



ÉRIKA CRISTINA FRANCISCO

**CULTIVO HETEROTRÓFICO DA CIANOBACTÉRIA
PHORMIDIUM SP. EMPREGANDO DIFERENTES
CARBOIDRATOS E MANIPUEIRA COMO FONTE DE
CARBONO ORGÂNICO**

CAMPINAS, 2014.



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA – FEQ

Departamento de Engenharia de Processos - DEPro

ÉRIKA CRISTINA FRANCISCO

**CULTIVO HETEROTRÓFICO DA CIANOBACTÉRIA *PHORMIDIUM* SP.
EMPREGANDO DIFERENTES CARBOIDRATOS E MANIPUEIRA COMO
FONTE DE CARBONO ORGÂNICO**

Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Engenharia
Química da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em
Engenharia Química.

Orientador: Prof^a. Dr^a. TELMA TEIXEIRA FRANCO

Co-orientador: Prof. Dr. EDUARDO JACOB LOPES

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ÉRIKA CRISTINA FRANCISCO,
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. TELMA TEIXEIRA FRANCO.

Prof. Dr. Telma Teixeira Franco

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva – CRB 8/5974

F847c Francisco, Erika Cristina, 1981-
Cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. empregando diferentes carboidratos e manipueira como fonte de carbono orgânico / Erika Cristina Francisco. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Telma Teixeira Franco.
Coorientador: Eduardo Jacob-Lopes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Cianobactéria. 2. Carboidratos. 3. Manipueira. 4. Efluentes. I. Franco, Telma Teixeira, 1957-. II. Jacob-Lopes, Eduardo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Heterotrophic culture of cyanobacteria *Phormidium* sp. employing different carbohydrates and cassava wastewater as organic carbon source.

Palavras-chave em inglês:

Cyanobacterium

Carbohydrates

Cassava wastewater

Effluent

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Telma Teixeira Franco [Orientador]

Marli de Fátima Fiore

Ranulfo Monte Alegre

Reinaldo Gaspar Bastos

Jaciane Lutz Ienczak

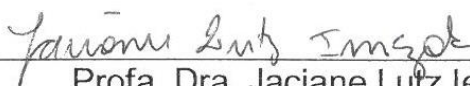
Data de defesa: 14-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

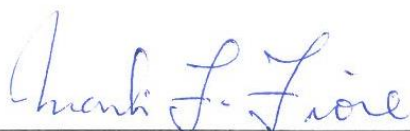
Dissertação de Mestrado ou Tese de Doutorado defendida por Érika Cristina Francisco e aprovada em 14 de fevereiro de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dra. Telma Teixeira Franco (orientadora)



Prof. Dra. Jaciane Lutz Ienczak (titular)



Prof. Dr. Marli de Fátima Fiore (titular)



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre (titular)



Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos (titular)

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a produção de biomassa e o acúmulo lipídico da cianobactéria *Phormidium* sp. a partir do cultivo heterotrófico com diferentes fontes de carbono orgânico, estudar diferentes estratégias de cultivo empregando a manipueira (água residual do processo para obtenção da farinha de mandioca) e avaliar o acúmulo lipídico a partir de diferentes fontes de nitrogênio. Primeiramente avaliou-se a capacidade da cianobactéria *Phormidium* sp. em se desenvolver a partir de 15 diferentes fontes de carbono orgânico exógeno. 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. Em um segundo momento, foi realizada a intensificação do processo de produção de biomassa a partir do amido de mandioca empregando-se um planejamento experimental. Os resultados indicaram que relação C/N de 68 e temperatura de 30°C são as condições operacionais ideais. A extrapolação do cultivo em Erlenmeyers para as operações em batelada e batelada com alimentação descontínua em biorreatores resultou em produtividades de biomassa de 50,72 mg/L.h e 42,13 mg/L.h, respectivamente. A terceira etapa do projeto contemplou o estudo do cultivo heterotrófico da cianobactéria empregando diferentes modos de cultivo utilizando manipueira como substrato, inicialmente através de diferentes concentrações (v/v) de manipueira em água (5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100%). Os resultados demonstraram que a melhor concentração da manipueira foi a de 60% (v/v). Em seguida, iniciou-se cultivos em biorreator, nos modos de batelada (Sistema A) e batelada com alimentação descontínua, empregando-se manipueira como meio de cultivo e diferentes soluções de alimentação. No primeiro sistema alimentado (Sistema B), empregou-se uma solução de amido de mandioca concentrado, e no segundo (Sistema C), o biorreator foi alimentado com manipueira não diluída. As alimentações foram efetuadas assim que a concentração de DQO no biorreator atingisse uma concentração de 6000mg/L. A extrapolação para cultivos em biorreator resultou em maiores produtividades em biomassa (53,12mg/L.h) e lipídica (7,45mg/L.h) sob batelada (sistema A). A última etapa do projeto contemplou o estudo de diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura, nitrato de sódio, nitrito de sódio, molibdato de amônio e ureia) no cultivo

heterotrófico da *Phormidium* sp. empregando amido de mandioca como fonte de carbono orgânico. A partir dos resultados obtidos selecionou-se o nitrato de sódio sob razão C/N de 60 como a fonte com maior potencial na produção de lipídeos, resultando na quantidade de lipídeos, produtividades lipídica e de biomassa de 20,58%, 7,62mg/L.h e 37,02mg/L.h, respectivamente. O processo de depleção do nitrato de sódio resultou em um aumento na quantidade de lipídeos (25,07%) e na produtividade lipídica (10,47mg/L.h).

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the production of biomass and lipid accumulation of cyanobacteria *Phormidium* sp. from heterotrophic cultivation with different sources of organic carbon, study different strategies of cultures employing cassava wastewater and analyse the lipid accumulation from different nitrogen sources. First we assessed the ability of the cyanobacterium *Phormidium* sp. to grow in 15 different exogenous sources of organic carbon. Results indicated that the cassava starch and maltodextrin as those with the highest potential for exploitation for the production of biomass and lipids. In a second step, the increase in biomass production process was made from cassava starch employing an experimental design. The results indicated that the C/N of 68 and temperature of 30°C are the optimal operating conditions. Extrapolation of cultivation in flasks for batch and batch with fed discontinuous operations in bioreactors resulted in biomass productivity of 50.72 mg/L.h and 42.13mg/L.h, respectively. The third stage of the project involved the study of the heterotrophic system of cyanobacteria using different modes of cultivation using cassava wastewater as substrate, initially through different concentrations (v/v) of wastewater in water (5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100%). The results showed that the best concentration of cassava was 60%. Then, in a bioreactor cultivation was started in batch mode (System A), and batch with discontinuous feeds, using the culture medium as wastewater and different feed solutions. In the first feed system (System B) used a concentrated solution of cassava starch, and in second (System C), the bioreactor was fed with undiluted wastewater. The feeds were made so that the concentration of COD in the bioreactor to achieve a concentration of 6000mg/L. The extrapolation to cultivations in bioreactor resulted in productivity of biomass (53.12 mg/L.h) and lipid (7.45 mg/L.h) under simple batch (System A). The last stage of the project involved the study of different nitrogen sources (ammonium molybdate, sodium nitrate, sodium nitrite, urea and yeast extract) in heterotrophic cultures of *Phormidium* sp. using cassava starch as a source of organic carbon. From the results obtained, we selected sodium nitrate under C/N ratio of 60 as the source with the highest potential in the production of lipids, resulting in the amount of lipids, productivity of lipid and biomass of 20.58%, 7.62 mg/L.h and 37.02 mg/L.h,

respectively. The process of depletion of sodium nitrate resulted in an increase in the amount of lipids (25.07%) and the lipid productively (10.47mg/L.h).

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Cianobactérias	4
3.2 Metabolismo heterotrófico	6
3.3 Sistemas operacionais	8
3.4 Efluentes agroindustriais	9
3.5 Emprego de cianobactérias no tratamento de efluentes.....	12
3.6 A influência do nitrogênio no metabolismo de cianobactérias.....	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO II.....	23
Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria	24
CAPÍTULO III.....	43
Produção de biodiesel de 3ª geração a partir de cianobactéria.....	44
Biodiesel production of third generation from cyanobacteria	44
Otimização do processo – frascos Erlenmeyers.....	49
CAPÍTULO IV	60
Heterotrophic cultivation of cyanobacteria: The process intensification of bulk oil production....	61
CAPÍTULO V	77
Evaluation of different nitrogen sources in the production of oils from <i>Phormidium</i> sp. in heterotrophic systems	78
CAPÍTULO VI	90
1 CONCLUSÕES GERAIS	90
2 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	91
CAPÍTULO VII	92
Anexo 1.....	92

CULTIVO DE <i>PHORMIDIUM</i> SP. A PARTIR DE FONTES DE CARBONO ORGÂNICO	92
Anexo 2.....	93
UTILIZAÇÃO DA MANIPUEIRA EM CULTIVOS MICROALGAIS	93
Anexo 3.....	94
ASSESSING THE POTENTIAL OF DISACCHARIDES AS EXOGENOUS CARBON SOURCE IN CULTIVATION OF CYANOBACTERIA.....	94
Anexo 4.....	95
CULTIVATION OF CYANOBACTERIA <i>PHORMIDIUM</i> SP. IN CASSAVA WASTEWATER.....	95
Anexo 5.....	96
ASSESSING THE POTENTIAL OF EXOGENOUS ORGANIC CARBON SOURCES IN CULTIVATION OF CYANOBACTERIA	96
Anexo 6.....	97
PRODUCTION OF HIGH CELL DENSITY OF CYANOBACTERIUM <i>PHORMIDIUM</i> SP. USING CASSAVA WASTEWATER	97
Anexo 7.....	98
OPTIMIZATION OF HETEROTROPHIC CULTIVATION OF <i>PHORMIDIUM</i> SP. FOR BIOMASS PRODUCTION.....	98
Anexo 8.....	99
CULTIVO HETEROTRÓFICO DA CIANOBACTÉRIA <i>PHORMIDIUM</i> SP. SOB DIFERENTES TAXAS DE AERAÇÃO.....	99
Anexo 9.....	100
OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA <i>PHORMIDIUM</i> SP. EM SISTEMAS HETEROTRÓFICOS	100
Anexo 10.....	101
OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO HETEROTRÓFICO DA CIANOBACTÉRIA <i>PHORMIDIUM</i> SP. EMPREGANDO AMIDO DE MANDIOCA COMO FONTE DE CARBONO ORGÂNICO.....	101
Anexo 11.....	102
REUTILIZAÇÃO DE EFLUENTE AGROINDUSTRIAL NO CULTIVO HETEROTRÓFICO DA CIANOBACTÉRIA <i>PHORMIDIUM</i> SP.....	102

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus pais Eunice Silva Francisco e Venicio Francisco que me apoiaram incondicionalmente durante todos os anos de pós-graduação, e enfrentaram comigo todas as dificuldades que apareceram pelo caminho. Também dedico este trabalho à minha tia Idinêis Silva Mozaquio (in memoriam) que sempre me incentivou nos estudos e ainda hoje continua me iluminando.

Dedico ainda esta tese a dois anjos, Caroline Simões Corte Real e Matheus Rafael Raschen (in memoriam), que durante o período de convivência sempre irradiaram meus dias com alegria, carinho e curiosidade pelo meu trabalho no laboratório na Universidade Federal de Santa Maria. Acredito que aonde quer que estejam sempre nos transmitirão esperança e alegria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Deus que me deu força para seguir meu caminho e aos meus pais por me incentivarem e lutarem para que eu chegasse aonde cheguei.

Ao meu coorientador, prof. Dr. Eduardo Jacob Lopes, que juntamente com a profa. Leila Z. Queiroz, abriu as portas de seu laboratório para me receber e desenvolver todos os trabalhos que contemplam a tese de doutorado. Pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos e pela amizade.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em particular aos professores do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos pela recepção e acesso aos laboratórios. À equipe do laboratório 111, Daniele, Andriele, Mariana, Alberto, Aline, Tiago, Aiana, Karem, Melissa, Tatiele, Stefania, Cristina e Ihana pelo auxílio nos trabalhos e amizade.

Agradeço à minha orientadora Telma Teixeira Franco e à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), pela oportunidade de desenvolver meu trabalho e afim de obter o título de Doutora pela Faculdade de Engenharia Química. Aos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefino Produtos de Origem Renovável (LEBBPOR), Bianca, Vinicius, Michele, Andréia, Annamaria, Talita e Edson, pela amizade e apoio mesmo estando distante.

À todos meus amigos de Limeira, Campinas e em especial às amigas de Santa Maria, Marina Copetti, Marina Santos, Caroline Souza e Carina Vollmer que me acompanharam durante os anos longe de casa e se tornaram parte da minha família.

EPÍGRAFE

“Todo efeito tem uma causa. Todo efeito inteligente tem uma causa inteligente. O poder da causa inteligente está na razão da grandeza do efeito.”
Allan Kardec

ÍNDICE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura: 1 Produção mundial de mandioca no ano de 2011 (FAO, 2011).11

Figura: 2 produção de commodities no Brasil no ano de 2011 (FAO, 2011).....12

CAPÍTULO II

Figure 1 Dynamic of pH (open circle) and consumption rate of arabinose (closed circle) vs. time (main figure) and cell growth profile (secondary figure).34

Figure 2 Dynamic of pH (open circle) and consumption rate of maltodextrin (closed circle) vs. time (main figure) and cell growth profile (secondary figure).....35

Figure 3 Cluster dendograms for productivity of biomass (P_x), substrate consumption rate (r_s), conversion factor substrate in cells ($Y_{x/s}$) and lipid productivity (P_L).....36

CAPÍTULO III

Figura 1: Diagramas de contorno para as variáveis produtividade de biomassa (A), taxa de consumo do substrato (B) e coeficiente de conversão do substrato em células (C).51

Figura 2: Crescimento celular e consumo da fonte de carbono orgânico (DQO) em batelada alimentada (círculo aberto: concentração de biomassa, círculo fechado: concentração do amido de mandioca).54

CAPÍTULO IV

Fig. 2: Cell growth and organic carbon consumption by chemical oxygen demand (COD) curve in System A.....68

Fig. 3: Cell growth and organic carbon consumption by chemical oxygen demand (COD) curve in System B (open circle: biomass concentration, closed circle: COD).69

Fig. 4: Cell growth and organic carbon consumption by chemical oxygen demand (COD) curve in System C (open circle: biomass concentration, closed circle: COD).70

CAPÍTULO V

Figure: 1 Lipid productivity for different nitrogen source and C/N ratio.84

Figure: 2 Cell growth, organic carbon consumption by chemical oxygen demand (COD) and lipid production curve in nitrate sodium source and C/N 60 (open circle: biomass concentration, closed circle: lipid, open square: organic carbon).86

ÍNDICE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1 Kinetic parameters for different carbohydrates.	30
Table 2 Fatty acid profiles.	33

CAPÍTULO III

Tabela 1: Valores das variáveis independentes para os diferentes níveis do delineamento experimental e concentrações de amido de mandioca utilizados.	47
Tabela 2: Matriz codificada do efeito da temperatura e razão C/N para a produtividade de biomassa (P_x), taxa de consumo do substrato (r_s) e coeficiente de conversão do substrato em células ($Y_{x/s}$).....	50
Tabela 3: Parâmetros cinéticos resultantes dos cultivos em biorreator e propriedades do biodiesel.	53
Tabela 4: Coeficientes do modelo estimados por regressão linear para as variáveis estudadas.....	56
Tabela 5: Análise de variância para o ajuste do modelo.	57

CAPÍTULO IV

Tab. 1: Average composition of wastewater from cassava industry.	64
Tab. 2: Kinetics parameters for different concentrations of cassava wastewater.	67
Tab. 3: Kinetic parameters for different operating systems.	70
Tab. 4: Economic aspects of substrates in different cultivation strategies.	72

CAPÍTULO V

Table: 1 different carbon/nitrogen (C/N) ratio and sources of nitrogen concentrations.	81
Table: 2 Kinetic parameters for different nitrogen source and C/N ratio.	83
Table: 3 Kinetic parameters for sodium nitrate depletion and biodiesel properties.	85
Table: 4 Fatty acid profile employing sodium nitrate in a C/N ratio of 60 and depletion of nitrogen.....	87

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias constituem um grande grupo de micro-organismos unicelulares ou não com ampla versatilidade metabólica e pouca exploração. O termo cianobactéria é empregado à espécies foto autotróficas. Entretanto, apesar de algumas espécies obrigatoriamente apresentarem como sistema metabólico a fotossíntese, muitas espécies são de fato micro-organismos heterotróficos e outras são capazes de realizar os diferentes sistemas de modo simultâneo ou sequencialmente (GLADUEI e MAXEY, 1994; LEE, 2001; BUMBAK et al., 2011; DA ROS et al., 2013). As cianobactérias também conhecidas como algas verde azuladas, são micro-organismos procariotos. O estudo destes micro-organismos apresenta algumas limitações devido à incapacidade que algumas espécies demonstram de se desenvolver a partir de meios sintetizados em laboratório (CASTENHOLZ e WATERBURY, 1989; THUMMAJITSAKUL et al., 2012). Em geral, as cianobactérias apresentam grande potencial para as indústrias de aquicultura, bioprodutos, bioenergia e bioremediação, como na redução de amônia, fósforo e compostos orgânicos (KUMAR e GAUR, 2012).

O cultivo heterotrófico de cianobactérias é semelhante aos procedimentos empregados para outros tipos de micro-organismos, como bactérias e leveduras (CHEN, 1996; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Apenas um pequeno grupo foi estabelecido em cultivos heterotróficos, sendo em sua maioria, em escala de laboratório para fins exploratórios (PULZ e GROSS 2004; SPOLAORE et al., 2006). 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 (SUN et al. 2008; XIONG et al. 2008; LIANG et al. 2009). 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 (ABREU et al., 2012). Uma alternativa ao emprego de carboidratos como fonte de carbono exógeno em cultivos heterotróficos é a

utilização de efluentes que possuam em sua constituição uma determinada carga orgânica, possibilitando o acoplamento de tratamento de efluentes e águas residuárias à obtenção de biomassa (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

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 (CARVALHO et al. 2006; GROBBELAAR 2004; HU 2004). O cultivo realizado através de batelada alimentada é tido como o modo de operação com maior empregabilidade na obtenção das produtividades desejadas. A vantagem desta estratégia situa-se em um maior controle do fluxo de nutrientes, minimizando prováveis inibições devido a altas concentrações iniciais de substrato (XIONG et al., 2008).

