Analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$) were used to test the differences between the absolute quantities of nutrients. The analyses were performed using Statistica 7.0 software (StatSoft, Tulsa-OK, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Information on the specific exogenous carbon sources required for optimal metabolic performance is too scattered to reach a conclusion because of the dependency of the cyanobacteria species and cultivation conditions. There is a generic guidance, that the C/N ratio of 20 favors microbial performance, but according to the Liebig's law of the minimum, both the absolute amount of nutrient as the relative amount of nutrients in the medium are important for so that production is not limited to the nutrient present in a smaller proportion or availability (LIEBIG, 1862; DROOP, 1973). In this sense, Table 1 below shows the kinetic parameters of growth and substrate conversion factors in biomass for the different absolute amounts of carbon and nitrogen evaluate.

Table 1 Kinetic parameters obtained by varying the absolute amounts of carbon and nitrogen in the culture medium, the *Aphanothece microscopica Nageli* supplemented with cassava starch and corn starch

Cassava starch											
C/N	μ_{\max} (h ⁻¹)	TR (h)	tg (h)	X_{\max} (mg/L)	P_x (mg/L.h)	r_s (mg/L)	E-TN (%)	E-TOC (%)	$Y_{x/s}$ (mg/mg)	Lipid (%)	P_L (mg/L.h)
600/30	0.019 ^c	96 ^d	36.47 ^b	430 ^e	3.43 ^e	3.77 ^e	42.74 ^e	49.85 ^e	1.09 ^b	3.42 ^e	0.11 ^e
1200/60	0.031 ^b	120 ^c	22.00 ^c	1200 ^d	9.16 ^d	7.13 ^d	96.55 ^c	96.30 ^a	0.93 ^d	6.30 ^d	0.57 ^d
2500/125	0.020 ^c	144 ^b	33.97 ^b	2270 ^c	15.06 ^c	13.87 ^c	96.45 ^d	87.89 ^b	0.99 ^c	14.13 ^b	2.12 ^c
5000/250	0.048 ^a	240 ^a	14.25 ^d	4460 ^b	18.16 ^b	14.97 ^b	98.63 ^a	83.57 ^c	1.01 ^c	18.15 ^a	3.29 ^b
10000/500	0.013 ^d	120 ^c	52.50 ^a	6400 ^a	43.75 ^a	30.22 ^a	98.56 ^b	70.65 ^d	1.52 ^a	8.42 ^c	3.68 ^a
Corn starch											
600/30	0.014 ^{bc}	72 ^d	48.12 ^b	430 ^e	3.43 ^e	11.52 ^c	37.50 ^d	89.66 ^c	0.68 ^d	10.62 ^a	0.36 ^e
1200/60	0.035 ^a	120 ^b	19.30 ^d	1370 ^d	9.41 ^d	11.83 ^{bc}	92.12 ^a	93.38 ^b	0.88 ^c	5.05 ^c	0.47 ^d
2500/125	0.012 ^c	144 ^a	56.80 ^a	2000 ^c	13.19 ^c	12.22 ^{bc}	91.59 ^b	93.60 ^a	0.88 ^c	10.43 ^b	1.37 ^a
5000/250	0.018 ^b	96 ^c	38.50 ^c	2700 ^b	18.05 ^b	14.36 ^b	68.86 ^c	38.27 ^d	1.12 ^b	4.60 ^d	0.83 ^b
10000/500	0.036 ^a	144 ^a	18.93 ^e	4780 ^a	32.50 ^a	22.00 ^a	16.19 ^e	29.49 ^e	1.68 ^a	2.30 ^e	0.74 ^c

μ_{\max} maximum specific growth rate, TR residence time, tg generation time, X_{\max} maximum cell biomass, P_x biomass productivity, r_s average rate of substrate conversion, E-TN coefficient of conversion of nitrogen, E-TOC coefficient of conversion of carbon, $Y_{x/s}$ substrate yield coefficient, Lipid (%) lipid content, P_L lipid productivity.

From the data analysis, it is observed that the best results were obtained from cassava starch as source of organic carbon, in a C/N ratio of 5000/250, which showed a high cell density of 4460 mg/L, total lipid content of 18.15%, which resulted in a total lipid productivity of 3.29 mg/L.h with a high organic matter removal efficiency of 83.57% in a low time generation (14.25 h). These results show cassava starch as best source of organic carbon, once they showed cellular productivities greater than or equal to corn starch in all tested proportions. The variability in results between the respective substrates is a function of the amylose and amylopectin contents present in the starch structure. According Marcon et al. (2007) corn and cassava starches have 24% and 17% amylose, 76% and 83% amylopectin respectively. The presence of higher concentrations of amylopectin in the cassava starch favors the microalgal performance, since the endogenous reserves of these micro-organisms are constituted of the called cyanophycean starch, which serves to keep the microalgal metabolism when the culture medium provide scarcity of exogenous carbon source . In this sense, the cells are fully adapted to this substrate, and their use as exogenous carbon source is suitable for heterotrophic growth of cyanobacteria (FRANCISCO et al., 2014).

These results showed the importance of the absolute amount of nutrients once it promoted the increase of cellular and lipidic productivity of culture, however it is known that by maintaining the relative amount of nutrient, metabolism will provide differentiated bioproducts (LI et al., 2015). The C/N ratio should be oriented in function of bioproduct to be obtained once it the accumulation of lipids require limiting levels of nitrogen, while cell growth requires sufficient amounts of nitrogen and both need carbon source in adequate amounts (CHANDRA et al., 2015). Based on the results described above, is high the concentration of nitrogen supplied to the culture medium, higher productivity of the biomass will be obtained, but the provision of a carbon source to support the assimilation of inorganic nitrogen and subsequent cell growth is needed.

It is known that nitrogen composes up about 10% of the dry weight of cyanobacteria and is the most essential element required by the cell for synthesis of amino acids, proteins, nucleic acids, chlorophyll and other accessory pigments, such as phycobilins (SAHA et al., 2003). However, nitrogen and carbon metabolism are linked, since for the primary assimilation of inorganic nitrogen and subsequent synthesis of amino acids, the presence of carbon structures in the form of keto acids

and energy in form of ATP and NADPH are necessary, which are provided by the citric acid cycle (HUPPE AND TURPIN, 1994; FERNANDEZ AND GALVAN, 2007). Due to this interaction, different responses to the variation of the organic carbon may appear in cultures of microalgae as the inorganic nitrogen concentration is varied (PAGNANELLI et al., 2014).