Neste sentido, o objetivo do estudo é avaliar o acúmulo lipídico da cianobactéria *Phormidium* sp. a partir do cultivo heterotrófico com diferentes fontes de carbono orgânico, estudar diferentes estratégias de cultivo empregando a manipueira (água residual do processo para obtenção da farinha de mandioca) e avaliar o acúmulo lipídico a partir de diferentes fontes de nitrogênio. O documento está dividido em seis capítulos. Inicialmente o Capítulo I apresenta uma introdução e atualização bibliográfica, os Capítulos II a V são compostos por quatro artigos. O primeiro artigo (Capítulo II), intitulado de “Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria”, que está publicado no periódico Journal of Bioprocess and Biosystems Engineering, estudou 15 diferentes fontes de carbono orgânico. O Capítulo III (Produção de biodiesel de 3ª a partir de microalgas) que foi submetido ao periódico Ciência Rural, apresenta uma otimização do cultivo da cianobactéria a partir do amido de mandioca como fonte de carbono orgânico, uma vez que entre as fontes com maior potencial para produção de biomassa e lipídeos, apresenta maior viabilidade econômica. O terceiro artigo (Capítulo IV) intitulado de “Heterotrophic cultivation of cyanobacteria: The process intensification of bulk oil production” apresenta o estudo do emprego da manipueira como substrato e está em fase de submissão ao periódico Process Biochemistry. O Capítulo V (Evaluation of different nitrogen sources in the production of oils from *Phormidium* sp. in heterotrophic

systems) é composto pelo quarto e último artigo e esta em finalização. Este último artigo visou estudar o acúmulo lipídico a partir do estudo de diferentes fontes de nitrogênio e sua depleção empregando amido de mandioca como fonte de carbono orgânico, uma vez que não possui nitrogênio em sua composição como no caso da manipueira. As conclusões gerais, o cronograma do projeto e as sugestões para atividades futuras estão apresentados no Capítulo VI. Finalizando, o Capítulo VII compreende os trabalhos apresentados em congressos com maior relevância.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do projeto é avaliar a viabilidade de cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. utilizando diferentes carboidratos e manipueira como substrato, visando à produção de biomassa e lipídeo.

2.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos, o projeto contempla:

Adaptar, desenvolver e padronizar metodologias de cultivo que assegurem assepsia nos cultivos heterotróficos da cianobactéria;

Avaliar fontes orgânicas exógenas de carbono adequadas ao cultivo heterotrófico da *Phormidium* sp.;

Caracterizar físico-quimicamente a manipueira e avaliar o potencial do uso de manipueira como substrato para o cultivo heterotrófico da cianobactéria;

Otimizar as condições de cultivo e desenvolver diferentes modos de operação;

Estudar diferentes fontes de nitrogênio, bem como sua depleção visando o acúmulo lipídico;

Caracterizar quantitativamente e qualitativamente os ésteres de lipídeos produzidos a partir da biomassa da cianobactéria, e avaliar a qualidade do biodiesel produzido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cianobactérias

As cianobactérias estão classificadas em um diverso grupo de eubactérias Gram-negativas amplamente encontradas em lagoas, solo, rochas, mares e oceanos (CARR e WHITTON, 1982; CASTENHOLZ e WATERBURY, 1989). A classificação e identificação das cianobactérias é realizada através de sua morfologia. Contudo, essas técnicas não são totalmente confiáveis, devido a mudanças na morfologia das espécies e divergência de opiniões sobre a taxonomia por profissionais como botânicos e bacteriologistas (TENEVA et al., 2005). Provavelmente os primeiros organismos na Terra, as cianobactérias libertam oxigênio para a atmosfera e, assim como as plantas superiores, possuem fotosistemas I e II. Esses captam a energia do sol e a empregam no metabolismo autotrófico, liberando o oxigênio no processo. No entanto, os ciclos metabólicos ocorrem no citosol e a característica resultante destas espécies é a capacidade de fixar nitrogênio, tornando-as o único grupo de organismos capazes de reduzir nitrogênio e carbono sob condições aeróbicas (HONG e LEE, 2007).

Algumas espécies de cianobactérias podem habitar ambientes extremos incluindo regiões polares e desérticas, adaptando-se à congelação e dessecação (WHITON e POTTS, 2000; SABACKÁ e ELSTER, 2006). Espécies filamentosas da ordem Oscillatoriales, especialmente as espécies *Phormidium*, como a *Phormidium autumnale*, foram detectadas em consórcios microbianos presentes na Antártida (KOMÁREK et al., 2008).

Sendo considerados organismos valiosos para a pesquisa, as cianobactérias possuem os mesmos pigmentos fotossintéticos encontrados em microalgas e plantas superiores, além de serem fontes de produtos valorizados, como lipídeos, carotenoides, ficobiliproteínas e compostos bioativos como anticancerígenos, antibacterianos, antifúngicos e agentes imunossupressores (BURJA et al., 2001; SILVA et al., 2013). Os compostos bioativos podem ser intracelulares e exo-celulares podendo ser empregados pela célula na sobrevivência em condições ambientais extremas (DVORNYK e NEVO, 2003). A descoberta de importantes compostos bioativos demonstram o desenvolvimento de novas técnicas a serem empregadas na agricultura, a partir da substituição de produtos químicos por compostos naturais com menor toxicidade

(SAXENA e PANDEY, 2001). Alguns destes compostos encontrados em extratos de cianobactérias apresentam atividade antibacteriana, agindo na membrana citoplasmática e penetrando na célula, ocasionando morte celular das bactérias (ULTEE et al., 2000; THUMMAJITSAKUL et al., 2012).

Devido a compostos potencialmente importantes, muitas linhagens de cianobactérias são cultivadas no setor comercial. A maioria dos produtos são compostos orgânicos complexos com estruturas únicas, não podendo ser sintetizados em laboratório. Por esta razão, as cianobactérias são conhecidas como "fábricas celulares". Muitas pesquisas se concentram no estudo do metabolismo de cianobactérias com a finalidade de se produzir bioprodutos de alto valor agregado em grande escala (BURJA et al., 2003; HONG e LEE, 2007).

A *Phormidium* sp. é apontada como uma espécie em potencial no emprego de tecnologias de tratamento de efluentes a partir de sistemas que empregam cianobactérias devido a sua tolerância a determinadas condições como temperaturas extremas e concentrações elevadas de nutrientes. Em geral, deve-se considerar a eficiência de remoção de nutrientes e o potencial de geração de produtos na escolha do micro-organismo a ser empregado no tratamento de efluentes. (SU et al., 2012). Estudos empregando a espécie *Phormidium bigranulatum*, comprovam eficiência na remoção de íons metálicos como Pb (II), Cu(II) e Cd (II) em meio aquoso, demonstrando a eficácia do emprego da cianobactéria na bioremediação de águas residuárias constituída de diversos metais (KUMAR e GAUR, 2012).

A importância dos polissacarídeos endógenos de cianobactérias para a superfície dos solos promovendo a estabilização e retenção de nutrientes tem sido reconhecida. A espécie *Phormidium tenue* apresenta composição de 15% de proteínas e cerca de 58% de carbono, sendo identificados 12 diferentes tipos de polissacarídeos. Os polissacarídeos das cianobactérias são complexos de heteropolímeros aniônicos, contendo diferentes monossacarídeos, ácidos urônicos e componentes não sacarídeos (DE PHILIPPIS et al., 2001; PEREIRA et al., 2009). Como qualquer material endógeno de reserva, a quantidade de polissacarídeos em cianobactérias é estritamente limitada, sendo esperado um pequeno crescimento celular, em contraste com cultivos

empregando outras fontes de carbono orgânico, como a D-glicose, D-frutose, D-ribose, sacarose e maltose (FOY e SMITH, 1980; VAN LIERRE et al., 1979).

3.2 Metabolismo heterotrófico

O metabolismo heterotrófico apresenta como características a ausência total de luminosidade e o emprego de uma fonte de carbono orgânico exógeno utilizada na obtenção de energia. As cianobactérias podem recorrer a uma estratégia metabólica alternativa às fontes de carbono orgânico exógeno baseada na utilização de seu material de reserva para manter a integridade celular e se desenvolver. Quando uma cianobactéria é transferida de um sistema foto autotrófico para condições de total escuro, é iniciada automaticamente a mobilização intracelular do polissacarídeos de reserva contendo D-glicose em sua constituição (FOY e SMITH, 1980; OREN e SHILO, 1979). O ciclo da via das pentoses-fosfato é apontado como a via mais provável no metabolismo heterotrófico, uma vez que características como atividades enzimáticas e perda de enzimas específicas são constatadas durante a transferência do organismo de regiões contendo luminosidade para o total escuro (DOOLITTLE e SINGER, 1974; PELROY et al., 1972).

A glicose é a fonte de carbono orgânico exógeno mais empregada em cultivos heterotróficos de cianobactérias. A assimilação oxidativa da glicose é iniciada a partir de uma fosforilação da hexose, resultando em glicose-6-fosfato utilizada na síntese das células, respiração e armazenamento. Das várias vias utilizadas pelos micro-organismos para a degradação da glicose, aparentemente, apenas duas são identificadas para as cianobactérias, a via de Embden-Meyerhof (EMP) e a via das pentoses-fosfato (PPP), sendo que algumas espécies são incapazes de assimilar a glicose devido à ausência de enzimas necessárias para o metabolismo (NEILSON e LEWIN, 1974). Um exemplo é a cianobactéria *Synechocystis* spp., apresentando como principal via metabólica a via das pentoses-fosfato, que é utilizada no catabolismo da glicose através das enzimas glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase (YANG et al., 2002; HONG e LEE, 2007). Várias das enzimas envolvidas no metabolismo heterotrófico de cianobactérias, na fase de rearranjo, são as mesmas em ambos os ciclos. Outra característica é a ausência de uma separação espacial entre

os dois processos, uma vez que organismos procarióticos não possuem mais que um compartimento intracelular (SMITH, 1983).

A membrana citoplasmática, constituinte da célula de cianobactérias, é uma barreira eficaz contra a entrada passiva de compostos hidrofóbicos para dentro da célula, tais como hidratos de carbono. O crescimento a partir do emprego de carboidratos, depende da presença de um sistema de transporte para transferir o substrato para o interior da célula. Cianobactérias capazes de metabolizar carboidratos em sistemas heterotróficos tem demonstrado possuírem mecanismos específicos para o transporte dos substratos para o interior da célula (RABOY e PADAN, 1978). Na ausência dos mecanismos de transporte, os substratos podem ainda entrar na célula, por meio de difusão passiva ao longo do gradiente de concentração (FAY, 1983). No entanto, é impossível prever com precisão quais substratos específicos podem ser usados preferencialmente por todas as espécies de microalgas e cianobactérias, tornando necessário um amplo estudo das fontes de carbono orgânico que podem ser empregadas com eficiência nos cultivos heterotróficos (NEILSON e LEWIN, 1974).

Além da glicose, diversos carboidratos são assimilados pelas cianobactérias através da via das pentoses-fosfato após sua conversão em carboidratos intermediários, como a passagem para a forma monossacarídica (OSANAI et al., 2005). A transformação de dissacarídeos e polissacarídeos é realizada através de reações de hidrólise a partir de enzimas específicas (KNOWLES e PLAXTON, 2003; REYES-SOSA, 2010; GUPTA et al., 2011). Particularmente, para o amido, uma outra possibilidade é a sua degradação pela fosforólise através de uma reação catalisada pela enzima amido fosforilase, tendo como resultado, unidades de glicose-1-fosfato e amido (n-1). A fosforólise é preferível devido a hidrólise de glicose 1-fosfato resultando em um maior rendimento de ATP em comparação com a glicose livre, quando catabolizada em piruvato. A fosforólise produz glicose fosforilada (glicose-1-fosfato), que é então convertida em glicose-6-fosfato, sem o gasto de energia celular (1 ATP) necessário para a formação de glicose-6-fosfato. Deste modo, apenas um ATP é consumido pelos monómeros de glicose, em comparação com dois ATPs consumidos quando a reação inicia-se com glucose livre (WOOD, 1985).

3.3 Sistemas operacionais

Apesar de algumas espécies de cianobactérias serem obrigatoriamente autotróficas e outras heterotróficas facultativas, muitas podem ser cultivadas em ausência total de luminosidade, através de equipamentos como fermentadores (BEHRENS, 2005; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Para se obter processos heterotróficos eficientemente é necessário que as espécies tenham características específicas como facilidade para realizar a divisão celular na ausência de luz, capacidade de crescer em meios de cultura contendo substratos orgânicos, capacidade de adaptação a rápidas mudanças ambientais e apresentar resistência hidromecânicas, quando submetidas a processos operados em fermentadores. (CHEN e CHEN, 2006; DROOP, 1974). Há ainda parâmetros iniciais que precisam ser considerados para que o cultivo heterotrófico seja viável, como robustez da espécie às condições empregadas, baixos custos operacionais, fontes de carbono orgânico exógeno de fácil obtenção e geração de produtos com viabilidade econômica (DAY et al., 1991; GLADUE e MAXEY, 1994; CHEN e CHEN, 2006).

O cultivo heterotrófico em larga escala, é geralmente vantajoso em relação aos custos quando comparado com sistemas fotossintéticos, contudo o desempenho superior da produtividade de biomassa é a força motriz destes sistemas. O crescimento controlado sob condições assépticas em fermentadores diminui a perda de nutrientes e aumenta a qualidade do produto. O custo final da produtividade de biomassa é a característica essencial para os sistemas de cultivo e depende essencialmente das condições e meio de cultivo (BOROWITZKA, 1992). Deve-se considerar também o rendimento celular alcançado por unidade de massa, fonte de carbono orgânico fornecido. As velocidades máximas específicas de crescimento de cianobactérias cultivadas heterotroficamente são geralmente inferiores às resultantes de cultos fotossintéticos (LEE, 1997; DOUCHA e LÍVANSKÝ, 2012).

Embora a obtenção de biomassa ser o único alvo de alguns processos, o objetivo final de qualquer processo, é a produção de altas concentrações do produto no menor tempo possível e com qualidade desejada (BECKER, 2007; DOUCHA et al., 2009). Outro fator importante é o tipo de fonte de carbono empregada, uma vez que afetam a formação e composição da biomassa e do produto. Diferentes estratégias de cultivo

podem ser empregadas em sistemas heterotróficos, como batelada descontínua, batelada alimentada e sistemas contínuos. O cultivo através de batelada alimentada é tido como a estratégia mais indicada na obtenção de altas concentrações celulares para determinadas espécies (BUMBAK et al., 2011).

A partir de variações das estratégias de alimentação pode-se obter diferentes eficiências na produção. Em contraste com sistemas simples (batelada descontínua), em cultivos alimentados, os efeitos osmóticos ou tóxicos devido a elevadas concentrações de substrato podem ser evitados através de concentrações controladas do substrato durante as alimentações (WEN e CHEN, 2002). A adição do substrato através de alimentações pode ser realizados de diferentes formas, geralmente selecionadas a partir da otimização do cultivo levando-se em consideração as necessidades fisiológicas das espécies e as restrições técnicas do equipamento disponível. Uma das estratégias desenvolvidas nestes processos é a adição de substrato por pulso (DOUCHA e LÍVANSKÝ, 2011; SANSAWA e ENDO, 2004; SHI et al., 2002; SUN et al., 2008; XIONG et al., 2008). Estratégias de alimentação pulsada são as mais adequadas para espécies em que o crescimento é inibido por elevadas concentrações de substrato, o emprego dessa técnica se dá geralmente para a produção de compostos que apresentam sua formação estreitamente associada com a produção de biomassa a partir de altas velocidades específicas de crescimento (GANUZA et al., 2008; HATA et al., 2001).

Os cultivos desenvolvidos de forma contínua, são desenvolvidos a partir da adição contínua do substrato. Estas estratégias são geralmente desenvolvidas a partir do emprego de funções matemáticas que descrevem a adição do substrato a taxas constantes pré-definidas (DE SWAAF et al., 2003; SCHMIDT et al., 2005).

3.4 Efluentes agroindustriais

A escolha de matérias-primas baratas é de grande importância para a economia global de processos biotecnológicos, dado que representam 50% do custo final do produto. A melhor maneira de reduzir o custo de substrato para a biotecnologia é a utilização de resíduos constituídos por nutrientes essenciais para o desenvolvimento do micro-organismo empregado, resultando ainda em benefícios ambientais. Em todo o

mundo, milhões de toneladas de resíduos perigosos e não perigosos são gerados a cada ano, demonstrando a necessidade de uma melhor gestão destes resíduos através dos conceitos reduzir, reutilizar e reciclar (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002). Até agora, vários substratos renováveis, que incluem efluentes, resíduos e subprodutos de origem agrícola e industrial têm sido intensamente estudados para o cultivo de micro-organismos e produção de bioprodutos (MENDES et al., 2007; PEREZ-GARCIA et al., 2011; PLAZA et al., 2011; SCHIMIDT et al., 2005). Entretanto, em determinados casos, há a impossibilidade da substituição devido à produção de compostos farmacêuticos obtidos a partir de processos que necessitam de medidas de controle específicas. Em processos que necessitam do emprego da glicose na obtenção de compostos de alto valor, há ainda a alternativa da valorização da biomassa após extração e purificação do produto, através da produção de ração animal ou de biocombustíveis (BRENNAN e OWENDE, 2010; CHISTI, 2007).

Fábricas de amido de mandioca geram uma grande quantidade de águas residuais e resíduos sólidos, resultando na administração de várias etapas de tratamento. O resíduo sólido em particular contém um nível elevado de amido-lignocelulósico. No caso do resíduo líquido, denominado por manipueira, há ainda uma certa quantidade de resíduo da mandioca e apresenta em sua constituição uma alta carga orgânica. Estes recursos residuais são substratos potencialmente promissores para a produção de biocombustíveis e bioprodutos a partir do cultivo heterotrófico de micro-organismos (VIRUNANON et al., 2013).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2011), o Brasil foi o segundo produtor mundial de mandioca no ano de 2010, como apresentado na Figura 1, demonstrando a alta disponibilidade dos resíduos a partir deste setor agroindustrial.

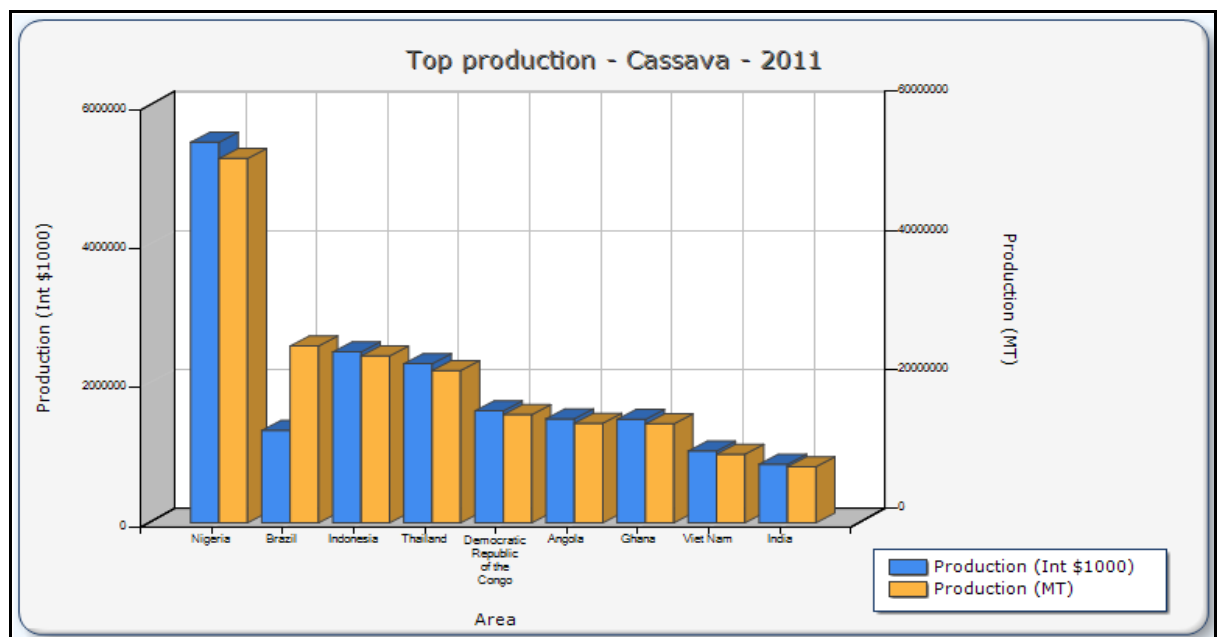


Figura: 1 Produção mundial de mandioca no ano de 2011 (FAO, 2011).

O processamento de uma tonelada de raízes de mandioca gera cerca de 3 m³ de efluente e 150 kg de bagaço de mandioca (HIEN et al., 1999). A Figura 2 (FAO, 2011), apresenta a produção de commodities no ano de 2011 no Brasil, sendo a produção de raízes de mandioca cerca de 25-30 milhões de toneladas, gerando aproximadamente de 3-5 milhões de toneladas de bagaço e de 75-90×10⁶ m³ de efluentes anualmente a partir da indústria de fécula de mandioca (CARDONA et al., 2010). Apesar dos teores de amido razoavelmente altos, o bagaço é muitas vezes deixado para apodrecer em campo aberto, tornando-se um problema ambiental (AVANCINI et al., 2007). Problemas ambientais como estes não podem ser resolvidos por única tecnologia, mas sim a partir de uma abordagem a aplicações interdisciplinares, especialmente a partir o conceito de biorrefinarias, uma vez que os resíduos sólidos e líquidos das atividades agroindustriais, em particular, são vendidos a um valor relativamente baixo.

Rank	Commodity	Production (Int \$1000)	Flag	Production (MT)
1	Sugar cane	23885831	*	734006000
2	Soybeans	18160269	*	74815400
3	Maize	2959193	*	55660400
4	Cow milk, whole, fresh	9914191	*	32091000
5	Cassava	1328863	*	25441700
6	Oranges	3828654	*	19811100
7	Rice, paddy	3695030	*	13477000
8	Indigenous Chicken Meat	15726308	*	11040600
9	Indigenous Cattle Meat	24962227	*	9240560
10	Bananas	2064206	*	7329470
11	Wheat	837047	*	5690040
12	Tomatoes	1632235	*	4416650
13	Potatoes	615798	*	3917230
14	Beans, dry	1972006	*	3435370
15	Indigenous Pigmeat	4962690	*	3228310
16	Cottonseed	1031199	*	3194550
17	Coconuts	325488	*	2943650
18	Vegetables fresh nes	533254	*	2829820
19	Coffee, green	2901245	*	2700440
20	Pineapples	660771	*	2318120

Figura: 2 produção de commodities no Brasil no ano de 2011 (FAO, 2011).

3.5 Emprego de cianobactérias no tratamento de efluentes

O tratamento de águas residuais por cianobactérias é uma ideia antiga de aplicação, sendo limitada devido aos custos envolvidos no tratamento de grandes volumes sob condições autotróficas em um tempo hábil (DE-BASHAN e BASHAN, 2010). Sistemas mais recentes empregando cultivos heterotróficos estão sendo estudados em escala laboratorial e demonstram que sob as condições empregadas, é verificado um maior potencial na eliminação de nutrientes (PEREZ-GARCIA et al., 2010).

A necessidade de remoção de elevadas concentrações de nutrientes, em particular o nitrogênio e o fósforo, é um importante requisito para o tratamento de efluentes. Um dos principais problemas gerados pela alta concentração desses nutrientes oriundos do despejo, principalmente de águas residuárias e efluentes agroindustriais em rios e lagos, é a eutrofização. Entre os nutrientes, em particular o fósforo, apresenta-se como uma fonte de difícil remoção. O processo mais comum de remoção do fósforo de águas residuárias é a precipitação química, no entanto, o fósforo recuperado a partir deste método não é totalmente reciclável, necessitando de

tratamentos complementares como em sistemas de lodo ativado ou sendo destinado à aterros sanitários (HOFFMAN, 1998; PITTMAN et al., 2011). As cianobactérias ainda demonstram eficiência na remoção de metais tóxicos, demonstrando portanto um importante potencial na remediação de poluentes presentes em efluentes industriais (AHLUWALIA e GOYAL, 2007; MALLICK, 2002). Além disso, os sistemas de tratamento de efluentes empregando cianobactérias apresentam-se ambientalmente favoráveis com um carácter sustentável, uma vez que não geram poluentes adicionais, fornecendo oportunidades de reciclagem de nutrientes a partir do emprego da biomassa, por exemplo, como fertilizante de baixo custo ou ração animal (MUNHOZ e GUIEYSSE, 2006).

O crescimento eficiente de cianobactérias depende de uma variedade de variáveis, como pH, temperatura, presença de nutrientes essenciais como nitrogênio, fósforo e carbono orgânico, disponibilidade de oxigênio, e fatores como luz e dióxido de carbono, quando sob condições autotróficas. Uma das principais diferenças entre os efluentes é a disponibilidade e forma com que os nutrientes se encontram presentes, como é o caso do nitrogênio, que em determinados efluentes encontra-se sob a forma de amônio, que em altas concentrações pode proporcionar uma inibição ao crescimento da espécie utilizada (KONIG et al., 1987). Outros fatores que podem afetar o desenvolvimento das cianobactérias são as altas concentrações de metais, como cádmio e mercúrio geralmente presentes em efluentes industriais, e fatores abióticos, como a presença de bactérias, que podem competir pelo substrato presente. As variáveis apresentadas apresentam variação conforme a origem do efluente, como águas residuárias, efluentes de origem industrial ou agroindustrial, bem como local e sistema de tratamento (RUIZ-MARINET al., 2010).

As águas residuárias e os efluentes agrícolas apresentam maior uniformidade em sua composição bem como disponibilidade adequada para os sistemas que empregam cianobactérias. Uma série de estudos em laboratórios investigam diferentes modos de operação de biorreatores, como em batelada e sistemas semi-contínuos, empregando águas residuais na obtenção de biomassa e produção de lipídeos, resultando em produtividades relativamente altas dos produtos quando acoplado às altas concentrações celulares. Além disso, a produção de lipídeos pode ser acoplada às representativas

taxas de remoção de nitrogênio, fósforo e matéria orgânica, quando em sistemas heterotróficos (KONG et al., 2010).

Atualmente o cultivo de cianobactérias visando apenas a produção de biocombustíveis não apresenta viabilidade econômica. Uma opção atrativa é o acoplamento do tratamento de efluentes ou águas residuárias à produção de biocombustíveis originários da biomassa, oferecendo conseqüentemente uma redução nos custos com energia, aproveitamento de nutrientes presentes no efluente e mitigação de gases de efeito estufa, resultando em uma produção de energia sustentável e renovável (PITTMAN et al., 2011).

3.6 A influência do nitrogênio no metabolismo de cianobactérias

Depois do carbono, o nitrogênio é o nutriente mais importante para a produção de biomassa. O teor de nitrogênio na biomassa pode variar de 1% a mais de 10% e não verifica-se muita variação entre diferentes grupos. Respostas típicas sobre a limitação de nitrogênio no cultivo de cianobactérias é a descoloração das células (diminuição das clorofilas e um aumento de carotenóides) e o acúmulo de carbono orgânico, como polissacarídeos, e de certos compostos como óleos (BECKER, 1994).

A fonte de nitrogênio mais comumente empregado em cultivos, são os nitratos, mas muitas vezes amônia e ureia também são empregadas, registrando-se taxas de crescimento semelhantes. Uma variedade de compostos contendo nitrogênio orgânico são utilizados por cianobactérias, alguns dos quais podem servir como a única fonte de nitrogênio. O nitrogênio amoniacal é muitas vezes a fonte de nitrogênio preferida por determinados micro-organismos, e a assimilação das formas NH_3^- ou NH_4^+ são relacionadas com o pH do meio de crescimento (GROBBELAAR, 2007).

A produção de biomassa é fortemente dependente das condições de cultivo, e a manipulação dessas condições é de grande importância na obtenção de uma composição desejada. Um exemplo de estratégia é a depleção do nitrogênio, que pode ser empregada visando o aumento das frações de TAG e amido na biomassa, em detrimento da síntese de proteínas, que é dependente da presença de nitrogênio no meio de cultivos (HU, 2008).

O acúmulo de lipídeos através da depleção da fonte de nitrogênio é geralmente realizada em duas etapas. A primeira etapa consiste no cultivo na presença de uma fonte de nitrogênio sob níveis que suportem apenas a síntese de proteínas, importante para a síntese celular. A fonte de nitrogênio empregada deve ser esgotada para a segunda fase, aonde a fonte de carbono presente é convertido em lipídeos. Acredita-se que o mecanismo por trás do efeito de esgotamento da fonte de nitrogênio se encontra associado com o decréscimo intracelular de clorofila e glicolipídeos, que se encontram dentro do cloroplasto. Portanto, a concentração e duração de nitrogênio que deve ser aplicado ao cultivo de cianobactérias, é um importante parâmetro para se otimizar a produção de biomassa e lipídeos. Como a falta de uma fonte de nitrogênio no cultivo reduz o teor de proteínas e carboidratos na célula, as condições de cultivo empregando baixas concentrações ou ausência total de nitrogênio, só são adequadas quando o produto final é a obtenção de lipídeos, como por exemplo na produção de biodiesel (SUALI e SARBATLY, 2012).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A.P.; FERNANDES, B.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.; DRAGONE, G. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using dairy waste as organic carbono source. *Bioresource Technology*, v.118, p.61-66, 2012.
- AHLUWALIA, S.S.; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, v.98, p.2243–2257, 2007.
- AVANCINI, S.R.P.; FACCIN, G.L.; VIEIRA, M.A.; ROVARIS, A.A.; PODESTA, R.; TRAMONTE, D.E.; SOUZAN, R.M.A.; AMANTEE, R. Cassava starch fermentation wastewater: characterization and preliminar toxicological studies. *Food and Chemical Toxicology*, v.45, p.2273-2278, 2007.
- BECKER, E.W. *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, p.293, 1994.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.14(2), p.557–577, 2010.

BUMBAK, F.; COOK, S.; ZACHLEDER, V.; HAUSER, S.; KOVAR, K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.91, p.31–46, 2011.

BURJA, A.M.S; BANAIGS, B.E.; ABOU-MANSOUR, BURGESS, J.G.; WRIGHT, P.C. Marine cyanobacteriaa prolific source of natural products. *Tetrahedron*, v.57, p.9347-9377, 2001.

BURJA, A.M.; DHAMWICHUKORN, S.; WRIGHT, P.C. Cyanobacterial postgenomic research and systems biology. *Trends in Biotechnology*, v.21, p.504-511, 2003.

CARDONA, C.A.; SANCHEZ, O.J.; GUTIERREZ, L.F. Feedstocks for fuel etanol production. In: *Process Synthesis for Fuel Ethanol Production*. CRC Press, USA, p.43-75, 2010.

CARR, N.G.; WHITTON, B.A. *The biology of cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford., 1982.

CARVALHO, A.P.; PONTES, I.; GASPAR, H.; MALCATA, F.X. Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.38(3–4), p.358-366, 2006.

CASTENHOLZ, R.W.; WATERBURY, J.B. Oxygenic photosynthetic bacteria. Group I. *Cyanobacteria*, pp. 1710-1727, 1989.

CHEN, F.; JOHN, M.R.; Relationship between substrate inhibition and maintenance energy of *Chlamydomonas reinhardtii* in heterotrophic culture. *Journal of Applied Phycology*, v.8, p.15-19, 1996.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v.25 (3), p.294-306, 2007.

DA ROS, P.C.M.; SILVA, C.S.P.; SILVA-STENICO, M.E.; FIORE, M.F.; DE CASTRO, H.F. Assessment of Chemical and Physico-Chemical Properties of Cyanobacterial Lipids for Biodiesel Production. *Marine Drugs*, 11, 2365-2381, 2013.

DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource and Technology*, v.101, p.1611–1627, 2010.

DE PHILIPPIS, R.; SILI, C.; PAPREI, R.; VINCENZINI, M. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review. *Journal of Applied Phycology*, v.13, p.293–299, 2001.

DOOLITTLE, V.; SINGER, R.A. Mutational analysis of dark endogenous metabolism in the blue-green alga *Anaestis nidulans*. *J. Bact.*, v.119, p.677-683, 1974.

DVORNYK, V.; NEVO, E. Genetic polymorphism¹. of cyanobacteria under permanent stress: A lesson from the “Evolution Canyons”. *Research in Microbiology*, v.154, p.79-84, 2003.

FAY, P. *The Blue-Greens (Cyanophyta – Cyanobacteria)*, The Institute of Biology's, Studies in Biology n° 160, Ed. Edward Arnold, 1983.

Food and Agricultural Organization of United Nations (FAO). Available: http://www.fao.org/index_en.htm

FOY, R.H.; SMITH, R.V. The role of carbohydrate accumulation in the growth of planktonic *Oscillatoria* species. *British Phycological Journal*, v.15, p.139-150, 1980.

GLADUE, R.M.; Maxey. Microalgal feeds for aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, v.6(2), p.131–141, 1994.

GROBBELAAR, J.U. Algal nutrition: mineral nutrition. In: Richmond A (ed) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell, Oxford, pp. 97–115, 2004.

GUPTA, V.; NATARAJAN, C.; KUMAR, K.; PRASANNA, R. Identification and characterization of endoglucanases for fungicidal activity in *Anabaena laxa* (Cyanobacteria), *Journal of Applied Phycology*, v.23, p.73-81, 2011.

HIEN, P.G. OANH, L.T.K.; VIET, N.T.; LETTINGA, G. Closed wastewater system in the tapioca industry in Vietnam. *Water Science and Technology*, v.39, p.89-96, 1999.

HOFFMAN, J.P. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *Journal of Phycology*, v.34, p.757–763, 1998.

HONG, S.J.; LEE, C.G. Evaluation of central metabolism based on a genomic database of *Synechocystis* PCC6803. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v.12, p.165-173, 2007.

- HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: Richmond A (ed) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell, Oxford, pp. 83–94, 2007.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, v.54, p.621–639, 2008.
- KNOWLES, V.L.; PLAXTON, W.C. From Genome to Enzyme: Analysis of Key Glycolytic and Oxidative Pentose-Phosphate Pathway Enzymes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant and Cell Physiology*, v.44, p.758-763, 2003.
- KOMÁREK, J.; ELSTER, J.; KOMÁREK, O. Diversity of cyanobacterial microflora of the northern part of James Ross Island, NW Weddell Sea, Antarctica. *Polar Biol*, v.31, p.853–865, 2008.
- KONG, Q.X.; LI, L.; MARTINEZ, B.; CHEN, P.; RUAN, R. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.16, p.9–18, 2010.
- KONIG, A.; PEARSON, H.W.; SILVA, S.A. Ammonia toxicity to algal growth in waste stabilization ponds. *Water Science and Technology*, v.19, p.115–122, 1987.
- KUMAR, D.; RAI, J.; GAUR, J.P. Removal of metal ions by *Phormidium bigranulatum* (Cyanobacteria) – dominated mat in batch and continuous flow systems. *Bioresource Technology*, v.104, p.202-207, 2012.
- LEE, Y.K. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *Journal of Applied and Phycology*, v.13(4), p.307–315, 2001.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, v.31, p.1043–1049, 2009.
- MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Na update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, v.58 (4), p.435, 2002.
- MALLICK, N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *BioMetals*, v.15, p.377–390, 2002.

MENDES, A.; GUERRA, P.; MADEIRA, V.; RUANO, F.; DA SILVA, T.L.; REIA, A. Study of docosaheptaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptothecodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.23(9), p.1209–1215, 2007.

MUNHOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research*, v.40, p.2799–2815, 2006.

NEILSON, A.H.; LARSSON, T. The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. *Physiologia Plantarum*, v.48, p.542-553, 1980.

OREN, K.; SHILO, M. Anaerobic heterotrophic dark metabolism in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*: sulphur respiration and lactate fermentation. *Arch Mikrobiol*, v.122, p.73-84, 1979.

OSANAI, T.; KANESAKI, Y.; NAKANO, T.; TAKAHASHI, H.; ASAYAMA, M.; Shirai, M.; KANEHISA, M.; SUZUKI, I.; MURATA, N.; TANAKA, K. Positive Regulation of Sugar Catabolic Pathways in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the Group 2 Factor SigE, *The Journal of Biological Chemistry*, v.35, p.30653-30659, 2005.

PELROY, R.A.; RIPPKA, R.; STANIEB, R.Y. The metabolism of glucose by unicellular blue-green algae. *Arch Mikrobiol*, v.87, p.303-322, 1972.

PEREIRA, S.; ZILLE, A.; MICHELETTI, E.; MORADAS-FERREIRA, P.; DE PHILIPPIS, R.; TAMAGNINI, P. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiology Reviews*, v.33, p.917–941, 2009.

PEREZ-GARCIA, O.; BASHAN, Y.; PUENTE, M.E. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*, v.47 (01), p.190-199, 2010.

PITTMAN, J.K.; DEAN, A.P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, v.102, p.17-25, 2011.

PLAZA, G.A.; PACWA-PLOCINICZAK, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; JANGID, K.; WILK, K.A.; Agroindustrial wastes as unconventional substrates for growing of *Bacillus* strains and production of biosurfactants. *Environment Protection Engineering*, v.37(3), p.63-71, 2011.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, v.45(1), p.11–36, 2011.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.65(6), p.635–648, 2004.

RABOY, B.; PADAN, E.; Active transport of glucose and methylglucoside in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *The Journal of Biological Chemistry*, v.253, p.3287-3291, 1978.