According to Queiroz et al. (2013), microbial lipids are intracellular products and, therefore, the overall lipid yield is obtained by the amount of lipids of the cell, multiplied by the productivity in biomass, what makes biomass productivity a primary criterion in the obtaining of microbial lipids. Additionally Converti et al. (2009) macronutrients such as nitrogen, phosphorus and sulfur are the largest source of nutrients that influence growth and cell division in primary growth phase. But when the nitrogen source is depleted, cell growth stabilizes and the steady state is reached. At this stage, the stored carbohydrates change their path towards to the conversion of lipids.

The higher conversion coefficients organic matter in biomass was obtained in experiments with proportions of 10000/500 for the two evaluated starches. This result is due to the concentration and type of organic matter present in the culture medium which resulted in greater assimilation capacity with lower energy expenditure via heterotrophic metabolism. Glucose and polysaccharide reserve, as glycogen and starch, find their metabolic fate in the glycolytic pathway after suffering enzymatic transformations. The starch may be mobilized for use in glucose-1-phosphate into the same cell by means of a phosphorolytic reaction catalyzed by starch phosphorylase. The phosphorolytic degradation of starch is preferable to hydrolytic degradation, it produces a phosphorylated glucose (glucose-1-phosphate) which is then converted into glucose 6-phosphate without expenditure of cellular energy (ATP) required for the formation of glucose 6-phosphate from the free-glucose (WOOD, 1885; FRANCISCO et al., 2014). Conversion coefficients of organic matter in biomass generally have lower values than one, but values greater than one, obtained in the experiments are due to the resulting energy savings of phosphorolysis the substrate.

The ratio C/N 10000/500 using cassava starch as the carbon source resulted in a lower specific growth rate. Shi et al. (1999) when evaluated the influence of the initial concentration of glucose in biomass production by heterotrophic cultivation of *Chlorella protothecoides* found that the higher glucose concentrations tested resulted

in cell concentrations and lower specific growth rate. The authors suggest that these results may have been caused due to inhibition by the substrate. The solubilities in proportions above of 10000/500 were compromised, for this reason the results were not considered, it is not possible to prove the inhibition by excess of substrate.

Comparatively, in numerical values, Singhasuwan et al. (2015) evaluated the heterotrophic culture of *Chlorella* sp. in different ratios C/N, employing glucose and potassium nitrate as carbon and nitrogen sources, respectively. The best result of productivity in biomass was $0,68 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$, in a C/N ratio of 29/1, value lower than that obtained in this study ($1,05 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$). Wang et al. (2015) when assessing the heterotrophic culture of *Chlorella vulgaris* in swine wastewater diluted, obtained specific growth rate of $0,75 \text{ d}^{-1}$ compared to $1,15 \text{ d}^{-1}$ obtained in the experiment the C / N ratio of 5000/250 using cassava starch. The results obtained by these authors reinforce the idea that the control of C/N ratio, guides obtaining to desired bioproduct, not discarding however the importance of the absolute amount of nutrient.

These results are potentially attractive for the production of biomass per *Aphanothece microscopica Nägeli*, since this micro-organism are able to efficiently convert an organic carbon source abundantly available in the international market. The similar processes are usually conducted from the enzymatic hydrolysis of this substrate, resulting in additional unit operations, which will impact on operating costs of the production process (LU et al., 2011; WEI et al., 2009).

4. CONCLUSION

The performance of microalgae *Aphanothece microscopica Nägeli* from heterotrophic cultivation in different starches is optimized in C/N ratio to 5000/250 using cassava starch as a source of organic carbon. The cultivation in bioreactor discontinuously operated showed better performance both to the cellular productivity (4460 mg/L) as for the total lipid content (18.15%), once it reflected in an overall lipid yield 3.29 mg /L.h and organic matter removal efficiency of 83.57% in a low generation time (14.25 h).

The importance of absolute amounts of nutrients were evidenced us results, but the C/N ratio seems to be a key parameter whose influence on behavior in microalgal metabolism should be carefully analyzed to obtain valuable information on how to optimize and control the performance of microalgal biorreactors.

5. REFERENCES

- BLIGH, E. G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 37, p. 911–917, 1959.
- CHANDRA, R.; ARORA, S.; ROHIT, M. V.; MOHAN, S. V. Lipid metabolism in response to individual short chain fatty acids during mixotrophic mode of microalgal cultivation: Influence on biodiesel saturation and protein profile. **Bioresource Technol**, v. 188, p. 169–176, 2015.
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chem Eng Process**, v. 48, p. 61146–1151, 2009.
- DROOP, M. R. Some thoughts on nutrient limitation in algae. **J Phycol**, v. 9, p. 264-272, 1973.
- FERNANDEZ, E.; GALVAN, A. Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. **J Exp Bot**, v. 58, p. 2279–2287, 2007.
- FRANCISCO, E. C.; FRANCO, T. T.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E. Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 37, p. 1497-1505, 2014.
- HUPPE, H. C.; TURPIN, D. H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, v. 45, p. 577-507, 1994.
- LI, C.; YU, Y.; ZHANG, D.; LIU, J.; REN, N.; FENG, Y. Combined effects of carbon, phosphorus and nitrogen on lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. **J Chem Technol Biotechnol.**, v. 91, p. 680-684, 2015.
- LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnol. Bioeng**, v. 98, p. 764-771, 2007.
- LIEBIG, J. V. **Der Chemische Process der Ernährung der Vegetabilien.** Braunschweig, Germany: Friedrich Vieweg und Sohn. 625 p., 1862.
- LU, Y.; DING, Y.; WU, Q. Simultaneous saccharification of cassava starch and fermentation of algae for biodiesel production. **J Appl Phycol**, v. 23, p. 115-121, 2011.
- MARCON, M. J. A.; VIEIRA, G. C. N.; SIMAS, K. N.; SANTOS, K.; VIEIRA, M. A.; AMBONI, R. M. C.; AMANTE, E. R. Effect of the Improved Fermentation on Physicochemical Properties and Sensorial Acceptability of Sour Cassava Starch. **Braz Arch Biol Techn**, v. 50, p. 1073-1081, 2007.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renew sust energ rev**, v. 14, p. 217–232, 2010.

MOHAN, S. V.; ROHIT, M. V.; CHIRANJEEVI, P.; CHANDRA, R.; NAVANEETH, B. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. **Bioresource Technol**, v. 184, p. 169–178, 2015.

ONCEL, S. S. Microalgae for a macroenergy world. **Renew sust energ rev**, v. 26, p. 241–264, 2013.

PAGNANELLI, F.; ALTIMARI, P.; TRABUCCO, F.; TORO, L. Mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oculata*: interaction between glucose and nitrate. **Chem Technol Biotechnol**, v. 89, p. 652–661, 2014.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M.; MANETTI, A. G. S.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. **Biosyst Eng**, v. 15, p. 195–202, 2015.

REYNOLDS, C. S. **Phytoplankton assemblages in reservoirs**. In: Tundisi, J.G.; Straskraba, M. (Ed.). Theoretical reservoir ecology and its applications. São Carlos: International Institute of Ecology, 439-456, 1999.