REYES-SOSA, F.M.; MOLINA-HEREDIA, F.P.; DE LA RISA, M.A. A novel α -amylase from the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7119, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.86, p.131-141, 2010.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L.G.; STEPHENSON, T. Growth and nutriente removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, v.101, p.58–64, 2010.

SABACKÁ, M.; ELSTER, J. Response of Cyanobacteria and Algae from Antarctic Wetland Habitats to Freezing and Desiccation Stress. *Polar Biology*, v.30, p.31–37, 2006.

SAXENA, S.; PANDEY, A.K. Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.55, p.395–403, 2001.

SCHMIDT, R.A.; WIEBE, M.G.; ERIKSEN, N.T. Heterotrophic high celldensity fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.90(1), p.77–84, 2005.

SILVA, C.S.P.; SILVA-STENICO, M.E.; FIORE, M.F.; DE CASTRO, H.F.; DA RÓS, P.C.M. Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. *Algal Research*, 3:1-7, 2014.

SMITH, A.J. Modes of cyanobacterial carbono metabolism. *Annual Microbiology*, v.134B, p.93-113, 1983.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.101(2), p.87–96, 2006.

SU, Y.; MENNERICH, A.; URBAN, B. Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species. *Bioresource Technology*, v.124, p.157-162, 2012.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.16, p.4316– 4342, 2012.

SUN, N.; WANG, Y.; LI, Y.T.; HUANG, J.C.; CHEN, F. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Process Biochemistry*, v.43, p.1288–1292, 2008.

TENEVA, I.; DZHAMBASOV, B.; MLADENOV, R.; SCHIRMER, K. Molecular and phylogenetic characterization of *Phormidium* species (cyanoprokaryota) using the cpcB-IGS-cpcA locus. *Journal of Phycology*, v.41, p.188–194, 2005.

THUMMAJITSAKUL, S.; SILPRASIT, K.; SITTIPRANEED, S. Antibacterial activity of crude extracts of cyanobacteria *Phormidium* and *Microcoleus* species. *African Journal of Microbiology Research*, v.6(10), p.2574-2579, 2012.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F.A.; SMID, E.J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Mikrobiol*, v.174, p.233-238, 2000.

VAN LIERRE, L. Oil *Oscillatoria agardhii* gomont. Experimental ecology and physiology of a nuisance bloom forming cyanobacterium. Ph.D. Thesis, University of Amsterdam, The Netherlands, 1979.

VIRUNANON, C.; OUEPHANIT, C.; BURAPATANA, V.; CHULALAKSANANUKUL, W. Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminar step in bio-alcohols production from waste starchy resources. *Journal of Cleaner Production*, v.39, p.273-279, 2013.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. *The Ecology of Cyanobacteria, Their Diversity in Time and Space*. Springer, Berlin, 2000.

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

XIONG, W.; LI, X.; XIANG, J.; WU, Q. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.78, p.29–36, 2008.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.58, p.813-822, 2002.

CAPÍTULO II

Apresentação

O Capítulo II é constituído pela primeira fase do projeto que contemplou o estudo de 15 diferentes fontes de carbono orgânico exógeno, monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos, no cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. O estudo está apresentado sob a forma de um artigo intitulado de “Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria”.

Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria

Érika Cristina Francisco^a, Roger Wagner^b, Eduardo Jacob-Lopes^b, Telma Teixeira Franco^a

^aSchool of Chemical Engineering, University of Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Tel. + 55 (19) 35213966. E-mail: franco@feq.unicamp.br (T.T. Franco)

^bFood Science and Technology Department, Federal University of Santa Maria, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel. +55 (55) 32208822. E-mail: jacoblopes@pq.cnpq.br (E. Jacob-Lopes)

Abstract

Glucose is the substrate most widely used as exogenous carbon source for heterotrophic cultivation of cyanobacteria. 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 different monosaccharides (arabinose, fructose, galactose, glucose, mannose and xylose), disaccharides (lactose, maltose, sucrose and trehalose) and polysaccharides (carboxymethylcellulose, cassava starch, Hi-maize[®], maltodextrin Corn Globe 1805[®] and xylan) as exogenous carbon source for heterotrophic culture of cyanobacterium *Phormidium* sp. The batch cultivation using fructose as organic carbon source resulted in the highest ($p < 0.05$) cell biomass (5540 mg/L) in parallel with the highest ($p < 0.05$) substrate yield coefficient (0.67 mg_{biomass}/mg_{CODfructose}). Mannose was the carbon source with the highest ($p < 0.05$) substrate consumption rate (3185.7 mg/L/d) and maltodextrin was the carbohydrate with major potential to produce biomass (1072.8 mg_{biomass}/L.d) and lipids (160.8 mg_{lipids}/L.d). Qualitatively, the fatty acid profiles of the lipid extract from *Phormidium* sp. showed predominance of saturated chains for the cultures grown with most of the carbon sources, with the exception of the ones grown with xylose and maltodextrin.

Keywords: Microalgae/cyanobacteria; heterotrophic metabolism; carbohydrates

Introduction

Heterotrophic cyanobacteria cultivation is a specific niche of production of metabolic bioproducts. Heterotrophic growth in the dark, supported by an exogenous carbon source, is an important ability of some species of these photosynthetic organism (QUEIROZ et al., 2011).

The heterotrophic route, where possible, overcomes major limitations of producing useful products from cyanobacteria, that is, the dependency on light which significantly complicates the process. As a general role, heterotrophic cultivation can be cheaper, and it is simpler to construct facilities and easier to maintain on a full-scale. However, not all species can grow heterotrophically, and suitable organic substrates are required, as increased contamination and competition with other micro-organisms and the inability to produce light-induced metabolites are some limitations of this metabolic route (PEREZ-GARCIA et al., 2011a).

All micro-organisms, including cyanobacteria, use the same metabolic pathways for respiration. Respiration in the dark serves as the exclusive source of energy for maintenance and biosynthesis, besides providing the carbon required as building blocks for biosynthesis (SMITH, 1982; FAY, 1983). Is not possible, however, to precisely predict which specific organic substrates can be used or preferred by any given cyanobacteria, although, glucose is most commonly used, because of its higher energy content than most organic substrates (PEREZ-GARCIA et al., 2011b). 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. Consequently, each combination of these factors may lead to different affinities for a particular carbon source (LEE, 2004). Additionally, it should be considered the possibility of development of specific transport systems necessary for the uptake of some substrates. In these cases, cyanobacterial cells require an acclimation period that only occurs if non preferred substrates are available in the culture medium (POOLE, 1978).

Phormidium is a genus of filamentous, unbranched cyanobacteria, with filaments of about 3 to 4 μm in diameter. Several species are known to live in extreme environments such as thermal springs, desert soils and polluted sites, and for this

reason they have a wide potential as biocatalysts in bioprocesses, because of their robustness and simple nutritional requirements (AL-THUKAIR et al., 2007; CAÑIZARES-VILLANUEVA et al., 1994; GUIRY et al., 2013).

In this regard, the aim of this study is to evaluate the heterotrophic metabolism of cyanobacterium *Phormidium* sp. using different monosaccharides (arabinose, fructose, galactose, glucose, mannose and xylose), disaccharides (lactose, maltose, sucrose and trehalose) and polysaccharides (carboxymethylcellulose, cassava starch, Hi-maize®, maltodextrin and xylan) as exogenous carbon source.

Materials and methods

Microorganisms and culture media

Axenic cultures of *Phormidium* sp. were originally isolated from the Cuatro Cienegas desert (26°59'N, 102°03'W-Mexico) by Eduardo Jacob-Lopes (professor at Federal University of Santa Maria). Stock cultures were propagated and maintained in solidified agar-agar (20 g/L) containing synthetic BG11 medium (RIPPKA et al., 1979) with the following composition (g/L): K₂HPO₄ (0.03 g/L), MgSO₄ (0.075 g/L), CaCl₂·2H₂O (0.036 g/L), ammonium citrate and iron (0.0006 g/L), Na₂EDTA (0.001 g/L), NaCl (0.00072 g/L), NaNO₃ (0.015 g/L), citric acid (0.0006 g/L), Na₂CO₃ (1.5 g/L), trace metals [H₃BO₃ (0.0028 g/L), MnCl₂·4H₂O (0.0018 g/L), ZnSO₄·7H₂O (0.00022 g/L), Na₂MoO₄·2H₂O (0.00039 g/L), CoSO₄·6H₂O (0.00004 g/L)]. The incubation conditions used were 25 °C, a photon flux density of 15 µmolm⁻² s⁻¹ and a photoperiod of 12/12 hours light/dark. To obtain the inoculums in the liquid form, 1 mL of sterile synthetic medium was transferred to slants, and the colonies were scraped and then homogenized with the aid of mixer tubes. The entire procedure was performed aseptically.

Bioreactor

Measurements were made in a bubble column bioreactor. The system was built of borosilicate glass, covered with aluminum foil, and had an external diameter of 12.5 cm and 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 of the reactor consisted of a 2.5

cm diameter air diffuser located inside the bioreactor. The air flow was monitored 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 bioreactor including filtering units was previously sterilized by autoclaving at 121 °C for 40 minutes and then for 30 minutes containing the synthetic medium.

Obtaining kinetic data in an experimental bioreactor

Experiments were performed in a bioreactor operating under a batch regime, fed on 2.0 L of culture medium. The experimental conditions were as follows: initial concentration of inoculum of 100 mg/L, C/N ratio at 20, temperature of 26 °C, pH adjusted to 7.6, aeration of 1 VVM (volume of air per volume of culture per minute) and absence of light. The culture medium consisted of BG11 synthetic medium modified and supplemented with different exogenous carbon sources to obtain 12 g/L of organic carbon concentration for monosaccharides and disaccharides. The concentration of monosaccharides and disaccharides were adjusted stoichiometrically and those of polysaccharides were adjusted their concentration at 12000mg/L of chemical oxygen demand (COD) using a calibration curve, based on dilutions of a known amount of dry substrate. The source and concentrations of organic carbon used were: D-arabinose (12.5 g/L), D-fructose, (12.5 g/L), D-galactose (12.5 g/L), D-glucose (12.5 g/L), D-mannose (12.5 g/L), D-xylose (12.5 g/L), D-lactose (11.9 g/L), D-maltose (11.9 g/L), sucrose (11.9 g/L), trehalose (11.9 g/L), carboxymethylcellulose (5.7 g/L), commercial cassava starch (14.0 g/L), Hi-maize® (6.6 g/L), maltodextrin Corn Globe 1805® (7.0 g/L) and xylan (5.4 g/L).

Sampling and analytical methods

Samples were collected aseptically in a laminar flow hood previously sterilized. The tips used for sample collection were previously sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 minutes. The cell biomass, the dynamics of pH and the consumption of organic carbon were monitored every 24 hours 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. The organic carbon concentration of carbohydrate solutions was expressed in terms of chemical oxygen demand (COD) and analyzed according to the closed reflux colorimetric method of Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

The lipid fraction was extracted from the biomass by the Bligh and Dyer method (BLIGH & DYER, 1976). The method of Hartman and Lago (HARTMAN & LAGO, 1976) was used to saponify and esterify the dried lipid extract to obtain the fatty acid methyl esters (FAMES). The fatty acid composition was determined using a VARIAN 3400CX gas chromatograph (Varian, Palo Alto-CA, USA). The FAMES were identified by comparison of the retention times with those of the standard (Supelco, Louis-MO, USA) and quantified by area normalization.

Culture contamination was determined at the end of the experiment by plating 0.1 mL of culture in Petri dishes with solid (20 % agar) BG11 medium (APHA, 2005).

Kinetics parameters

Biomass data were used to calculate the biomass productivity [$P_X = (X_i - X_{i-1}) \cdot (t_i - t_{i-1})^{-1}$, mg/L/d], the maximum specific growth rate [$\ln(X_i/X_0) = \mu_{\max} \cdot t$, 1/d] was plotted, the generation time [$t_g = 0.693/\mu_{\max}$, d] and the lipid productivity [$P_L = P_X \cdot L_C$, mg/L/d], 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, $\mu_{\max}$ 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 ($r_s = -d\text{COD}/dt$, mg/L/d) and the substrate yield coefficient ($Y_{X/\text{COD}} = -dX/d\text{COD}$, mg_{biomass}/mg_{CODsubstrate}), where COD is the carbon organic demand (mg/L) and t is the time (d).

Statistical analysis

Analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$) were used to test differences between the carbon sources. Additionally, multivariate cluster analysis was used for determination of the similarity between the carbon sources. Single linkage as an amalgamation rule and Euclidean linkage distance as a measure of similarity were used in the analysis. The similarity values of the linkages were represented by the dendrogram. The analyses were performed using Statistica 7.0 software (StatSoft, Tulsa-OK, USA, 2004).

Results

The aseptic procedures adopted were suitable for preventing microbial contamination of the cultures (data not shown), since null results were observed by the heterotrophic plate count method.

The assessment of the carbon sources suitable for production of high value or bulk cyanobacteria products is a fundamental step in the consolidation of heterotrophic production routes. The kinetic parameters using different monosaccharides, disaccharides and polysaccharides as exogenous carbon source for heterotrophic culture of *Phormidium* sp. are shown in Table 1.

Table 1 Kinetic parameters for different carbohydrates.

Carbohydrates		$\mu_{\max}$ (d ⁻¹)	tg (d)	$X_{\max}$ (mg/L)	P _x (mg/L.d)	r _s (mg/L.d)	Y _{X/COD} (mg _{biom} /mg _{COD})	Lipid (%)	P _L (mg/L.d)
Monosaccharides	Arabinose	0.456 ^a ±0.00	1.4 ^a ±0.03	395 ^a ±15.8	42.7 ^a ±1.10	695.7 ^a ±14.7	0.05 ^a ±0.00	8.6 ^a ±0.22	3.6 ^a ±0.10
	Fructose	0.576 ^b ±0.00	1.2 ^b ±0.02	5540 ^b ±88.5	600.7 ^b ±18.1	890.4 ^b ±21.3	0.67 ^b ±0.00	12.5 ^b ±0.41	73.9 ^b ±1.92
	Galactose	0.264 ^c ±0.00	2.6 ^c ±0.07	1014 ^c ±19.2	121.9 ^c ±1.70	2232.2 ^c ±35.7	0.13 ^c ±0.00	10.9 ^c ±0.33	13.2 ^c ±0.33
	Glucose	0.768 ^d ±0.00	0.9 ^d ±0.00	1350 ^d ±41.8	404.1 ^d ±12.1	2670.9 ^d ±69.4	0.23 ^d ±0.00	11.3 ^c ±0.15	45.6 ^d ±1.14
	Mannose	0.360 ^e ±0.00	1.9 ^e ±0.03	3780 ^e ±71.8	456.2 ^e ±15.1	3185.7 ^e ±70.1	0.38 ^e ±0.00	11.7 ^c ±0.17	53.3 ^e ±1.60
	Xylose	0.168 ^f ±0.00	4.2 ^f ±0.15	385 ^f ±7.70	66.2 ^f ±1.60	952.1 ^f ±31.4	0.07 ^a ±0.00	7.9 ^d ±0.18	5.0 ^f ±0.11
Disaccharides	Lactose	0.336 ^g ±0.00	2.1 ^g ±0.05	353 ^g ±11.6	76.1 ^g ±2.28	1385.7 ^g ±40.1	0.04 ^a ±0.00	12.2 ^{bc} ±0.18	9.3 ^g ±0.18
	Maltose	0.384 ^h ±0.00	1.8 ^h ±0.02	2140 ^h ±53.5	289.9 ^h ±5.56	730.1 ^h ±19.7	0.39 ^e ±0.00	10.3 ^e ±0.26	29.7 ^h ±0.32
	Sucrose	0.576 ^b ±0.00	1.2 ^b ±0.03	633 ⁱ ±16.4	175.4 ⁱ ±3.15	1668.5 ⁱ ±46.7	0.08 ^c ±0.00	13.7 ^f ±0.30	23.7 ⁱ ±0.42
	Trehalose	1.032 ⁱ ±0.01	0.6 ⁱ ±0.00	3080 ⁱ ±52.3	740.4 ⁱ ±15.9	1180.1 ⁱ ±28.3	0.42 ^e ±0.00	10.1 ^e ±0.14	74.6 ⁱ ±1.49
Polysaccharides	carboximethylcellulose	0.672 ^j ±0.00	1.0 ^j ±0.01	495 ^k ±12.3	124.8 ^k ±0.27	2224.8 ^k ±37.8	0.05 ^a ±0.00	8.8 ^a ±0.13	11.0 ^k ±0.17
	cassava starch	1.080 ^l ±0.01	0.6 ^l ±0.01	5280 ^l ±99.7	1024.3 ^l ±17.4	1710.0 ^l ±42.7	0.60 ^f ±0.00	14.8 ^f ±0.34	152.1 ^l ±3.43
	Hi-maize®	0.696 ^m ±0.00	1.0 ^m ±0.01	1660 ^m ±33.2	518.1 ^m ±9.32	2328.7 ^m ±69.8	0.22 ^d ±0.00	11.0 ^c ±0.17	56.9 ^m ±0.69
	Maltodextrin	1.080 ^l ±0.02	0.6 ^l ±0.01	5480 ⁿ ±54.8	1072.8 ⁿ ±27.8	1665.6 ⁿ ±41.6	0.53 ^g ±0.00	14.9 ^f ±0.13	160.8 ⁿ ±2.52
	Xylan	1.080 ^l ±0.02	0.6 ^l ±0.01	2040 ^o ±53.1	478.5 ^o ±8.13	1729.7 ^o ±32.8	0.27 ^d ±0.00	9.3 ^{ad} ±0.05	46.3 ^o ±1.91

$\mu_{\max}$: maximum specific growth rate, tg: generation time, $X_{\max}$: maximum cell concentration, P_x: productively in biomass, r_s: average rate of substrate conversion, Y_{X/COD}: substrate yield coefficient (mg biomass/mg COD of substrate, P_L: lipid productivity. Within the same column, means having different superscripts are significantly different (p < 0.05) by Tukey test.

The highest ($p<0.05$) maximum specific growth rate obtained with monosaccharides was 0.768 d^{-1} , achieved in cultures with glucose, resulting in a generation time of 0.9 d. For the disaccharides, trehalose showed the highest ($p<0.05$) maximum specific growth rate (1.032 d^{-1}), in parallel with a generation time of 0.6 d. Among the polysaccharides, the cassava starch, maltodextrin and xylan showed the highest ($p<0.05$) maximum specific growth rates (1.08 d^{-1}) with generation times of 0.6 d.

In terms of maximum cell biomass, the best performance for monosaccharides was 5540 mg/L with fructose. For disaccharides, the value was 3080 mg/L for trehalose and, finally, for the polysaccharides, 5480 mg/L was obtained with maltodextrin. A value very close to the maltodextrin was obtained with cassava starch (5280 mg/L) for the polysaccharides.

Additionally, considering the parameter of biomass productivity, the highest values ($p<0.05$) for monosaccharides were obtained with fructose (600.7 mg/L/d). For disaccharides, the highest ($p<0.05$) biomass productivity was obtained with trehalose (740.4 mg/L/d). In the study with polysaccharides, the maltodextrin was the carbohydrate most suitable for biomass production (1072.8 mg/L/d), followed by cassava starch (1024.3 mg/L/d).

The highest average rate of substrate consumption for monosaccharides was verified with the mannose (3185.7 mg/L/d). The fructose shows the highest ($p<0.05$) substrate yield coefficient ($0.67\text{ mg}_{\text{biomass}}/\text{mg}_{\text{CODfructose}}$). For the disaccharides, the sucrose showed the highest ($p<0.05$) average rate of substrate consumption (1668.5 mg/L/d). Trehalose showed the highest ($p<0.05$) substrate yield coefficient ($0.42\text{ mg}_{\text{biomass}}/\text{mg}_{\text{CODtrehalose}}$), value statistically equal to mannose. Hi-maize® was the polysaccharide with the highest ($p<0.05$) average rate of substrate consumption (2328.7 mg/L/d), although maltodextrin showed the highest ($p<0.05$) substrate yield coefficient ($0.53\text{ mg}_{\text{biomass}}/\text{mg}_{\text{CODmaltodextrin}}$).

Fructose was the monosaccharide that provided the largest lipid accumulation (12.5 %), in parallel with the highest ($p<0.05$) lipid productivity (73.9 mg/L/d). For disaccharides, cultivations with sucrose showed the highest ($p<0.05$) lipid content (13.7 %), although trehalose was the organic carbon source more efficient to the lipid production (74.6 mg/L/d). Finally, the cyanobacteria *Phormidium* sp. cultivated with cassava starch and maltodextrin showed lipid contents of 14.8 and 14.9 %, in parallel with lipid productivities of 152.1 and 160.8 mg/L/d, respectively.

The results obtained are very scattered in relation to literature, making it difficult to compare. However, the results of Markou and Georgakakis (MARKOU & PLAXTON, 2003),

who evaluated heterotrophic growth kinetics for four cyanobacteria species (*Spirulina platensis*, *Anabaena variabilis*, *Nostoc* sp. and *Phormidium* sp.) in monosaccharides (glucose, fructose, and sucrose) indicate best performances for the culture of *Anabaena variabilis* in fructose (generation time of 1.5 d). This result was 2.5 times higher than the value reported by this study for cassava starch, maltodextrin, xylan and trehalose (generation times of 0.6 d).

The fatty acids profile (Table 2) of lipid fraction of biomass indicated twenty-one different compounds with carbon chain lengths from four up to eighteen carbons. Among the different fatty acids only the palmitic (C16:0) has been identified for all exogenous carbon sources studied. Cultivations with monosaccharides, with the exception of xylose (39.85 %), showed dominance in saturated fatty acids (89 to 100 %). Similar behavior was verified in disaccharides where saturated fatty acids were predominant, with concentrations varying between 72.02 to 100 % for all sources studied. For polysaccharides, saturated fatty acids were also predominant (76.11 to 100 %) with the exception of the cultivations with maltodextrin (37.74 %). Independent of the carbohydrate class considered the heterotrophic culture of *Phormidium* sp. demonstrated to encourage the saturated lipid production. Five of the fifteen carbon sources showed totally saturated profile. Only for maltodextrin and xylose it was verified a different pattern.

Table 2 Fatty acid profiles.

Methyl ester (%)	Arb	Fru	Gal	Glc	Man	Xls	Lac	Mlt	Scs	Tls	CMC	CaS	Hm	Mdt	Xln
(C4:0)	ND	ND	ND	ND	ND	0.89	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(C6:0)	ND	ND	ND	ND	3.85	2.54	ND	6.95	ND	1.18	ND	65.29	4.13	ND	1.98
(C8:0)	47.05	36.42	44.66	37.22	56.51	1.21	61.89	7.50	ND	22.81	84.53	5.39	63.03	ND	28.65
(C10:0)	ND	26.60	30.92	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	53.70
(C12:0)	ND	ND	ND	3.10	ND	ND	ND	3.47	14.18	ND	ND	ND	2.37	4.68	0.97
(C13:0)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5.05	ND	ND	ND	ND	2.25
(C14:0)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5.42	0.87	ND	ND	ND	ND	ND
(C14:1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.13	0.83	ND	ND	ND	ND	ND
(C15:0)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.56	ND	ND	ND	ND	ND
(C15:1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.31	ND	ND	ND	ND	ND
(C16:0)	30.33	36.98	24.41	49.31	30.98	35.22	29.17	43.67	38.04	29.18	15.47	5.43	20.84	26.13	10.50
(16:1)	ND	ND	ND	5.88	ND	ND	ND	ND	ND	0.92	ND	ND	ND	4.36	ND
(C17:0)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.12	ND	ND	ND	ND	ND
(C17:1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.46	10.34	ND
(C18:0)	11.62	ND	ND	4.48	ND	ND	8.94	13.20	16.34	10.23	ND	ND	7.12	6.93	1.94
(C18:1n9t),(C18:1n9c)	10.99	ND	ND	ND	ND	18.52	ND	12.14	12.26	17.88	ND	23.88	ND	34.62	ND
(C18:2n6t)	ND	ND	ND	ND	8.65	41.62	ND	13.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(C18:2n6c)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.84	ND	ND	ND	ND	ND
(C18:3n6)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.92	ND
(C18:3n3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9.61	4.18	ND	ND	ND	ND	ND
SFAs (%)	89.00	100.00	100.00	94.12	91.35	39.85	100.00	74.80	74.00	72.02	100.00	76.11	97.54	37.74	100.00
MUFAs (%)	11.00	ND	ND	5.88	ND	18.52	ND	12.15	26.00	25.21	ND	23.88	2.46	49.33	ND
PUFAs (%)	ND	ND	ND	ND	8.65	41.62	ND	13.06	ND	1.86	ND	ND	ND	12.92	ND

Arb: arabinose, CaS: cassava starch, CMC: carboxymethylcellulose, Fru: fructose, Gal: galactose, Glc: glucose, Hm: Hi-maize®, Lac: lactose, Mdt: maltodextrin, Mlt: maltose, Man: mannose, Scs: sucrose, Tls: trehalose, Xln: xylan, Xls: xylose, ND: not detected, SFAs: saturated fatty acids, MUFAs: monounsaturated fatty acids, PUFAs: polyunsaturated fatty acids

An inherent behavior of the dynamics of pH observed in the experiments can be seen representatively in Figures 1 and 2. The cultures with arabinose, carboxymethylcellulose, galactose, lactose, sucrose and xylose showed a decrease in the initial pH value in parallel with a very low heterotrophic growth performance. On the other hand, in cultivations with cassava starch, fructose, glucose, Hi-maize®, maltodextrin, maltose, trehalose and xylan, this behavior was not observed. For these carbohydrates, a increasing pH dynamics is observed at an early stage of the cultivations, together with substantial growth performances. In these conditions, the cellular growth seems to be closely related to the dynamics of pH.

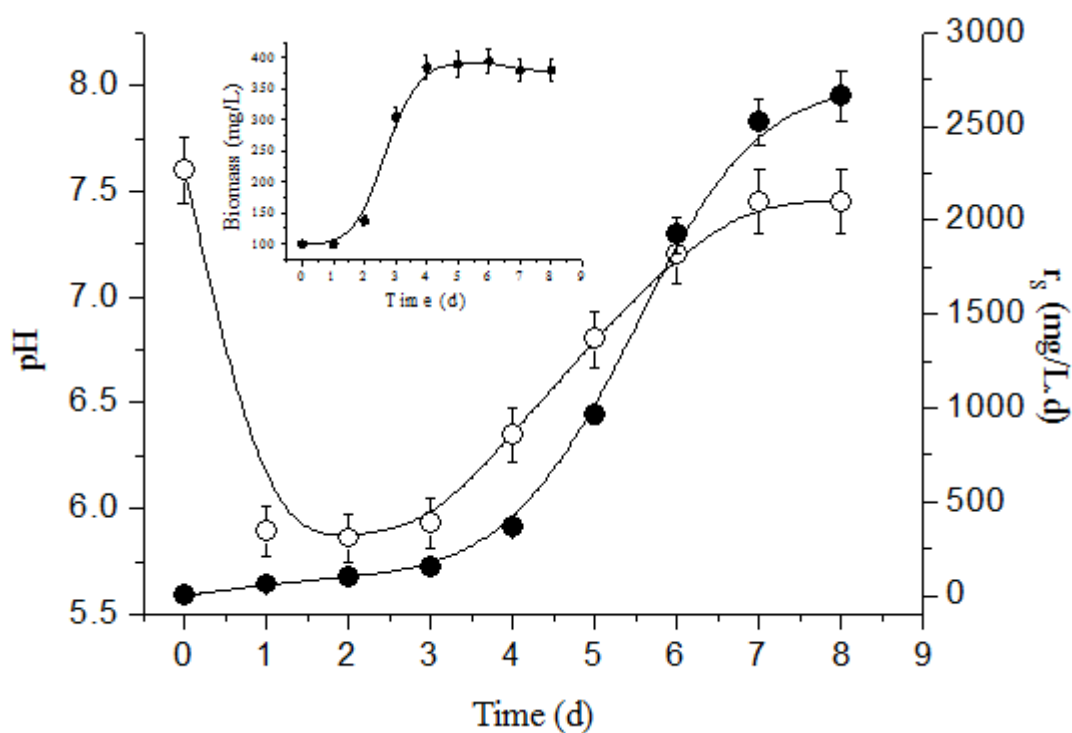


Figure 1 Dynamic of pH (open circle) and consumption rate of arabinose (closed circle) vs. time (main figure) and cell growth profile (secondary figure).

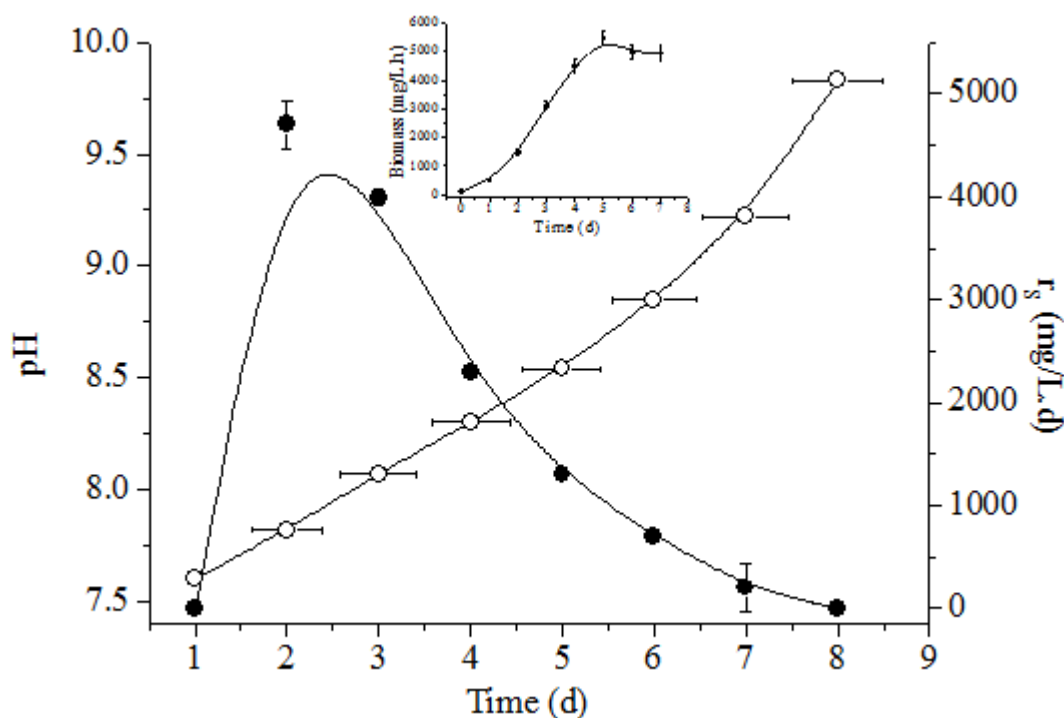
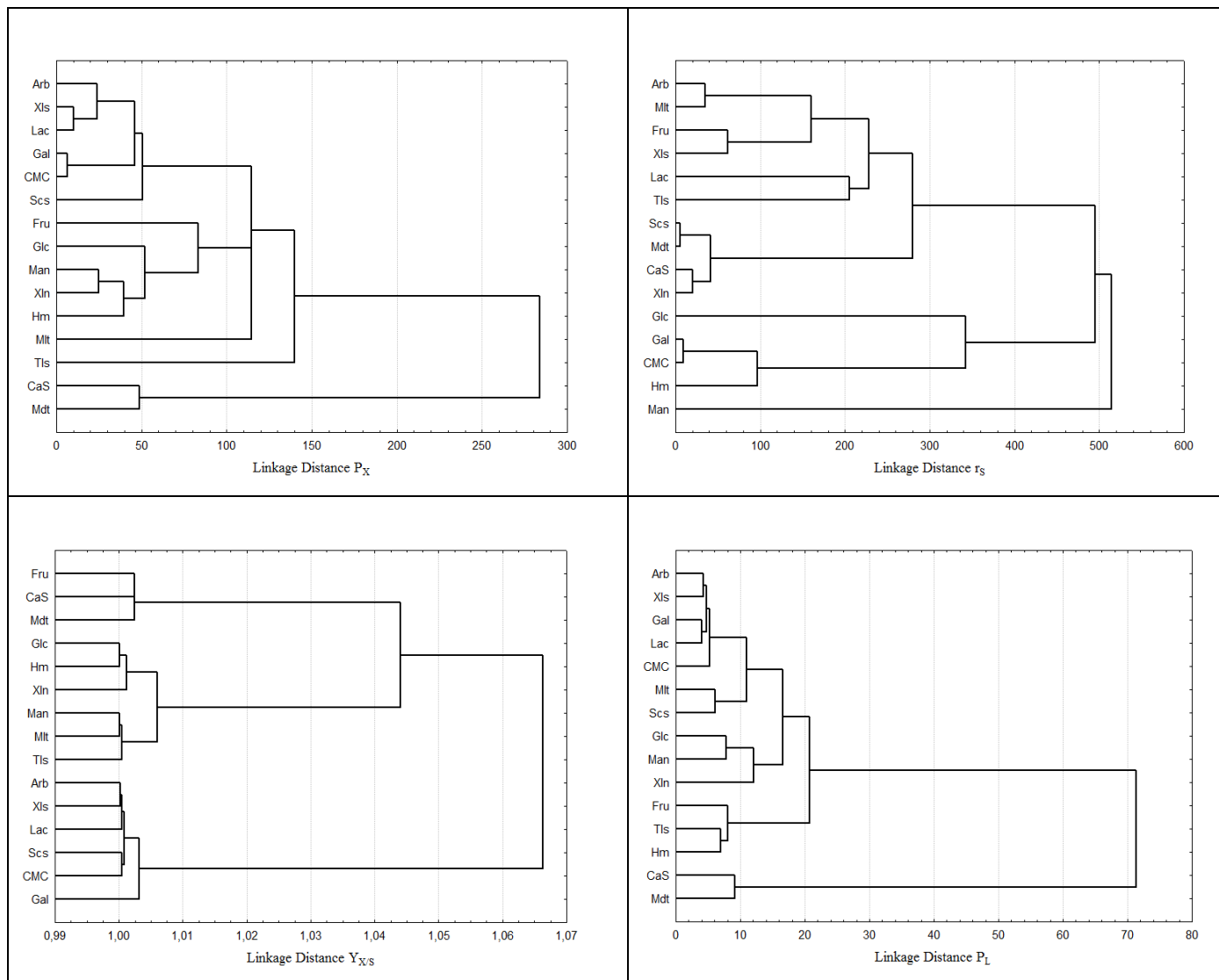


Figure 2 Dynamic of pH (open circle) and consumption rate of maltodextrin (closed circle) vs. time (main figure) and cell growth profile (secondary figure).

In addition, a general question facing researchers in many areas of research is how to organize observed data into meaningful structures, that is, to develop taxonomies. Cluster analysis is an effective generic method for examining experimental data with the view of uncovering or discovering groups or clusters of homogeneous observations. Using cluster analysis techniques the objects can be summarized into a relatively small number of groups or clusters. The objects in the same cluster are resemble to each other and are different from those in other clusters in some respects. The results of a clustering technique are generally reported in a plot, the dendrogram, where the ordinate is the similarity between groups and the abscissa has no specific meaning, but it is used only to separate the clusters. In this sense, the Figure 3 shows the dendrograms for biomass productivity (P_x), average rate of substrate consumption (r_s), substrate yield coefficient ($Y_{x/s}$) and lipid productivity (P_L) for different monosaccharides, disaccharides and polysaccharides.



Arb: arabinose, CaS: cassava starch, CMC: carboxymethylcellulose, Fru: fructose, Gal: galactose, Glc: glucose, Hm: Hi-maize[®], Lac: lactose, Mdt: maltodextrin, Man: mannose, Mlt: maltose, Scs: sucrose, Tls: trehalose, Xln: xylan, Xls: xylose.

Figure 3 Cluster dendrograms for productivity of biomass (P_X), substrate consumption rate (r_s), conversion factor substrate in cells ($Y_{X/S}$) and lipid productivity (P_L).

For biomass productivity (P_X), the dendrogram shows two distinct sets of clusters: cluster 1 (maltodextrin and cassava starch), and cluster 2 (trehalose, maltose, Hi-maize[®], xylan, mannose, glucose, fructose, sucrose, carboxymethylcellulose, galactose, lactose, xylose and arabinose). However, in cluster 2, it is possible to view the formation of six

subclusters: subcluster 1 (trehalose), subcluster 2 (maltose), subcluster 3 (Hi-maize[®], xylan, mannose, glucose and fructose), subcluster 4 (sucrose), subcluster 5 (carboxymethylcellulose and galactose) and subcluster 6 (lactose, xylose and arabinose).

In the average rate of substrate consumption (r_s) parameter, two clusters are also clearly shown: cluster 1 (mannose) and cluster 2 (Hi-maize[®], carboxymethylcellulose, galactose, glucose, xylan, cassava starch, maltodextrin, sucrose, trehalose, lactose, xylose, fructose, maltose and arabinose). In cluster 2, it is possible to view the formation of five subclusters: subcluster 1 (Hi-maize[®], carboxymethylcellulose, galactose and glucose), subcluster 2 (xylan, cassava starch, maltodextrin and sucrose), subcluster 3 (trehalose and lactose), subcluster 4 (xylose and fructose) and subcluster 5 (maltose and arabinose).