RHEE, G. Y. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. **Limnol Oceanogr**, v. 23, p. 10-25, 1978.

RIPPKA, R.; DERUELES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **J Gen Microbiol**, v. 111, p. 1–61, 1979.

RUANGSOMBOON, S. Effects of different media and nitrogen sources and levels on growth and lipid of green microalga *Botryococcus braunii* KMITL and its biodiesel properties based on fatty acid composition. **Bioresource Technol**, v. 191, p. 377–384, 2015.

SAHA, S. K.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 45, p. 263-272, 2015.

SHI, X. M.; LIU, H. J.; ZHANG, X. W.; CHEN, F. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. **Process Bioc**, v. 34, p. 341–347, 1999.

SINGHASUWAN, S.; CHORIT, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; KOKKAEW, N.; CHISTI, Y. Carbon-to-nitrogen ratio affects the biomass composition and the fatty acid profile of heterotrophically grown *Chlorella* sp. TISTR 8990 for biodiesel production. **J Biotechnol.**, v. 216, p. 169-177, 2015.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renew Sust Energy Rev**, v. 16, p. 4316–4342, 2012.

TILMAN, D.; KILHAM, S. S.; KILHAM, P. Phytoplankton Community Ecology: The Role of Limiting Nutrients. **Annu Rev Ecol Systemat**, v. 13, p. 349-372, 1982.

WANG, Y.; GUO, W.; YEN, H-W.; HO, S-H.; LO, Y-C.; CHENG, C-L.; REN, N.; CHANG, J-S. Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. **Bioresource Technol**, v. 198, p. 619-625, 2015.

WEI, A. L.; ZHANG, X. W.; WEI, D.; CHEN, G.; WU, Q. Y.; YANG, S. T. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. **J Ind Microbiol Biot**, v. 36, p. 1383–1389, 2009.

WOOD, T. **The pentose phosphate pathway**. Academic Press Inc, Orlando, 1985.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **J Biotechnol**, v. 126, p. 499-507, 2006.

CAPÍTULO 4
BIODIESEL DE TERCEIRA GERAÇÃO A PARTIR DE MICROALGAS
CULTIVADAS EM BIORREATORES AGITADOS MECANICAMENTE

BIODIESEL DE TERCEIRA GERAÇÃO A PARTIR DE MICROALGAS CULTIVADAS EM BIORREATORES AGITADOS MECANICAMENTE

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de biodiesel de terceira geração a partir do cultivo heterotrófico, em amido de mandioca, da microalga *Aphanothece microscopica Nägeli* (RSMAN92) em biorreator heterotrófico agitado mecanicamente. O estudo concentrou-se no efeito de diferentes velocidades de agitação na composição da biomassa e na qualidade do biocombustível produzido. Os experimentos foram realizados em biorreator operando à temperatura de 30°C, pH de 7,5, a uma razão C/N de 5000/250, 100 mgL⁻¹ de inóculo, aeração contínua de 1 VVM (volume de ar por volume de cultura por minuto), ausência de luz e velocidades de agitação de 0, 100, 200 e 300 RPM. Os resultados indicam que a velocidade de agitação de 200 RPM apresentou-se como a melhor condição, pois resultou em eficientes produtividades celulares (36,27 mg/L.h), eficiência de remoção de carbono orgânico e nitrogênio (94,87 % e 84,40%, respectivamente) e produtividade lipídica (3,31 mg/L.h). A composição deste óleo é predominantemente saturada e monoinsaturada, adequada para a síntese de biodiesel (teor de éster de 76%, número de cetano de 64,36, índice de iodo de 70,38 g100gI₂⁻¹, grau de insaturação de 71%, índice de saponificação de 161,01, fator saturados de cadeia longa de 3,5%, ponto de entupimento do filtro a frio em -5,48 °C, ponto de névoa em 5,53 °C, equivalentes de posição alílica de 52, equivalentes de posição bis-alílicos de 19, estabilidade de oxidação de 14,38 h, calor de combustão de 30,70, viscosidade cinemática de 1,02 mm² s⁻¹ e densidade de 0,68 gcm⁻³).

Palavras-chave: razão C/N, *Aphanothece microscopica Nägeli*, composição de ácidos graxos, taxa de aeração

1. INTRODUÇÃO

O biodiesel é um biocombustível formado a partir da reação de esterificação de ácidos graxos ou transesterificação de glicerídeos, ambos presentes em óleos vegetais, gorduras animais e óleos e gorduras residuais. Atualmente, a principal biomassa utilizada para a obtenção de biodiesel é a soja (*Glycine* sp.), atendendo

mais de 80% da produção de biodiesel no Brasil. Entretanto, a soja não será capaz de auxiliar a produção desse biocombustível sem a destinação de áreas agricultáveis exclusivamente para esse fim, devido à baixa produtividade dessa biomassa (0,2-0,4 tonelada por hectare) (CARDOSO et al., 2011).

Biocombustíveis derivados de microalgas são alternativas promissoras como biocombustíveis de terceira geração devido a características únicas inerentes às algas, como a proliferação rápida, elevada acumulação de óleo, baixas taxas de consumo de água e viabilidade de crescer em terras não aráveis (HUANG et al., 2010). É importante ressaltar que o custo de produção de biodiesel a partir de microalga ainda é muito alto. Uma das alternativas para tornar o produto competitivo no mercado é estudar melhores condições de cultivo das microalgas, direcionando a rota metabólica para a produção de lipídios (CHISTI, 2007).

Culturas heterotróficas muitas vezes são mais produtivas que culturas fotoautotróficas e são facilmente expandidas em um biorreator de tanque agitado convencionalmente. Uma alta concentração de biomassa com um elevado teor de óleo triglicérido pode ser obtida em culturas heterotróficas (MIAO & WU, 2006; XU et al., 2006; HEREDIA-ARROYO et al., 2011; LU et al., 2011).

A formação de cada composto no interior da célula de microalga é regulada por complexos mecanismos metabólicos. Um fator crucial no cultivo heterotrófico, principalmente os que apresentam altas densidades, é o suprimento com oxigênio. Todas as microalgas heterotróficas são aeróbicas e quanto mais denso o cultivo, maior a demanda por oxigênio, o qual é utilizado durante o metabolismo energético (CHOJNACKA & MARQUEZ-ROCHA, 2004). Um fator que influencia o suprimento de oxigênio é a agitação adequada do meio de cultivo, pois favorece o intercâmbio gasoso entre células e o meio. Além disto, a agitação evita a sedimentação da biomassa e impede a formação de gradientes das condições de cultivo (CARVALHO et al., 2006). Tipicamente, a agitação do meio de cultivo é realizada por aeração, movimentação de pás ou bombeamento do líquido (BARSANTI & GUALTIERI, 2006), porém o estresse causado pela tensão de cisalhamento durante o processo pode dificultar o cultivo de células frágeis, como as microalgas filamentosas. Destaca-se que algumas cepas de microalgas são especialmente sensíveis a altas taxas de agitação (CAMACHO et al., 2011; RAVELONANDRO et al., 2011).

Neste sentido, o trabalho teve por objetivo avaliar a produção de biodiesel de terceira geração a partir do cultivo heterotrófico da microalga *Aphanothece microscopica Nägeli* (RSMAN92). O estudo concentrou-se no efeito de diferentes velocidades de agitação na composição da biomassa e na qualidade do biocombustível produzido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e meio de cultura

A cianobactéria utilizada foi *Aphanothece microscopica Nägeli* (RSMAN92) originalmente isolada a partir do estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil (32°01'S-52°05'W). Após purificação, as culturas estoque foram mantidas em tubos de ensaio contendo meio sintético BG11 (RIPPKA et al., 1979) solidificado com agar-agar (20gL⁻¹). As condições de manutenção foram 25°C e intensidade luminosa constante de 15µmolm⁻²s⁻¹.

2.2. Razão C/N e velocidade de agitação

A razão C/N 5000/250 (mg de amido de mandioca por mg de NaNO₃) e diferentes velocidades de agitação (0, 100, 200 e 300 RPM) foram empregados para investigar o efeito sobre a composição da biomassa e perfil de ácidos graxos em cultivo heterotrófico. As quantidades absolutas de nutrientes (C/N=20) foram obtidas a partir da estequiometria do meio e de uma curva padrão construída com diferentes concentrações do amido de mandioca, expressas em termos de carbono orgânico total (TOC).

2.3. Cultivo em biorreator

Os experimentos foram realizados em um reator agitado mecanicamente, modelo Tec-Bio-Flex (Tecnal, Piracicaba - SP, Brasil) com vaso de reação construído de vidro de borossilicato, com volume total de 4,5 L, parede simples com serpentina interna em aço inox 316L e manta siliconada para a termostatização do processo.

O sistema de agitação é um servo-motor com controle de 1-2000 RPM acoplado com sensor óptico de velocidade real com resolução de ± 1 RPM. O mancal e a haste de agitação são construídas em aço inox 316L, com retentor em viton, possui um impulsor do tipo Rushton. As condições de cultivos foram: concentração celular inicial de 100 mg L^{-1} , aeração constante de $1,0 \text{ VVM}$ (volume de ar por volume de meio por minuto), pH ajustado a 7,6, temperatura de 30°C e ausência de luminosidade. Adotou-se uma razão C/N fixa de 5000/250, variando-se as velocidades de agitação do sistema em 0, 100, 200 e 300 RPM.

2.4. Análise dos dados cinéticos

Os dados de concentração de biomassa foram utilizados na obtenção da velocidade máxima específica de crescimento ($\ln(X/X_0)=\mu_{\text{max}}.t$), em que X é a concentração celular final (mgL^{-1}), X_0 é a concentração celular inicial (mgL^{-1}), μ_{max} é a velocidade máxima específica de crescimento (h^{-1}) e t é o tempo de residência (h); no cálculo da produtividade de biomassa ($P_X=\mu.X$), em que μ é a velocidade instantânea de crescimento (h^{-1}) e X a concentração celular (mgL^{-1}). A concentração de carbono orgânico foi utilizada para calcular a taxa de consumo do substrato ($r_S=dS/dt$), em que S é a concentração de carbono orgânico (mgL^{-1}) e t é o tempo de residência (h); a eficiência na conversão do carbono orgânico ($EC=S_0-S/S_0$), em que S_0 é a concentração inicial de carbono orgânico (mgL^{-1}) e S é a concentração final de carbono orgânico (mgL^{-1}) e o coeficiente de conversão do substrato em células ($Y_{X/S}=dX/dS$). Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados cinéticos referem-se à média de quatro repetições.

2.5. Amostragem e métodos analíticos

As amostragens foram realizadas de forma asséptica a cada 24 horas durante a fase de crescimento do microrganismo. A dinâmica do pH para os cultivos em biorreator foi determinada através de um sensor polarográfico (Mettler Toledo, São Paulo – SP, Brasil) e a concentração celular através de gravimetria por meio da filtração de um volume conhecido em filtro $0,45\mu\text{m}$ de diâmetro.

As mensurações de carbono orgânico total (TOC) e nitrogênio total (TN) foram realizadas em um analisador de TOC-VCSH contendo uma unidade para

análise de TN (Shimadzu, Kyoto, Japão). Nas análises de carbono total, as amostras injetadas foram carreadas para um tubo de combustão a 680°C contendo platina suportada em alumina onde sofreram oxidação catalítica a CO₂, utilizando-se uma vazão de O₂ de 0,5 L.min⁻¹. Nas análises de carbono inorgânico, as amostras injetadas reagiram com ácido clorídrico 2 M e passaram por aquecimento a 200°C (vazão de O₂ de 0,5 L.min⁻¹), fazendo com que todo o carbono inorgânico fosse convertido a CO₂. O CO₂ produzido, em ambos os casos, foram quantificados por absorção no infravermelho não dispersivo e as concentrações foram calculadas por meio de análise de curvas (área do pico x concentração) previamente construídas com soluções padrão de biftalato de potássio para análise de carbono total, carbonato de sódio anidro para análise de carbono inorgânico, e nitrato de sódio para análise de nitrogênio total das amostras. Determinou-se o carbono total e inorgânico e, por diferença, calculou-se o valor do carbono orgânico total das amostras. Para a determinação de TN a amostra foi injetada em um forno a 720°C, onde sofreu combustão catalítica. A pirólise oxidativa causou a conversão de nitrogênio em óxido nítrico (NO). O NO é oxidado na presença de ozônio a dióxido de nitrogênio (NO₂). Durante esta reação a energia química é transformada em energia eletromagnética, a qual é detectada pelo detector.

Ao término do processo a biomassa foi separada do meio de cultivo por decantação, seguido de centrifugação, secagem e trituração. Para a extração de lipídeos totais da biomassa, utilizou-se o método de BLIGH & DYER (1959) modificado, levando-se em conta as proporções entre os solventes metanol, clorofórmio e água destilada (2:1:0.8). A saponificação foi realizada através de proporções entre metanol, ácido clorídrico e clorofórmio (10:1:1), seguida da esterificação do extrato lipídico, a partir da reação entre o hexano e o clorofórmio (4:1), através do método de HARTMAN & LAGO (1976) modificado. A análise qualitativa e quantitativa do perfil de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (CG) utilizando-se o cromatógrafo Varian 3400CX (Varian, Palo Alto, CA, EUA). Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção a partir de um padrão (Supelco, Louis, MO, EUA) e quantificados por normalização de área.