Three sets of clusters are visibly apparent in the substrate yield coefficient ($Y_{X/S}$) parameter: cluster 1 (fructose, cassava starch and maltodextrin), cluster 2 (glucose, Hi-maize[®], xylan, mannose, maltose and trehalose) and cluster 3 (arabinose, xylose, lactose, sucrose, carboxymethylcellulose and galactose).

Finally, two main sets of clusters were formed for the lipid productivity parameter (P_L): cluster 1 (maltodextrin and cassava starch) and cluster 2 (Hi-maize[®], trehalose, fructose, xylan, mannose, glucose, sucrose, maltose, carboxymethylcellulose, lactose, galactose, xylose and arabinose). In cluster 2, it is possible to view the formation of four subclusters: subcluster 1 (Hi-maize[®], trehalose and fructose), subcluster 2 (xylan, mannose and glucose), subcluster 3 (sucrose and maltose) and subcluster 4 (carboxymethylcellulose, lactose, galactose, xylose and arabinose).

Discussion

All the exogenous organic compounds that support the heterotrophic growth of cyanobacteria can be metabolized via oxidative pentose-phosphate pathway (KNOWLES & PLAXTON, 2003). Heterotrophic cyanobacteria possess structurally specific mechanisms for the active transport of the organic growth substrate into the cell. The rates at which carbohydrates are taken up by specific strains have been shown to vary (WOLK & SHAFFER, 1976). The primary requirement for the utilization of an organic compound is its transport across the cell membrane and its entry into the cell. The permeability of this membrane varies

according to the organic substance, and it may depend on the presence of specific carriers which mediate the uptake of a particular substance. The heterotrophic cyanobacteria have an inducible active carbohydrate symport system responsible for uptake of these molecules from the medium. The induction of this transporter is achieved by some specific sugars. In general, in cultivations with suitable concentration and type of sugars, the symport system is induced to promote the alkalization of the culture media by a net movement of protons accompanied of sugar uptake. The rate of the increase in pH fundamentally depends on the concentration and type of sugar used (WOLK & SHAFFER, 1976; HONG & LEE, 2007). In the absence of such transport mechanisms, substrates may still enter the cell by means of passive diffusion along a concentration gradient. The rate of diffusion, however, is generally inadequate to support energy metabolism and robust growth in the dark (FAY, 1983).

Besides glucose, the uptake of many carbohydrates is through the pentose phosphate pathway after being transformed into one of the intermediates. The most significant are the polysaccharides (starch) in addition to disaccharides (maltose, lactose, trehalose and sucrose) and monosaccharides (fructose, mannose and galactose) (OSANAI et al., 2005). For this to occur, polysaccharides and disaccharides were undergo hydrolysis into monosaccharides (KNOWLES & PLAXTON, 2003). Several enzymes are involved in these reactions and are identified in cyanobacterial cultures (FUCHS et al., 1994; GUPTA et al., 2011).

Particularly for starch, another possibility is the degradation by phosphorolysis through the reaction catalyzed by the starch phosphorylase enzyme, which catalyzes attack by inorganic phosphate on the terminal glycosyl residue at the non-reducing end of a starch molecule. The result is glucose 1-phosphate and starch (n-1) glucose units. Phosphorolysis is preferable to hydrolysis because glucose 1-phosphate yields more ATP than does free glucose when subsequently catabolized into pyruvate. Phosphorolysis produces a phosphorylated glucose (glucose-1-phosphate), which is then converted into glucose-6-phosphate, without expenditure of cellular energy (1 ATP) required for the formation of glucose-6-phosphate from free glucose. Therefore only one ATP is consumed by the glucose monomers in comparison with two ATPs consumed when the reaction starts with free glucose. Consequently, the cell gets three ATPs per glucose monomer instead of two ATPs, an economy of one ATP per glucose monomer (WOOD, 1985). Additionally, all cyanobacteria contain NADP-specific dehydrogenases in high concentrations, such as glucose-6-phosphate

dehydrogenase and 6-phospho-gluconate dehydrogenase, responsible for oxidation and decarboxylation of glucose-6-phosphate in two steps into ribulose-5-phosphate. In these multiple reactions, two molecules of NADPH are generated and subsequently oxidized during respiratory electron transport, yielding finally two molecules of ATP (PEARCE & CARR, 1969; PELROY & BASHAN, 1972).

It should be considered that polysaccharides such as glycogen and starch are the major endogenous reserve of oxidizable substrates in cyanobacteria. These reserves, in the absence of exogenous carbon source, serve to maintain the level of ATP in the cell in a process coupled to an aerobic respiratory phosphorylating electron transport chain (SMITH, 1982). The cyanophycean starch (composed of α -1,4-glucan) is similar to glycogen and to the amylopectin fraction of starch found in higher plants which is deposited in tiny granules between the thylacoides (VAN DEN HOEK et al., 1995). In these sense, the cells are fully adapted to this substrate, and their use as exogenous carbon source results in a suitable substrate for heterotrophic growth of cyanobacteria. The bioenergetics of starch uptake associated with endogenous acclimation processes explains the substantial performances of *Phormidium* sp. in starch (cassava starch) and its modified forms such as maltodextrin.

Therefore, these polysaccharides were unique among the carbohydrates tested, considering the biomass and lipid productivity. Additionally, fructose can be grouped with these carbon sources if considering the substrate yield coefficient, as evidenced by cluster analysis. Finally, to establish a particular carbohydrate as an exogenous carbon source in culture of the *Phormidium* sp. both kinetic performance and economic aspects should be considered, given that about 80% of the total production cost, in heterotrophic systems, is related to the organic substrates (LI & XU, 2007; LU et al., 2010).

Conclusions

Several monosaccharides, disaccharides and polysaccharides support the heterotrophic growth of *Phormidium* sp., although maltodextrin and cassava starch are the most efficient exogenous carbon sources for heterotrophic production of intracellular bioproducts.

Phormidium sp. seems to translocate protons across membranes, in particular conditions, to regulate the intracellular pH within a range that is compatible with cellular

metabolism. The capacity of alkalization of culture medium by the cyanobacteria is directly related to growth performance in a particular exogenous carbon source.

The heterotrophic culture of *Phormidium* sp. based in carbohydrates as carbon source, in general, induced the production of saturated fatty acids profiles.

Finally, in order to assess a suitable exogenous carbon source for heterotrophic culture of *Phormidium* sp., more than one kinetic parameter or a particular kinetic parameter can be considered, as evidenced by multivariate cluster analysis, and the choice, generally determined by economic considerations, must be established in the selection of particular carbon sources.

Acknowledgements

Funding for this research was provided by São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil).

References

- AL-THUKAIR, A.A.; ABED, R.M.M.; MOHAMED, L. Microbial community of cyanobacteria mats in the intertidal zone of oil-polluted coast of Saudi Arabia. *Mar Pollut Bull*, v.54, p.173–179, 2007.
- APHA, AWWA, WEF (American Public Health Association, American Waterworks Association. Water Environmental Federation). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21st (ed)* Prot City Press, Baltimore, Maryland, 2005.
- 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.
- CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O.; RAMOS, A.; LEMUS, R.; GOMEZ-LOJERO, C.; TRAVIESO, L. Growth of *Phormidium* sp. in aerobic secondary piggery wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.42, p.487-491, 1994.
- FAY, P. *The Blue-Greens (Cyanophyta – Cyanobacteria)*, The Institute of Biology's, Studies in Biology n° 160, Ed. Edward Arnold, 1983.
- FUCHS, B.; SUTTNER, P.; STERNER, S.; WASTLHUBER, R.; LOOS, E. Disproportionating transglycosylase (D-Enzyme) in green algae and cyanobacteria. Partial purification and characterization, *Zeitschrift für Naturforschung*, v.49, p.163-170, 1994.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on October, 2013.

GUPTA, V.; NATARAJAN, C.; KUMAR, K.; PRASANNA, R. Identification and characterization of endoglucanases for fungicidal activity in *Anabaena laxa* (Cyanobacteria). J Appl Phycol, v.23, p.73-81, 2011.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. A rapid determination of fatty acid methyl esters from lipids. Laboratory Practice, v.22, p.475-476, 1976.

HONG, S.J.; LEE, C.G. Evaluation of central metabolism based on a genomic database of *Synechocystis* PCC6803. Biotechnol Bioproc Eng, v.12, p.165-173, 2007.

KNOWLES, V.L.; PLAXTON, W.C. From Genome to Enzyme: Analysis of Key Glycolytic and Oxidative Pentose-Phosphate Pathway Enzymes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant Cell Physiol, v.44, p.758-763, 2003.

LEE, Y.K. In: RICHMOND, A. (ed), Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Publishing, Oxford, 2004.

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

LU, Y.; ZHAI, Y.; LIU, M.; WU, Q. Biodiesel production from algal oil using cassava (*Manihot esculenta* Crantz) as feedstock. J Appl Phycol, v.22, p.573-578, 2010.

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. Appl Energy, v.88, p.3389-3401, 2011.

OSANAI, T.; KANESAKI, Y.; NAKANO, T.; TAKAHASHI, H.; ASAYAMA, M.; SHIRAI, M.; KANEHISA, M.; SUZUKI, I.; MURATA, N.; TANAKA, K. Positive Regulation of Sugar Catabolic Pathways in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the Group 2 Factor SigE. J Biol Chem, v.35, p.30653-30659, 2005.

PEARCE, J.; CARR, N.G. The incorporation and metabolism of glucose by *Anabaena variabilis*. J Gen Microbiol, v.54, p.451-462, 1969.

PELROY, R.A.; BASSHAN, J.A. Photosynthetic and dark carbon metabolism in unicellular blue-green algae. Archiv für Mikrobiologie, v.86, p.25-38, 1972.

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

PEREZ-GARCIA, O.; BASHAN, Y.; PUENTE, M.E. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. Journal of Phycology, v.47, p.190-199, 2011b.

POOLE, R.J. Energy coupling for membrane transport. Annu Rev Plant Physiol, v.29, p.437-460, 1978.

QUEIROZ, M.I.; HORNES, M.O.; SILVA-MANETTI, A.G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica Ngeli* cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. Appl Energy, v.88, p.3438-3443, 2011.

RABOY, B.; PADAN, E. Active transport of glucose and α -methylglucoside in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. J Biol Chem, v.253, p.3287-3291, 1978.

REYES-SOSA, F.M.; MOLINA-HEREDIA, F.P.; DE LA ROSA, M.A. A novel α -amylase from the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7119. Appl Microbiol Biotechnol, v.86, p.131-141, 2010.

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.

SMITH, A.J. In: CARR, N.G.; WHITTON, B.A. (ed) Modes of cyanobacterial carbon metabolism. The Biology of Cyanobacteria, University of California Press, Berkeley, 1982.

STATSOFT, Inc. STATISTICA for Windows (Computer program manual), 2004. <http://www.statsoftinc.com>

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. Algae – An Introduction to Phycology. Press Syndicate of the University of Cambridge 27, New York, 1995.

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

WOLK, C.P.; SHAFFER, P.W. Heterotrophic micro- and macrocultures of a nitrogen-fixing cyanobacterium. Arch Microbiol, v.100, p.145-147, 1976.

CAPÍTULO III

Apresentação

Finalizada a primeira etapa do projeto, o amido de mandioca foi selecionado para a realização dos estudos das condições de cultivo. A seleção do amido de mandioca comercial deu-se devido aos resultados obtidos e ao fato de apresentar um custo inferior quando comparado com outros carboidratos analisados. O capítulo em questão, composto pelo artigo intitulado de “Produção de biodiesel de 3ª geração a partir do cultivo de cianobactéria”, aborda a otimização das condições de cultivo, temperatura e razão carbono/nitrogênio, da *Phormidium* sp. empregando-se o amido de mandioca como fonte de carbono orgânico bem como a análise das propriedades do biodiesel obtido.

Produção de biodiesel de 3ª geração a partir de cianobactéria

Biodiesel production of third generation from cyanobacteria

Érika Cristina Francisco^I Mariana Manzoni Maroneze^{II} Eduardo Jacob-Lopes^{II} Telma
Teixeira Franco^I

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o biodiesel de 3ª geração produzido a partir do cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. empregando amido de mandioca como fonte de carbono orgânico. Um planejamento experimental foi realizado para determinar as condições ótimas de temperatura e razão carbono/nitrogênio (C/N). A partir da obtenção das melhores condições de cultivo, desenvolveram-se cultivos em batelada e batelada com alimentação descontínua em biorreator e avaliou-se determinadas propriedades do biodiesel produzido. Os resultados indicaram que a temperatura de 30°C e a razão C/N de 68 são as condições ideais do processo. As maiores produtividades em biomassa (50,41mg/L.h) e lipídica (7,49mg/L.h) foram obtidas no cultivo em batelada. Os ácidos graxos com maior representatividade foram os ácidos capríco (65,29%) e oléico (23,88%). As propriedades de combustão do biodiesel: conteúdo de ésteres (99,9%), número de cetano (54,88), índice de saponificação (406,82), índice de iodo (21,47gI₂ 100g⁻¹), grau de instauração (23,88%) e ponto de entupimento de filtro a frio (39,21°C) se mostraram adequadas às principais normativas nacionais e internacionais.

Palavras chaves: cianobactéria, biodiesel, cultivo heterotrófico, amido de mandioca.

^IFaculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

^{II}Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 98400-000, Santa Maria, RS, Brasil.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the third generation of biodiesel produced from heterotrophic cultivation of the cyanobacteria *Phormidium* sp. employing cassava starch as source of organic carbon. An experimental design was performed to determine the optimal conditions of temperature and carbon/nitrogen ratio (C/N). From the best growing conditions, have developed cultivations in batch and fed-batch in a bioreactor and evaluated the biodiesel quality. The results indicate that the temperature of 30°C and the C/N ratio of 68 are the ideal conditions of the process. The highest biomass productivity (50,41mg/L.h) and lipid productivity (7,49mg/L.h) were obtained in batch cultivations. The fatty acids most representative were caproic acid (65,29%) and oleic acid (23,88%). The fuel properties of biodiesel: ester content of 99.9%, cetane number of 54,88, iodine value of 21,47 gI100g⁻¹, unsaturation degree of 23,88% and a cold filter plugging point of 39,21°C, comply with the main international and national standards.

Key words: cyanobacteria, biodiesel, heterotrophic culture, cassava starch.

INTRODUÇÃO

A grande dependência pelos combustíveis fósseis levou ao surgimento de discussões sobre questões como a poluição atmosférica e a escassez dos recursos energéticos, direcionando ao desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de fontes de energias alternativas e renováveis, como os combustíveis de 1ª a 4ª geração (MARTÍN & GROSSMANN, 2012). Os biocombustíveis de 3ª geração são obtidos a partir do cultivo de cianobactérias, que possuem a capacidade de acumular óleo na célula, que após extração, são transesterificados para a obtenção do biodiesel (MATA et al., 2010; HADDAD & FAWAZ, 2013).

As cianobactérias estão classificadas em um grande grupo de micro-organismos fotossintetizantes. Algumas espécies apresentam obrigatoriamente o metabolismo fotossintético, embora outras sejam capazes de crescer sob condições heterotróficas na total ausência de luminosidade e presença de uma fonte de carbono orgânico. Os cultivos heterotróficos superam algumas limitações dos sistemas fotossintéticos, como a dependência de luz, podendo viabilizar a produção de bioprodutos como lipídeos, proteínas, carboidratos e pigmentos (SUALI & SARBATHY, 2012). Os cultivos heterotróficos são

conhecidos por resultarem em elevadas produtividades de bioprodutos (MOHAMED et al., 2011). Um fator determinante nos cultivos heterotróficos é a escolha da fonte de carbono orgânico utilizado, que representa uma dos principais obstáculos para a aplicação industrial. O substrato orgânico é estimado em cerca de 80% do custo total do processo, podendo inviabilizar economicamente o processo. Uma alternativa aos elevados custos é a substituição de determinadas fontes de carbono orgânico por substratos de baixo custo, como amidos e soluções de celulose hidrolisada, podendo reduzir os custos em até 40% (XU et al., 2006; LI et al., 2007). Além dos substratos orgânicos sintéticos, resíduos industriais têm sido considerados alternativas promissoras para a minimização do custo dos meios de cultura para o cultivo de cianobactérias (PEREZ-GARCIA et al., 2011, QUEIROZ et al., 2013).

Em face disto, o objetivo do estudo foi avaliar o biodiesel de 3ª geração produzido a partir do cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. empregando amido de mandioca como fonte de carbono orgânico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismo e meio de cultura

A cianobactéria utilizada foi a *Phormidium* sp., isolada pelo professor Eduardo Jacob-Lopes (Universidade Federal de Santa Maria) do Deserto Cuatro Cienegas no México (26°59'N 102°03'W). Após purificação, as culturas estoque foram mantidas em tubos de ensaio contendo meio sintético BG11 (RIPPKA et al., 1979) solidificado com agar-agar (20g/L). As condições de manutenção foram 25°C e intensidade luminosa constante de 1klux.

O meio sintético BG11 suplementado com amido de mandioca, como fonte de carbono orgânico exógeno, foi empregado como meio de cultura. As diferentes razões carbono/nitrogênio (C/N) foram obtidas a partir da estequiometria do meio e de uma curva padrão construída com diferentes concentrações do amido de mandioca expresso em termos de demanda química de oxigênio (DQO) como expressos na Tabela 1 (APHA, 2005).

Tabela 1: Valores das variáveis independentes para os diferentes níveis do delineamento experimental e concentrações de amido de mandioca utilizados.

Variável independente e fonte de carbono orgânico	Símbolo	Nível				
		-1.41	-1	0	1	+1.41
Temperatura (°C)	X ₁	23	25	30	35	37
Razão carbono/nitrogênio (C/N)	X ₂	12	20	40	60	68
Concentração amido (mg/L)		2,5	4,0	8,2	12,3	14,0

Planejamento experimental

O planejamento experimental e as análises estatísticas foram realizados utilizando o software Statistica 7.0 (STATSOFT, Tulsa, OK, USA). A partir de um planejamento composto central com cinco níveis e três repetições no ponto central foi avaliado a relação entre as condições de cultivo (variáveis independentes) e os parâmetros cinéticos do processo (variáveis dependentes). As condições de cultivo estudadas foram temperatura (23, 25, 30, 35 e 37°C) e razão C/N (12, 20, 40, 60 e 68) e como respostas avaliaram-se a produtividade de biomassa, a taxa de consumo do substrato e o coeficiente de conversão do substrato em células. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinar as condições ótimas de temperatura e razão C/N.