As propriedades de biodiesel (teor de ésteres, EC; número de cetano, NC; índice de iodo, II; grau de insaturação, GI; índice de saponificação, IS; fator saturados de cadeia longa, FSCL; ponto de entupimento do filtro a frio, PEFF; ponto

de névoa, PN; equivalente de posição alílico, EPA; equivalente de posição bis-alílico, EPBA; estabilidade oxidativa, EO; calor de combustão, CC; viscosidade cinemática, μ e densidade, ρ) foram determinados através do software *BiodieselAnalyzer*© 1.1 que estima as propriedades do biodiesel com base no perfil de ácidos graxos do óleo da matriz, através de um sistema de equações empíricas (TALEBI et al., 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cinética de crescimento

Tabela 1 Parâmetros cinéticos resultantes das diferentes velocidades de agitação no cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nägeli* em biorreator agitado mecanicamente

VA (RPM)	μ_{\max} (h ⁻¹)	TRH (h)	tg (h)	X_{\max} (mg/L)	P_x (mg/L.h)	r_s (mg/L.h)	E-TN (%)	E-TOC (%)	$Y_{x/s}$ (mg/mg)
0	0.0515 ^a	120 ^b	13.45 ^c	4500 ^b	36.66 ^c	31.19 ^d	81.20 ^c	86.46 ^c	0.98 ^b
100	0.0483 ^b	120 ^b	14.34 ^b	3810 ^d	30.91 ^d	34.41 ^b	83.18 ^b	92.01 ^b	0.78 ^d
200	0.0500 ^{ab}	144 ^a	14.90 ^a	4250 ^c	39.27 ^a	45.15 ^a	84.40 ^a	94.87 ^a	0.88 ^c
300	0.0515 ^a	120 ^b	13.45 ^c	4600 ^a	37.50 ^b	32.81 ^c	72.69 ^d	74.46 ^d	1.15 ^a

VA velocidade de agitação, μ_{\max} taxa de crescimento específico, TRH tempo de residência hidráulica, tg tempo de geração, X_{\max} concentração celular máxima, P_x produtividade celular, r_s taxa de consumo de substrato, E-TN eficiência de consumo de nitrogênio, E-TOC eficiência de consumo de carbono, $Y_{x/s}$ coeficiente de conversão de substrato em célula.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros cinéticos de produção de biomassa e consumo de substrato nas diferentes velocidades de agitação avaliadas. A análise dos resultados indica que a velocidade de agitação de 200 RPM apresentou os melhores resultados, tendo taxas de consumo de substrato de 45,15 mg/L.h e eficiências de consumo de nitrogênio e carbono orgânico de 84,40% e 94,87%, respectivamente, o que refletiu em produtividades celulares de 39,27 mg/L.h, evidenciando a interferência deste parâmetro na eficiência do processo. Um fator crucial para o cultivo heterotrófico, especialmente aqueles com elevadas densidades, é o fornecimento de oxigênio. Ele serve como fonte de alimentação exclusiva para a manutenção e a biossíntese, e fornece os blocos de construção de carbono para a biossíntese (GEIDER & OSBORNE, 1989; JACOB-LOPES et al., 2010).

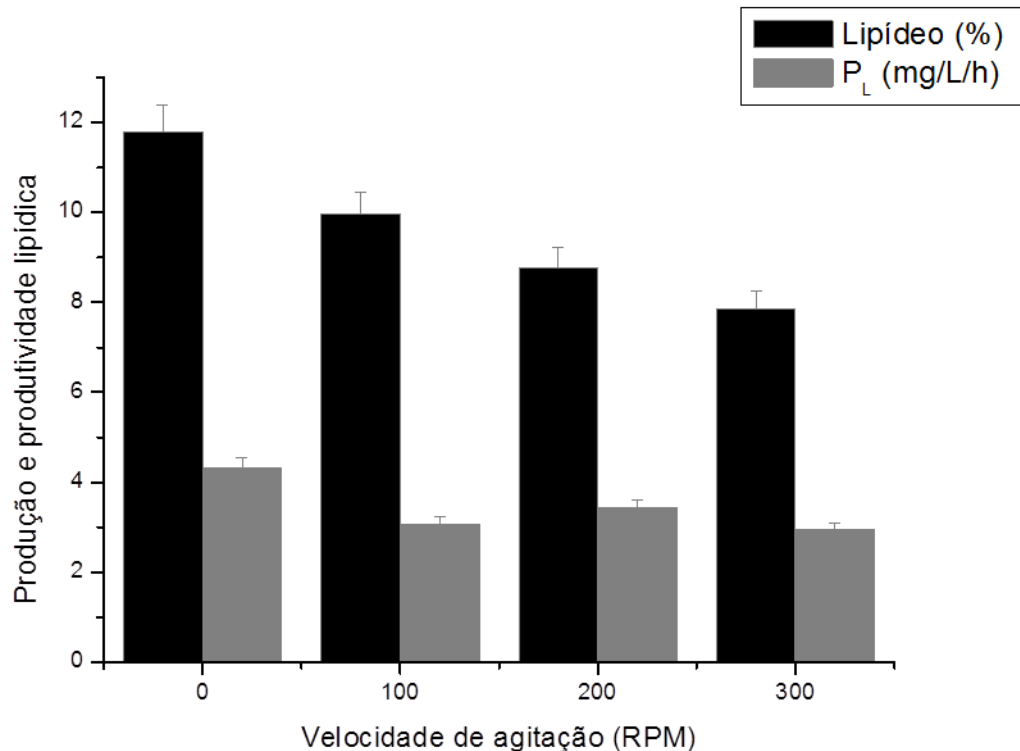
Se compararmos as produtividades celulares nas velocidades de agitação de 200 e 300 RPM, verifica-se um decréscimo nos valores obtidos, o que pode estar relacionado com o estresse devido ao aumento na velocidade de agitação. Geralmente, um aumento da velocidade de agitação irá melhorar a transferência de oxigênio do ar para uma cultura heterotrófica, porém o estresse causado pela tensão de cisalhamento durante o processo dificulta o cultivo de células filamentosas (CHISTI, 2010; CAMACHO et al., 2011; RAVELONANDRO et al., 2011).

Comparativamente, em valores numéricos, Singhasuwan et al. (2015) ao avaliarem velocidades de agitação de 100, 150 e 200 RPM no cultivo heterotrófico de *Chlorella* sp. obtiveram produtividade celular máxima de 28,3 mg/L/h em 200 RPM, valor cerca de 1,4 vezes inferior ao obtido nesta pesquisa. Os autores ainda relatam que a produtividade celular não sofreu interferência na gama de velocidades de agitação avaliadas.

Os resultados obtidos para o teor global de lipídeos e produtividade lipídica, segundo a Figura 1, indicam que o aumento da velocidade de agitação interferiu negativamente nesses parâmetros cinéticos. Embora um nível de turbulência seja necessário para o fornecimento suficiente de O₂ e remoção de CO₂, para impedir a formação de gradientes das condições de cultivo e evitar a sedimentação da biomassa, o fornecimento de uma turbulência excessiva pode danificar as células das microalgas (CHISTI, 2010; CARVALHO et al., 2006). Além disso, a turbulência excessiva aumenta o consumo de energia, podendo afetar negativamente a produtividade em óleo pela microalga (CHISTI, 2013).

Durante a respiração, o oxigênio é consumido com a produção paralela de CO₂, em que a taxa respiratória de substratos orgânicos está intimamente guiadas para o crescimento e divisão celular (PEREZ-GARCIA et al., 2011). A taxa de crescimento, por sua vez, afeta a quantidade de armazenamento de lípidos e outros compostos produzidos pela célula. Tipicamente, menos lípidos de armazenamento são produzidos durante o crescimento rápido (SINGHASUWAN et al., 2015).

Figura 1 Efeito da velocidade de agitação de 0, 100, 200 e 300 RPM no teor de lípidos e produtividade lipídica da biomassa de *Aphanothece microscopica Nägeli* cultivada heterotróficamente em uma razão C/N de 5000/250.



3.2. Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos do óleo microalgal é o principal fator que determina as características do biodiesel (KNOTHE, 2005). Conforme a Tabela 3, identificaram-se diferentes ácidos graxos, sendo o ácido oléico o majoritário, com 24.70%, 22.91%, 19.9% e 21.00% nas velocidades de agitação de 0, 100, 200 e 300 RPM respectivamente.

A análise dos resultados indica que os teores dos ácidos graxos C16-C18 encontrados em *Aphanothece microscopica Nägeli* em todos os tratamentos experimentais foram na faixa de 56,8-81,1% dos ácidos graxos totais. Geralmente o número de cetano, o calor de combustão e viscosidade cinemática do biodiesel aumentam com o aumento do comprimento da cadeia dos ácidos graxos, o que torna os ácidos graxos de cadeia longa (C16-C18) mais adequados para produção de biocombustíveis (FRANCISCO et al., 2010; MIAO et al., 2009).

Com o aumento da velocidade de agitação há uma tendência de aumento de ácidos graxos saturados e redução nos ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados. Knothe (2005) reporta que óleos com composição predominantemente saturada e monoinsaturada são os mais adequados para a síntese de biodiesel, pois produzem combustíveis com propriedades ideais ao uso em motores a diesel.

Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos do óleo extraído da biomassa

Metil ésteres (%)	0 RPM	100 RPM	200 RPM	300 RPM
C8:0	0.70	0.75	0.60	0.80
C10:0	0.00	0.36	0.30	0.40
C11:0	7.20	15.19	16.13	20.50
C12:0	5.90	2.84	4.30	4.00
C16:0	20.40	20.10	23.60	21.20
C16:1	19.80	9.49	8.10	4.00
C17:1	0.30	1.18	1.80	1.10
C18:0	2.40	3.48	3.50	5.40
C18:1n9c	24.70	22.91	19.90	21.00
C18:2n6c	3.10	1.83	2.00	2.20
C18:3n6t	6.50	3.91	2.10	0.50
C18:3n3	3.90	5.18	2.70	1.40
C20:2	0.60	2.37	2.70	4.60
C22:0	4.40	0.17	0.30	0.20
C22:2	10.00	10.10	11.50	12.30
C24:0	0.00	0.13	0.30	0.30
SFAs	27.00	25.00	25.00	30.00
MUFAs	43.00	31.00	31.00	25.00
PUFAs	17.00	20.00	20.00	15.00

SFAs: ácidos graxos saturados, MUFAs: ácidos graxos monoinsaturados, PUFAs: ácidos graxos polinsaturados

3.3. Propriedades do biodiesel

As características dos ácidos graxos que compõem os lipídios devem ser levadas em consideração porque as propriedades do biodiesel, assim como seu processo de obtenção, dependem fortemente deles. As propriedades mais influenciadas incluem a qualidade da ignição, as propriedades de fluxo a frio e estabilidade oxidativa. (CARDOSO et al., 2011).

Na Tabela 3 estão as propriedades do biodiesel de microalgas produzido nas diferentes velocidades de agitação. O grau de insaturação (GI) indica a estabilidade oxidativa do biodiesel e sua estabilidade de armazenagem a longo prazo. Um baixo grau de insaturação significa que o biodiesel é mais estável durante o armazenamento a longo prazo. Os valores de grau de insaturação encontrados nessa pesquisa variaram de 55% a 77%. Estes valores são substancialmente inferiores ao da soja, com 143,8%, principal biomassa utilizada para a obtenção de biodiesel (KNOTHE, 2005).

O índice de saponificação (IS) é uma medida do peso molecular médio (ou comprimento de cadeia) de todos os ácidos graxos presentes. Os valores de índice de saponificação de *Aphanothece microscopica Nägeli* em todos os tratamentos experimentais foram de 154,57-197,76.

O índice de iodo (II) determina o número de insaturações do biodiesel, estando relacionado com a sua estabilidade oxidativa: um biodiesel com índice de iodo elevado é menos estável oxidativamente do que um baixo índice de iodo (KNOTHE, 2009; SINHA et al., 2016). O valor máximo de índice de iodo permitido na norma de qualidade de biodiesel Europeia é de $120 \text{ gI}_2/100 \text{ g}^{-1}$. Os valores de índice de iodo de *Aphanothece microscopica Nägeli* estão no intervalo de 47,43-79,42 $\text{gI}_2/100 \text{ g}^{-1}$, os quais são inferiores ao padrão de qualidade e que os obtidos por Zhu et al. (2015) através de *Chlorella zofingiensis*.

O número de cetano (NC) é um excelente indicador da qualidade do biodiesel, pois está relacionado com o tempo de atraso de ignição e com a qualidade de combustão. Um maior número de cetano significa que o biodiesel tem melhores propriedades de ignição e proporciona um melhor desempenho ao motor (SINHA et al., 2016). Dois padrões mundiais de qualidade do biodiesel estipulam um número de cetano mínimo de 47 e 51 (ASTM, 2002, UNE-EN, 2003). Os números de cetano

desta microalga em todos experimentos estão na gama de 56,03-70,94, superiores aos exigidos nestes padrões. Além disso, o número de cetano de *Aphanothece microscopica Nägeli* foi maior do que em *B. braunii*, a 55,4 relatado por Ashokkumar et al. (2014).