Cultivo em Erlenmeyers

A otimização do processo, mediante o planejamento experimental, foi realizada a partir do cultivo em frascos Erlenmeyers de 250mL, sendo o volume nominal de trabalho de 150mL, utilizando agitador orbital. Os frascos utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos e a inoculação foi realizada assepticamente. As condições experimentais foram: meio sintético BG11 nas razões C/N e temperatura, descritas pelo planejamento experimental, concentração inicial do inóculo de 100mg/L, pH ajustado a 7,8 e agitação constante de 150rpm.

Cultivos em biorreatores

Os cultivos em biorreator foram realizados em reator de coluna de bolhas construído de vidro borossilicato, coberto por papel alumínio, com um diâmetro externo de 12,5cm e uma altura de 16cm, resultando numa relação altura/diâmetro (L/D) igual a 1,28. O volume total do frasco bem como o volume nominal de trabalho foi de 2,0L. O sistema de dispersão de ar consiste em um difusor de 2,5cm de diâmetro localizado no interior do reator. A vazão de ar foi controlada por rotâmetros (precisão $\pm 5\%$), a entrada de oxigênio e a saída dos gases foram filtradas através de unidades filtrantes Millex-FG® de 0,22 μ m de diâmetro.

Operacionalmente, dois modos de operação foram avaliados: operação descontínua e descontínua alimentada. As condições de cultivos foram: concentração celular inicial de 100mg/L, aeração constante de 1,0VVM (volume de ar por volume de meio por minuto), pH ajustado a 7,8, temperatura de 30°C e ausência de luminosidade. Adotou-se uma razão C/N de 68 através da adição de 14,0g/L do amido de mandioca ao meio BG11. A alimentação nos cultivos descontínuos alimentados foram realizadas assim que demanda química de oxigênio (DQO) atingisse a faixa de 6,0g/L. A alimentação foi realizada através de uma solução concentrada do amido (7,0g/L), a fim de ajustar a DQO do meio à concentração de 14,0g/L.

Amostragem e métodos analíticos

As amostragens foram realizadas de forma asséptica a cada 24 horas durante a fase de crescimento do micro-organismo. A dinâmica do pH para os cultivos em biorreator, foi determinada por potenciômetro e a concentração celular através de gravimetria por meio da filtração de um volume conhecido em filtro 0,45 μ m de diâmetro. A concentração de carbono orgânico, expressa em termos de demanda química de oxigênio (DQO) foi determinada por método colorimétrico segundo metodologia proposta por APHA (APHA, 2005).

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 e Dyer (1959) modificado e a quantidade de lipídeos foi determinada por gravimetria. A saponificação e esterificação (metilação) do extrato lipídico seco foram realizadas através do método de Hartman e Lago (1976) obtendo-se o biodiesel. A análise qualitativa e quantitativa dos lipídeos produzidos 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 área de normalização.

As propriedades da qualidade do biodiesel foram determinadas de acordo com metodologia proposta por Francisco et al., (2010). Avaliou-se o conteúdo de ésteres (EC), número de cetano (NC), índice de saponificação (IS), índice de iodo (II), o grau de instauração (GI), fator de comprimento da cadeia (FCC) e o ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF).

Análise dos dados cinéticos

Os dados de concentração de biomassa foram utilizados na obtenção da velocidade máxima específica de crescimento ($\ln(X/X_0) = \mu_{\max}.t$) por plotagem, onde X é a concentração celular final (mg/L), X_0 é a concentração celular inicial (mg/L), $\mu_{\max}$ é a velocidade máxima específica de crescimento (h^{-1}) e t é o tempo de residência (h); no cálculo da produtividade de biomassa ($P_x = (X_0 - X).(t - t_0)^{-1}$), sendo t_0 o tempo inicial (h). No caso dos cultivo desenvolvidos empregando alimentações, levou-se em consideração a diluição do biorreator através de correções. A concentração de carbono orgânico expressa em termos de demanda química de oxigênio, foi utilizada para calcular a velocidade de consumo do substrato ($r_s = -dS/dt$), onde S é a concentração de carbono orgânico (mg/L) 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização do processo – frascos Erlenmeyers

A Tabela 2 apresenta os parâmetros cinéticos de produção de biomassa e consumo de substrato nas diferentes condições de razão C/N e temperatura, de acordo com o planejamento experimental. Observa-se a partir da análise dos dados uma variabilidade pronunciada no desempenho do processo em função dos fatores avaliados, obtendo-se produtividades em biomassa entre 6,33 a 50,72mg/L.h, taxas de consumo de substrato entre 6,46 a 65,82mg/L.h e coeficientes de conversão do substrato em células entre 0,17 a 0,81mg células/mgDQOamido. Estes resultados quando corroborados com a Figura 1 indicam que razões C/N de 68 e temperaturas de 30°C favorecem a conversão de amido de mandioca em biomassa. Comparativamente, as máximas produtividades em biomassa evidenciadas neste

estudo (50,72mg/L.h.) são superiores aos processos similares descritos na literatura, no qual produtividades em biomassa na ordem de 36,0mg/L.h foram obtidas por Lu et al., (2011), a partir do cultivo da microalga *Chlorella protothecoides* em amido de mandioca pré-hidrolisado.

Tabela 2: Matriz codificada do efeito da temperatura e razão C/N para a produtividade de biomassa (P_x), taxa de consumo do substrato (r_s) e coeficiente de conversão do substrato em células ($Y_{x/s}$).

Experimento	Temperatura	C/N	P_x (mg/L.h)	r_s (mg/L.h)	$Y_{x/s}$ (mg/mg)
1	25	25	14,5	25,24	0,96
2	35	25	6,33	6,46	0,81
3	25	60	31,46	50,47	0,86
4	35	60	11,25	65,82	0,17
5	30	40	15,59	17,32	0,70
6	30	40	15,85	17,70	0,81
7	30	40	15,72	17,51	0,75
8	23	40	12,70	21,87	0,58
9	37	40	24,66	53,41	0,46
10	30	12	7,85	16,45	0,41
11	30	68	50,72	55,47	0,67

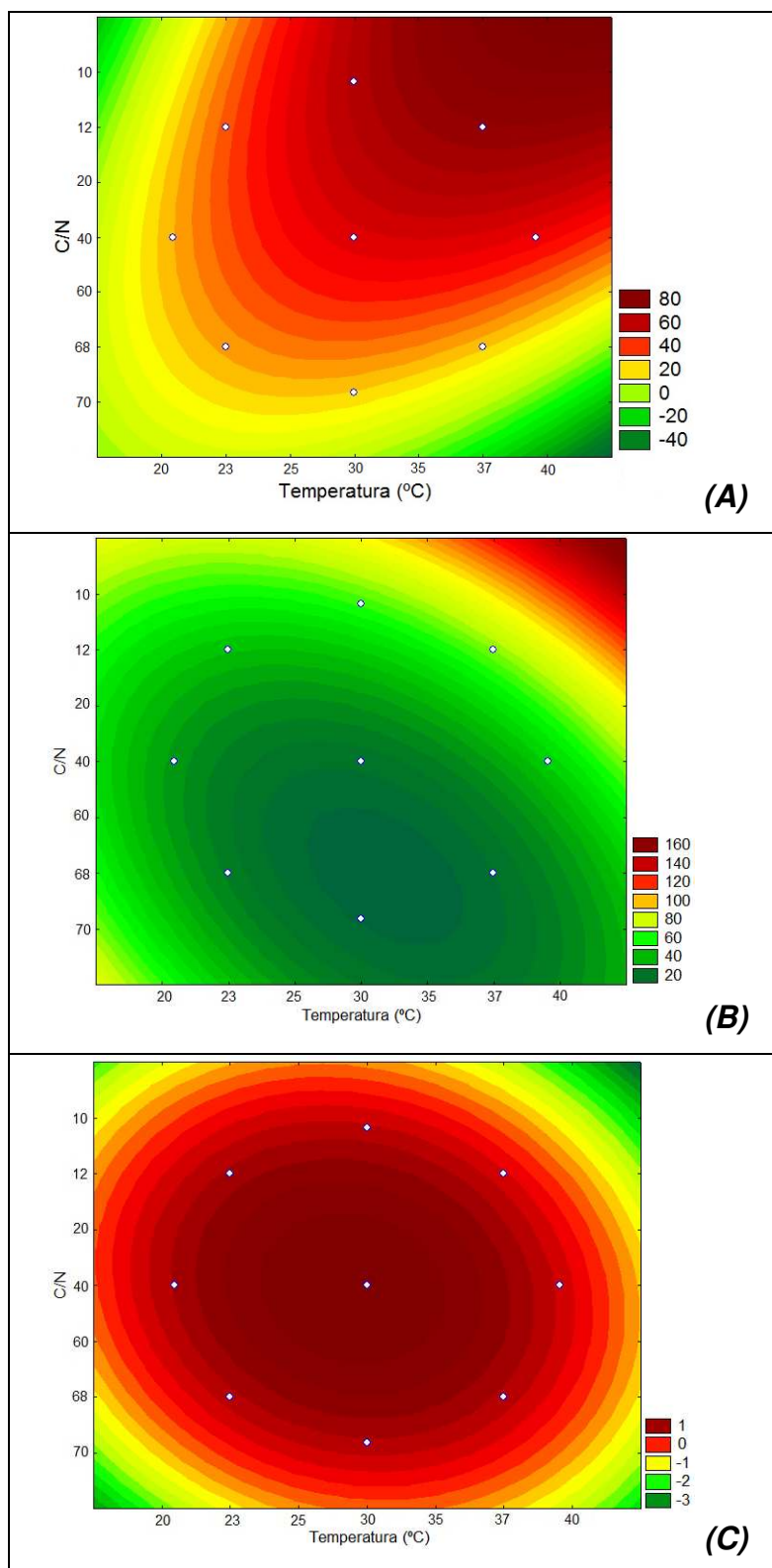


Figura 1: Diagramas de contorno para as variáveis produtividade de biomassa (A), taxa de consumo do substrato (B) e coeficiente de conversão do substrato em células (C).

Os coeficientes dos modelos, bem como o ajuste dos modelos de predição, validados a partir da distribuição F (disponíveis no material suplementar) sugerem a existência de uma relação quadrática entre as variáveis, indicando a aderência aos dados experimentais.

Cultivos em biorreator

Com base nas condições definidas na etapa anterior, C/N de 68 e temperatura de 30°C, os cultivos em biorreator foram conduzidos mediante dois modos de operação distintos (batelada e batelada alimentada descontínua). Neste sentido, os parâmetros cinéticos resultantes destes cultivos são apresentados na Tabela 3 e Figura 2. A análise dos dados indica que o cultivo em batelada apresentou taxas de consumo do substrato de 91,43mg/L.h, concentrações celulares máximas de 4960mg/L, produtividades de biomassa de 50,41mg/L.h, teor de lipídeos de 14,86% e produtividade lipídica de 7,49mg/L.h. Os cultivos em batelada alimentada, por outro lado, apresentaram menor desempenho cinético para todos os demais parâmetros, com exceção do coeficiente de conversão do substrato em células (0,82mg_{células}/mg_{DQOamido}) e das concentrações celulares máximas (9200mg/L), que foram substancialmente superiores quando comparadas aos cultivos em batelada. A definição da melhor estratégia de condução do bioprocessos, entretanto, foi realizada com base na produtividade em óleo, no qual o processo de batelada demonstrou uma capacidade produtiva 75% superior à batelada alimentada descontínua, como reflexo principalmente da baixa capacidade de acúmulo de óleo na célula nos cultivos descontínuos alimentados. De acordo com Queiroz et al., (2013) os lipídeos microbianos são produtos intracelulares, e desta forma, a produtividade lipídica global é o produto do conteúdo lipídico da célula, multiplicado pela produtividade em biomassa, o que faz da produtividade em biomassa é um critério primário na obtenção de lipídeos microbianos.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos resultantes dos cultivos em biorreator e propriedades do biodiesel.

Modo de Operação	rs (mg/L.h)	Y _{X/S} (mg _{células} /mg _{amido})		X _{máx} (mg/L)	P _X (mg/L.h)	Lipídeo (%)	P _L (mg/L.h)
Batelada	91,43	0,55		4960	50,41	14,86	6,34
Batelada com alimentação	46,29	0,82		9200	42,13	10,17	3,14
Fotobiorreator*	-	-		2800	17,30	11,70	2,10
Parâmetros biodiesel	CE (%)	CN	IS	II (gl ₂ 100g ⁻¹)	GI (%)	FCC (%)	PEFF (°C)
	99,99	54,88	406,82	21,47	23,88	12,48	39,21

*Dados obtidos a partir do cultivo autotrófico (Francisco et al., 2010), r_s : taxa de consumo do substrato, $Y_{X/S}$: coeficiente de conversão do substrato em células, $X_{máx}$: concentração celular máxima, P_X : produtividade de biomassa, P_L : produtividade lipídica, CE = conteúdo de éster, CN = número de etano, IS = índice de saponificação, II = índice de iodo, GI = grau de instauração, FCC = fator de comprimento da cadeia, PEFF = ponto de entupimento de filtro a frio.

Em termos de diferentes sistemas de metabolismo, a partir da Tabela 3, ainda podemos verificar que o cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. se sobressai aos sistemas autotróficos, que resultam em concentração máxima celular, produtividade de biomassa, quantidade de lipídeos e produtividade lipídica de 2800mg/L, 17,30mg/L.h, 11,70% e 2,10mg/L.h, respectivamente (FRANCISCO et al., 2010).

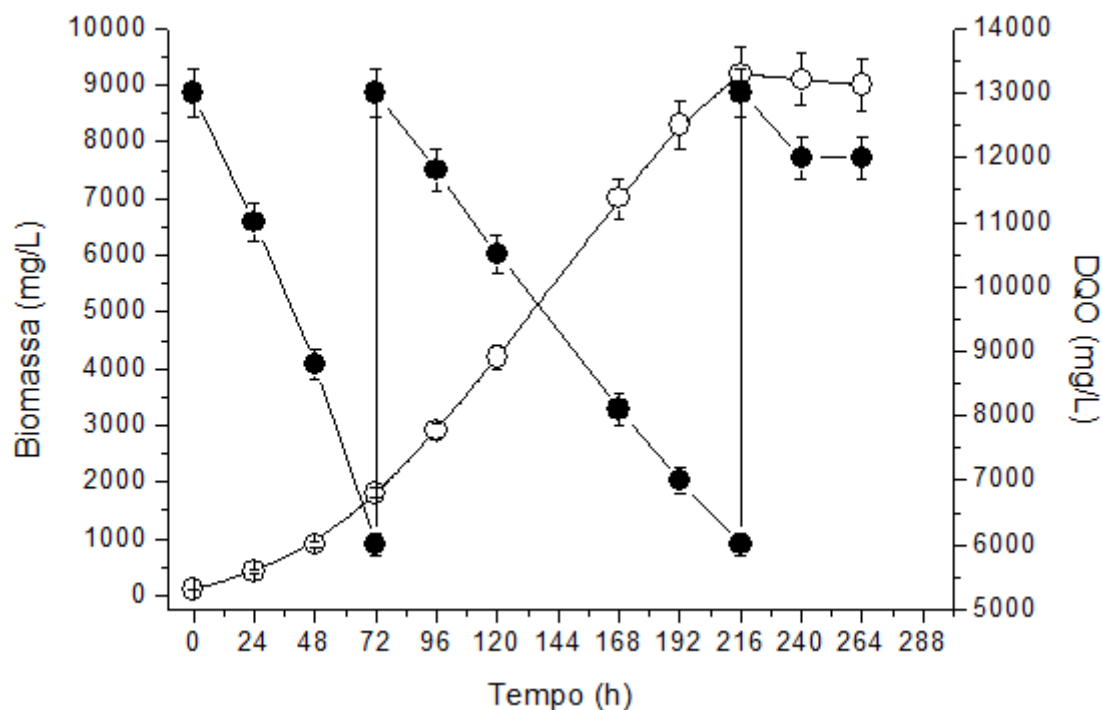


Figura 2: Crescimento celular e consumo da fonte de carbono orgânico (DQO) em batelada alimentada (círculo aberto: concentração de biomassa, círculo fechado: concentração do amido de mandioca).

Estes resultados são potencialmente atrativos para a produção de lipídeo por *Phormidium* sp., uma vez que este micro-organismo é capaz de converter eficientemente uma fonte orgânica de carbono abundantemente disponível no mercado internacional. Os processos similares, normalmente são conduzidos a partir da hidrólise enzimática deste substrato, acarretando em operações unitárias adicionais, que impactarão os custos operacionais do processo produtivo (LU et al., 2011; WEI et al., 2009).

Características do biodiesel

O perfil de ácidos graxos do lipídeo é o principal fator que determina as características do biodiesel. Ao total identificaram-se quatro diferentes ácidos graxos majoritários: ácido capríco (65,9%), ácido oléico (23,88%), ácido caprílico (5,43%) e ácido esteárico (5,39%). Desta forma, o perfil de ácidos graxos foi predominantemente saturado (76,11%) e monoinsaturado (23,88%). 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.

A composição lipídica está diretamente relacionada ao tipo de cultivo, sendo assim, a *Phormidium* sp. apresenta diferença significativa na fração lipídica quando comparada com o cultivo autotrófico, aonde verifica-se uma produção predominante de ácidos graxos monoinsaturados (63,87%), seguida de saturados (29,72%) e poli-insaturados (6,22%). O perfil de ácidos graxos neste sistema, autotrófico, se apresenta com maior variedade, resultando em um total de 26 ácidos graxos, sendo majoritários os ácidos oleico (25,92%), palmitoléico (12,29%), esteárico (12,25%), miristoléico (16,61%) e heptadecanóico (9,8%) (FRANCISCO et al., 2010).

Com base nessa matriz oleaginosa, a síntese do biodiesel produziu um combustível (Tabela 2) com conteúdo de ésteres de 99,9%, número de cetano de 54,88, o índice de saponificação de 406,82, índice de iodo de 21,47gI₂ 100g⁻¹, grau de instauração de 23,88%, fator de comprimento da cadeia de 12,48% e ponto de entupimento de filtro a frio de 39,21°C. As propriedades de combustão avaliadas são comparáveis ao biodiesel de soja (FRANCISCO et al., 2010) e estão de acordo com as normas Norte Americanas (ASTM 6751, 2002), da União Europeia (EN 14214, 2003) e brasileiras (ANP 255, 2003) para biodiesel, o que sugere a potencialidade de exploração do biodiesel obtido a partir da biomassa da *Phormidium* sp., nas condições avaliadas.