Sob a baixa temperatura, o biodiesel tende a solidificar-se parcialmente ou a perder sua fluidez, levando à interrupção do fluxo do combustível e entupimento do sistema de filtração, ocasionando problemas na partida do motor (LÔBO & FERREIRA, 2009). A partir deste comportamento, três parâmetros foram elaborados para o controle de qualidade do biodiesel a baixas temperaturas: o ponto de névoa, o ponto de entupimento de filtro a frio e o ponto de fluidez. O ponto de névoa (PN) é a temperatura do combustível em um processo de resfriamento, onde se observa formação dos primeiros cristais, estando os resultados obtidos nesta pesquisa no intervalo de 5,53-6,05°C. O ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF) é a temperatura em que o combustível perde a filtrabilidade quando resfriado. Os valores de PEFF encontrados nessa pesquisa variaram de -2,03- -7,05°C. O ponto de fluidez (PF) é a temperatura em que o combustível perde sua fluidez quando sujeito a resfriamento sob determinadas condições de teste, estando os resultados desta pesquisa no intervalo de -0,82- 0,89. Estas informações são de grande importância para avaliar a aplicabilidade do combustível em regiões de clima frio. Quanto maior for o tamanho da cadeia e/ou o caráter saturado das moléculas do biodiesel, mais alto serão os valores destes parâmetros (LÔBO & FERREIRA, 2009).

O ponto de entupimento do filtro a frio (PEFF) está correlacionado com o Fator Saturados de Cadeia Longa (FSCL). Os óleos produzidos pela *Aphanothece microscopica Nägeli* neste estudo tinham valores de Fatores Saturados de Cadeia Longa na faixa de 3-4,60% e valores de entupimento do filtro a frio no intervalo de -2,03 à -7,05°C. Valores elevados de ponto de entupimento do filtro indicam piores propriedades do biodiesel a baixas temperaturas (MIAO & WU, 2006) significando uma maior tendência de que o biodiesel irá precipitar e obstruir o filtro (MITTELBAACH & REMSCHMIDT, 2004).

Óleos saturados produzem um biodiesel com alta estabilidade oxidativa e alto número de cetano, mas propriedades indesejáveis a baixas temperaturas, sendo susceptível ao estado sólido. Um biodiesel produzido a partir de biomassa que possui um elevado teor de ácidos graxos polinsaturados possui boas propriedades à baixa temperatura. Entretanto, esses ácidos graxos são muito susceptíveis à

oxidação, possuindo problemas de instabilidade quando armazenado por muito tempo (HU et al. 2008). Os tempos de estabilidade oxidativa do biodiesel produzido estão no intervalo de 41,90-11,66 h, superiores aos exigidos nos padrões mundiais de qualidade do biodiesel, que estipulam tempos de estabilidade oxidativa de no mínimo 3 ou 6 h (ASTM, 2002, UNE-EN, 2003).

A viscosidade do biodiesel tem influência no processo de queima na câmara de combustão do motor. Alta viscosidade ocasiona heterogeneidade na combustão do biodiesel, devido à diminuição da eficiência de atomização na câmara de combustão, ocasionando a deposição de resíduos nas partes internas do motor. A viscosidade aumenta com o comprimento da cadeia carbônica e com o grau de saturação (LÔBO & FERREIRA, 2009). Os valores de viscosidade cinemática encontrados nessa pesquisa variaram de 0,99-1,13 mm² s⁻¹. Estes valores são inferiores aos padrões de qualidade do biodiesel, os quais determinam viscosidade no intervalo de 1,9-6,0 mm² s⁻¹ e 3,5-5,0 mm² s⁻¹, para a norma Americana e Europeia, respectivamente (ASTM, 2002, UNE-EN, 2003).

Todos os parâmetros, com exceção do conteúdo de ésteres e viscosidade cinemática, estão em conformidade com os limites estabelecidos pelo os EUA, Europa e padrões brasileiros (ASTM, 2002; UNE-EN, 2003; ANP 255, 2003), e são comparáveis aos biodiesel de soja (KNOTHE, 2005). Os parâmetros em não-conformidade podem ser contornados pela adição de antioxidantes e aditivos ou a mistura de biodiesel com petrodiesel, melhorando as propriedades de qualidade do biocombustível (CHU et al, 2013). Em relação às microalgas, o biodiesel obtido a partir delas possui características físicas e químicas semelhantes aos de biomassas tradicionais como soja, pinhão-mansão, babaçu e óleo residual, por possuir lipídio com características similares a estas e do diesel (MIAO & WU 2006, XU et al. 2006, CHISTI, 2007, VIJAYARAGHAVAN & HEMANATHAN, 2009, CARDOSO et al., 2011).

Tabela 3 Propriedades do biodiesel de microalgas produzido nas diferentes velocidades de agitação e sua comparação com a soja e os padrões de qualidade utilizados nos EUA (ASTM 6751), Europa (EN 14214) e Brasil (ANP 255)

Propriedades	0 RPM	100 RPM	200 RPM	300 RPM	Soja ^a	ANP 255	ASTM 6751	EN 14214
EC (%)	87	76	76	70	96.9	-	-	min. 96.5
NC	56.03	64.36	64.36	70.94	49.00	min. 45	min. 47	min. 51
II (gI ₂ 100g ⁻¹)	79.42	70.38	70.38	47.43	128	-	-	max. 120
GI (%)	77.00	71.00	71.00	55.00	143.8	-	-	-
IS	197.76	161.01	161.01	154.57	-	-	-	-
FSCL (%)	3.00	3.50	3.50	4.60	1.6	-	-	-
PEFF (°C)	-7.05	-5.48	-5.48	-2.03	-5.0	max. 19	-	-
PN (°C)	5.53	5.53	5.53	6.05	-	-	-	-
EPA	54.00	52.00	52.00	39.00	-	-	-	-
EPBA	23.00	19.00	19.00	4.00	-	-	-	-
EO (h)	11.66	14.38	14.38	41.90	1.3	-	min. 3	min. 6
CC	35.98	30.70	30.70	29.11	-	-	-	-
μ (mm ² s ⁻¹)	1.13	1.03	1.02	0.99	4.2	-	1.9-6.0	3.5-5.0
ρ (g cm ⁻³)	0.81	0.68	0.68	0.65	-	-	-	-
PF	-0,82	-0,82	0,89	-0.25	-	-	-	-

EC: conteúdo de ésteres, NC: número de cetanos, II: índice de iodo, GI: grau de insaturação, IS: índice de saponificação, FSCL: fator saturado de cadeia longa, PEFF: ponto de entupimento do filtro a frio, PN: ponto de névoa, EPA: equivalente de posição alílico, EPBA: equivalente de posição bis-alílico, EO: estabilidade oxidativa, CC: calor de combustão μ: viscosidade cinemática, ρ: densidade cinemática, PF: ponto de fluidez.

^aKnothe (2005)

4. CONCLUSÃO

O desempenho da *Aphanothece microscopica Nägeli* no cultivo heterotrófico em diferentes velocidades de agitação é otimizado em 200 RPM. O cultivo apresentou eficientes remoções de carbono (94,87 %) e nitrogênio (84,40 %) o que refletiu em melhores desempenho de produtividade celular (36,27 mg/L.h) e produtividade lipídica (3,31 mg/L.h).

A velocidade de agitação é um parâmetro importante no cultivo heterotrófico, uma vez que influência no metabolismo energético e, em excesso ocasiona uma redução do desempenho devido ao estresse.

5. REFERÊNCIAS

- American Society for Testing and Materials [ASTM 6751]. 2002. Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Distillate Fuels. Available at: <http://www.astm.org/> [Accessed Jan 12, 2016].
- ASHOKKUMAR, V.; AGILA, E.; SIVAKUMAR, P.; SALAM, Z.; RENGASAMY, R.; ANI, F.N. Optimization and characterization of biodiesel production from microalgae *Botryococcus* grown at semi-continuous system. **Energy Convers. Manage.**, v. 88, p. 936–946, 2014.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae and men. In: **Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology**. Taylor and Francis Group LLC, CRC Press., p. 251–291, 2006.
- BLIGH, E. G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 37, p. 911–917, 1959.
- CAMACHO, F. G.; RODRÍGUEZ, J. J. G.; MIRÓN, A. S.; BELARBIA, E. H.; CHISTI, Y.; GRIMA, E. M. Photobioreactor scale-up for a shear-sensitive dinoflagellate microalga. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 936–944, 2011.
- CARDOSO, A. S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **R. bras. Bioci.**, v. 9, n. 4, p. 542–549, 2011.
- CARVALHO, A. P.; MEIRELES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. **Biotechnol Progress**, v. 22, p. 1490–1506, 2006.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, p. 294–306, 2007.
- CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology**, v. 167, p. 201–214, 2013.
- CHISTI, Y. Fuels from microalgae. **Biofuels**, v. 1, 2010.
- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F.J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnol.** v. 3, p. 21–34, 2004.
- CHU, F. F.; CHU, P. N.; CAI, P.J.; LI, W. W.; LAM, P. K. S.; ZENG, R. J. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. **Bioresour Technol.**, v. 134, p. 341–346, 2013.
- European Standard [UNE-EN 14214]. Automotive Fuels – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engine. Requirements and Test Methods. Available at: <http://www.biofuelsystems.com/> [Accessed Jan 12, 2016].
- FRANCISCO, E. C.; NEVES, D. B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T.T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 85, p. 395–403, 2010.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. A rapid determination of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab Praticce**, v. 22, p. 475, 1976.

HEREDIA-ARROYO, T., WEI, W., RUAN, R., HU, B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass Bioenergy**, v. 35, p. 2245-2253, 2011.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant J.** v. 54, p. 621–639, 2008.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G.; QUEIROZ, M. I.; FRANCO, T. T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors, **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 894-900, 2010.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059-1070, 2005.

KNOTHE, G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. **Energy Environ.**, v. 2, p. 759–766, 2009.

LOBÔ, I. P.; FERREIRA, S. L. C. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Quim. Nova**, v. 32, p. 1596-1608, 2009.

LU, Y.; DING, Y.; WU, Q. Simultaneous saccharification of cassava starch and fermentation of algae for biodiesel production. **Journal Applied Phycology**, v. 23, p. 115-121, 2011.

MIAO, X. L.; LI, R.X.; YAO, H.Y. Effective acid-catalyzed transesterification for biodiesel production. **Energy Convers. Manage**, v. 50, p. 2680–2684, 2009.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v.97, p. 841-846, 2006.

MITTELBACH, M.; REMSCHMIDT, C. **Biodiesel: the comprehensive handbook**. Martin Mittelbach, 2004.

OSBORNE, B. A.; GEIDER, R. J. Problems in the assessment of the package effect in five small phytoplankters. **Marine Biology**, v. 100, p. 151-159, 1989.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011.

RAVELONANDRO, P. H.; RATIANARIVO, D. H.; JOANNIS-CASSAN, C.; ISAMBERT, A.; RAHERIMANDIMBY, M. Improvement of the growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* from Toliara (Madagascar): effect of agitation, salinity and CO₂ addition. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 206-216, 2011.

RIPPKA, R.; DERUELES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **J Gen Microbiol**, v. 111, p. 1–61, 1979.

SINGHASUWAN, S.; CHORIT, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; KOKKAEW, N.; CHISTI, Y. Carbon-to-nitrogen ratio affects the biomass composition and the fatty acid profile of heterotrophically grown *Chlorella* sp. TISTR 8990 for biodiesel production. **Journal of Biotechnology**, v. 216, p.169–177, 2015.

SINHA, S. K.; GUPTA, A.; BHARALEE, R. Production of biodiesel from freshwater microalgae and evaluation of fuel properties based on fatty acid methyl ester profile. **Biofuels**, v. 7, p. 2-17, 2016.

TALEBI, A. F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. *BiodieselAnalyzer*© : a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, v. 2, p. 55-57, 2014.

VIJAYARAGHAVAN, K.; HEMANATHAN, K. Biodiesel production from freshwater algae. *Energy Fuels*, v. 23, p. 5448-5453, 2009.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 499–507, 2006.

ZHU, S.; WANG, Y.; SHANG, C.; WANG, Z.; XU, J.; YUAN, Z. Characterization of lipid and fatty acids composition of *Chlorella zofingiensis* in response to nitrogen starvation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, p. 205-209, 2015.

CAPÍTULO 5

1. CONCLUSÃO GERAL

A cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* apresentou capacidade de se desenvolver a partir do emprego de diferentes amidos. Entre os carboidratos estudados, o amido de mandioca apresentou maior eficiência na produção de biomassa e bioprodutos intracelulares.

O estudo empregando diferentes quantidades absolutas de nutrientes demonstrou melhor eficiência do cultivo da *Aphanothece microscopica Nägeli* em uma razão C/N de 5000/250 empregando amido de mandioca como substrato.

A velocidade de agitação de 200 RPM apresentou melhor desempenho no crescimento celular e produtividade lipídica, evidenciando a interferência deste parâmetro na eficiência do processo.

A partir da análise dos bioprodutos de natureza intracelular, verifica-se a viabilidade do emprego de substratos de baixo custo, como o amido de mandioca, na obtenção de biomoléculas e produção de biocombustíveis a partir do cultivo heterotrófico da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli*.