CONCLUSÃO

A produtividade em biomassa da cianobactéria *Phormidium* sp. a partir de amido de mandioca é otimizada em razões C/N de 68 e temperaturas de 30°C. O cultivo em biorreator operado descontinuamente (batelada) apresentou melhor desempenho na produção de óleos unicelulares (7,49mg/L.h) quando comparado a operação de batelada com alimentação descontínua (4,28mg/L.h). O perfil de ácidos graxos foi predominantemente saturado (76,11%), resultando em um biodiesel com propriedades de combustão dentro das principais normativas nacionais e internacionais. Neste sentido, os resultados obtidos demonstram a potencialidade de exploração deste tipo de processo para a produção de biodiesel de 3ª geração.

SUPLEMENTO

Tabela 4: Coeficientes do modelo estimados por regressão linear para as variáveis estudadas.

Fator	Efeitos	Erro Padrão	t(5)	P	Coeficientes	Estimativas por intervalo	
						-95%	+95%
Px (mg/L.h)							
Média	15,75	0,07	209,87	0,00002	15,75	15,42	16,07
X ₁ (L)	-2,88	0,09	-31,36	0,00101	-1,44	-3,28	-2,49
X ₁ (Q)	-1,15	0,10	-10,49	0,00896	-0,57	-1,62	-0,67
X ₂ (L)	20,64	0,09	224,23	0,00002	10,32	20,24	21,03
X ₂ (Q)	9,51	0,10	86,62	0,00013	4,75	9,04	9,98
X ₁ x X ₂	-6,02	0,13	-46,30	0,00046	-3,01	-6,57	-5,46
rs (mg/L.h)							
Média	17,51	0,11	159,62	0,00003	17,51	17,03	17,98
X ₁ (L)	10,29	0,13	76,48	0,00017	5,14	9,71	10,86
X ₁ (Q)	20,29	0,16	126,38	0,00006	10,14	19,60	20,98
X ₂ (L)	35,00	0,13	260,17	0,00001	17,50	34,42	35,58
X ₂ (Q)	18,60	0,16	115,86	0,00007	9,30	17,91	19,29
X ₁ x X ₂	17,06	0,19	89,81	0,00012	8,53	16,24	17,88
Y _{X/S} (mg _{biomassa} /mg _{DQOamido})							
Média	1,75	0,03	55,24	0,00032	1,75	1,61	1,89
X ₁ (L)	-0,25	0,03	-6,49	0,02288	-0,12	-0,42	-0,08
X ₁ (Q)	-1,15	0,04	-24,80	0,00162	-0,57	-1,35	-0,95
X ₂ (L)	-0,09	0,03	-2,39	0,13893	-0,04	-0,26	0,07
X ₂ (Q)	-1,13	0,04	-24,35	0,00168	-0,56	-1,33	-0,93
X ₁ x X ₂	-0,27	0,05	-4,91	0,03907	-0,13	-0,50	-0,03

Tabela 5: Análise de variância para o ajuste do modelo.

Fonte Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{calc}
Px (mg/L.h)				
Regressão	1629,77	1	1629,772	45000,60 ^a
Resíduos	0,32	9	0,036	-
Falta de Ajuste	0,29	3	0,097	-
Erro Puro	0,03	6	0,005	-
Total	1630,09	10	-	-
rs (mg/L.h)				
Regressão	4163,97	1	4163,97	42492,92 ^a
Resíduos	0,88	9	0,09	-
Falta de Ajuste	0,81	3	0,27	-
Erro Puro	0,07	6	0,01	-
Total	4180,93	10	-	-
Y _{X/S} (mg _{biomassa} /mg _{DQOamido})				
Regressão	2,487	1	2,487	26,68 ^a
Resíduos	0,838	9	0,093	-
Falta de Ajuste	0,832	3	0,277	-
Erro Puro	0,006	6	0,001	-
Total	3,326	10	-	-

^a $F_{1; 9; 0,05} = 5,12$

AGRADECIMENTOS

O financiamento para esta pesquisa foi fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANP 255. Provisional Brazilian Biodiesel Standard ANP (Agência Nacional do Petróleo), 2003.
- APHA, AWWA, WEF (American Public Health Association, American Waterworks Association, Water Environmental Federation), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. Prot City Press, Baltimore, Maryland, 1325p., 2005.
- ASTM 6751. Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100). Blend Stock for Distillate Fuels, 2002.
- BLIGH, E.G.; DYER, J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- 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. Journal of Chemistry Technology and Biotechnology, v.85, p.395-403, 2010.
- HADDAD, M.; FAWAZ, Z. Evaluation of microalgae alternative jet fuel using the AHP. Method with a Emphasis on the Environmental Progress & Sustainable Energy, v.32, n.3, p.3044-3064, 2013.
- HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. A rapid determination of fatty acid methyl esters from lipids. Laboratory Prattice, v.22, p.475-476, 1976.
- LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, v.98, n.4, p.764-771, 2007.
- LU, Y.; DING, Y.; WU, Q. Simultaneous saccharification of cassava starch and fermentation of algae for biodiesel production. Journal Applied Phycology, 23, p.115-121, 2011.
- MARTÍN, M.; GROSSMANN, I.E. On the synthesis of sustainable biorefineries. Industrial & Engineering Chemistry Research, v.52, p.3044-3064, 2012.
- MATA, T.M.; MARTIN, A.A.; NIDIA, S.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and their applications: A Review. Renewable & Sustainable Energy Reviews, v.14, p.217-232, 2010.
- MOHAMED, M.S.; WEI, L.Z.; ARIFF, A.B. Heterotrophic cultivation of microalgae for production of biodiesel. Recent Patents on Biotechnology, v.5, p.95-107, 2011.

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

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

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

STATSOFT, Inc. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. [Online]. Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, 2004.

SUALI, E; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v.16, p.4316-4342, 2012.

UNE-EN 14214. Automotive Fuels, Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines, Requirements and Test Methods, 2003.

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

WEI, A.; ZHANG, X.; WEI, D.; CHEN, G.; WU, Q.; 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.

KNOTHE, G. Fuel properties. In: *The Biodiesel Handbook*, ed. by Knothe, G.; Krahl, J. and Gerpen, J.V. AOCS Press, 2005.

CAPÍTULO IV

Apresentação

O Capítulo IV apresenta o terceiro artigo desenvolvido e intitulado de “Heterotrophic cultivation of cyanobacteria: The process intensification of bulk oil production”. Esta etapa contempla o estudo de diferentes estratégias no cultivo heterotrófico da cianobactéria empregando como substrato a manipueira, efluente oriundo do processamento da mandioca. A partir de um prévio estudo para verificar a concentração adequada da manipueira, desenvolveu-se diferentes estratégias de cultivo, avaliou-se o perfil lipídico produzido e a viabilidade econômica do processo.

Heterotrophic cultivation of cyanobacteria: The process intensification of bulk oil production

Erika Cristina Francisco^a, Eduardo Jacob-Lopes^b, Telma Teixeira Franco^a

^aSchool of Chemical Engineering, University of Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Tel. + 55 (19) 35213966. E-mail: franco@feq.unicamp.br (T.T. Franco)

^bFood Science and Technology Department, Federal University of Santa Maria, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel. +55 (55) 32208822. E-mail: jacoblopes@pq.cnpq.br (E. Jacob-Lopes)

ABSTRACT

The heterotrophic cultivation of cyanobacteria can be an inexpensive alternative to photoautotrophic systems in achieving high productivity cell. Water demand and use of high-cost organic substrates can be seen as factors that prevent the use of systems heterotrophs in cultures of microorganisms. The use of agro-industrial effluents with high organic content like the culture medium can be an economical alternative to substitute commercial substrates. In this sense, the objective of this study was the use of different strategies in heterotrophic cultures of cyanobacteria *Phormidium* sp. employing cassava wastewater as organic carbon source. From the cultures in shake-flasks cultivation, the results demonstrated that concentration of 60% resulted biomass productively (15.05mg/L.h) and maximum cell concentration (5210mg/L) with most representative. The extrapolation of cultures conditions for bioreactors under three different systems, batch cultures (System A) and batch cultures with discontinuous feeding (Systems B and C) demonstrated maximums cellular densities of System A (12010mg/L), System B (8162mg/L) and System C (5200mg/L). It was found that with the use of cassava wastewater as a substrate, it is possible to obtain a reduction of 0.53 (System A), 0.58 (System B) and 0.57cent/m³ (System C), respectively when compared with conventional substrates such as ammonium nitrate, sodium phosphate and glucose. The results demonstrating the potential in the use of cassava wastewater in cultivation of cyanobacteria *Phormidium* sp. in different strategies of heterotrophic systems.

Keywords: Cyanobacteria/microalgae; biomass productivity; heterotrophic; cassava wastewater

1. INTRODUCTION

Cyanobacteria and microalgae are a large group of microscopic algae that have unexplored metabolic versatility. Although certain species must be photoautotrophic, many have the ability to grow in heterotrophic systems, either sequentially as simultaneously. There are also reports of species that grow only in heterotrophy (LEE, 2001; CHOJNACKA & MARQUEZ-ROCHA, 2004). Although earlier studies suggest species that use organic carbon sources as substrates in heterotrophs systems, a number of commercially important heterotrophic microalgae that have high performance in certain processes, such as fed-batch cultivation, is still very limited (GLADUE & MAXEY, 1994; BUMBAK et al., 2011).

According to Chen and Johns (1991), the marketing of products obtained from the cultivation of microalgae can be an obstacle to large scale production, since they have low productivity in comparison to other microbial systems. The final cost of the biomass produced in a heterotrophic depends essentially of the process employed and the conditions of cultivation. A further important factor to be considered is the cell yield per unit mass of usually costly carbon source used in the process, such as glucose (BOROWITZKA, 1992; LEE, 1997).

To obtain high cell concentrations and high yields of products in heterotrophs processes there is a need to develop appropriate strategies, which can be selected from a process optimization. Generally strategies are based on understanding and exploiting the adaptability of the composition of the biomass within upper and lower limits defined by different culture conditions and formulations of culture medium (CARVALHO et al., 2006; GROBBELAAR, 2004; HU, 2004).

Heterotrophic cultures can be developed in different ways, such as batch, fed-batch and continuous cultures, and in each can be operated under different strategies. The batch system, with lower complexity, presents advantages like low capital investment and simple operation, but it is not a system designed for the achievement of high cell concentrations. In general, microalgae have low tolerance to médium with high substrate concentrations, as in batch cultures (CHEN and JOHNS, 1994).

Known as the most efficient technique for systems designed high yields of biomass fed-batch cultivation provides obtain high cell density in a short time and in a controlled manner. High performance are achieved by controlling the rate of addition of the energy

source in case of heterotrophic systems, comprising feeding the organic substrate. Different compositions and efficient biomass production can be achieved through variations in the power system (BUMBAK et al., 2011).

Another system heterotrophic usually employed are the continuous cultivations that are classified by using mathematical functions that describe the time dependence of the rate of addition of substrate. In continuous cultures, addition of the substrate is held at constant rates and predefined. Strategies aimed at obtaining certain products can also be developed in these systems, through the addition of the substrate at a rate lower than the rate employed for high cell concentrations (WEN & CHEN, 2002; WU & SHI, 2007; BUMBAK, 2011).

From this information, the objective of this study was the use of different cultivation strategies from process optimization using cassava wastewater as a source of organic carbon in heterotrophic cultures of cyanobacteria *Phormidium* sp. to obtain high cell densities.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganisms and culture media

Axenic cultures of *Phormidium* sp. were originally isolated by professor Eduardo Jacob-Lopes (Federal University of Santa Maria) from the Cuatro Cienegas desert (26°59'N, 102°03'W-Mexico). Stock cultures were propagated and maintained in solidified agar-agar (20g/L) containing synthetic BGN medium (RIPPKA, 1979) with the following composition (g/L): K₂HPO₄ (0.03g.L⁻¹), MgSO₄ (0.075g.L⁻¹), CaCl₂.2H₂O (0.036g.L⁻¹), ammonium citrate and iron (0.0006g.L⁻¹), Na₂EDTA (0.001g.L⁻¹), NaCl (0.00072g.L⁻¹), NaNO₃ (0.015g.L⁻¹), citric acid (0.0006g.L⁻¹), Na₂CO₃ (1.5g.L⁻¹), trace metals [H₃BO₃ (0.0028g.L⁻¹), MnCl₂.4H₂O (0.0018g.L⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (0.00022g.L⁻¹), Na₂MoO₄.2H₂O (0.00039g.L⁻¹), CoSO₄.6H₂O (0.00004g.L⁻¹)]. The incubation conditions used were 25°C, a photon flux density of 15 μmolm⁻² s⁻¹ and a photoperiod of 12h. To obtain the inoculums in the liquid form, 1mL of sterile synthetic medium was transferred to slants, the colonies were scraped and then homogenized with the aid of a mixer tubes. The entire procedure was performed aseptically.

2.2 Wastewater

Cassava wastewater was used in the experiments as a culture medium. The wastewater was obtained from the flour cassava industry (Garça, SP, Brazil). It was collected from the discharge point of the step of pressing a period of 12 months, from January to

December 2012, and analyzed for pH, chemical oxygen demand (COD), total nitrogen (N-TKN), phosphorus (P-PO₃⁴⁻), total solids (TS), suspended solids (SS) and volatile solids (VS) following Standard Methods for Examination of the Water and Wastewater (APHA, 2005), the results being presented in Table 1. The composition of this wastewater is generally variable, seasonal variability of the species and origin of the raw material. The carbon/nitrogen ratio (C/N) and nitrogen/phosphorous ratio (N/P) were calculated through COD, N-TKN and P-PO₃⁴⁻) and adjusted when necessary with dilution of wastewater cassava in water.

Tab. 1: Average composition of wastewater from cassava industry.

Parameter	Value
pH	5.47±0.05
COD (mg/L)	24000±353.55
N-TKN (mg/L)	250±14.15
P-PO ₃ ⁴⁻ (mg/L)	166.48±11.65
TS (mg/L)	35410±289.91
SS (mg/L)	25315±222.74
VS (mg/L)	10095±137.88
C/N	96±4.24
N/P	1.50±0.07

number of samples = 20.

2.3 Shake-flasks cultivation

A prior study to assess the adequate concentration of cassava wastewater to be used in cultures in bioreactors was developed from Shake-flasks. The Shake-flasks were previously sterilized by autoclaving at 121°C for 20 minutes containing different dilutions. The experimental conditions were as follows: different concentrations (5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100%) of cassava wastewater in distilled water (v/v), initial concentration of inoculum of 100mg/L, temperature of 30°C, pH adjusted to 7.6, stirred at 200 rpm in a shaking incubator and absence of light.

2.4 Bioreactors

Measurements were made in a bubble column bioreactor. The system was built of borosilicate glass, covered with aluminum foil, and had an external diameter of 12.5cm, a height of 16cm, resulting in a ratio height/diameter (h/D) equal to 1.28 and a nominal working volume of 2.0L. The dispersion system of reactor consisted of a 2.5cm diameter air diffuser located inside the bioreactor. The air flow was monitored 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 0.22µm and total diameter of 50mm (Millex FG®, Billerica-MA, USA). The bioreactor including filtering units was previously sterilized in autoclaving at 121°C for 40 minutes and then for 30 minutes containing synthetic medium. The experimental conditions were as follows: cassava wastewater dilution of 60% (COD = 14000mg/L) in distilled water (v/v), initial concentration of inoculum of 100mg/L, temperature of 30°C, pH adjusted to 7.6, aeration of 1 VVM (volume of air per volume of culture per minute) and absence of light.

Three different modes of operation were developed. All systems employed cassava wastewater as culture medium, the System A being developed in batch mode and the systems B and C in batch mode with discontinuously feedings, wherein the System B the feed solution constituted by starch concentrated and System C cassava wastewater undiluted. The systems B and C feeds were performed discontinuously so that the COD reached the average concentration of 6000 mg/L.

2.5 Sampling and analytical methods

Samples were collected aseptically in a laminar flow hood previously sterilized. The tips used for sample collection were previously sterilized by autoclaving at 121°C for 20 minutes. The cellular concentration, the pH dynamics and the consumption of organic carbon were monitored every 24 hours during the growth phase of microorganism. The experiments were performed in duplicate and kinetic data refer to the average of four repetitions.

The dynamics of pH was determined by potentiometer (Mettler-Toledo, São Paulo-SP, Brazil). The cell concentration was gravimetrically evaluated by filtering a known volume of culture medium through a 0.45µm membrane filter (Millex FG®, Billerica-MA, USA), drying at 60°C for 24h. The organic carbon concentration was expressed in terms of chemical oxygen demand (COD) analyzed according to the closed reflux, colorimetric method of Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

2.6 Kinect parameters

Biomass data were used to calculate the biomass productivity [$P_X = (X_i - X_{i-1}) \cdot (t_i - t_{i-1})^{-1}$, mg/L/d], the maximum specific growth rate [$\ln(X_i/X_0) = \mu_{\max} \cdot t$, 1/d] was plotted, the generation time [$t_g = 0.693/\mu_{\max}$, d] and the lipid productivity [$P_L = P_X \cdot L_C$, mg/L/d], 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, $\mu_{\max}$ 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 ($r_s = -d\text{COD}/dt$, mg/L/d) and the substrate yield coefficient ($Y_{X/S} = -dX/d\text{COD}$, mg_{biomass}/mg_{CODsubstrate}), where COD is the carbon organic demand (mg/L) and t is the time (d).

2.7 Extraction and determination of total lipids

The lipid fraction was extracted from the biomass by the Bligh and Dyer method (1959) obtaining an immiscible system consisting of the sample water content and a mixture of chloroform and water. The total lipid concentration was determined gravimetrically from the chloroform extract by evaporating the chloroform in an atmosphere of nitrogen and subsequently drying to constant weight in a vacuum oven.

3. RESULTS

3.1 Shake-flasks cultivation

Table 3 shows the results for the different cassava wasteater concentrations. The concentration of 60% was more efficient for obtaining biomass, and that the productivity in biomass was 15.05mg/L.h and maximum cell concentration was 5210mg/L, shorter generation time (10.12h). The cultivation employing the concentration to 60% also resulted in a maximum specific growth rate and substrate yield coefficient of 0.068h⁻¹ and 0.72mg_{biomass}/mg_{CODstarch}. With this, it appears that this concentration is suitable for investigation of biomass on a larger scale, such as systems that use bioreactors.

Tab. 2: Kinetics parameters for different concentrations of cassava wastewater.

Concentration % (v/v)	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	tg (h)	$X_{\text{máx}}$ (mg/L)	P_x (mg/L.h)	r_s (mg/L.h)	$Y_{x/s}$ (mg _{biomass} /mg _{CODstarch})
5	0.029	23.40	580	1.23	10.27	0.36
10	0.035	19.70	860	3.42	16.22	0.38
20	0.046	14.70	1555	4.84	24.86	0.43
40	0.051	16.67	3610	6.63	41.33	0.59
60	0.068	10.12	5210	15.05	68.29	0.72
80	0.047	14.47	4020	10.71	82.48	0.61
100	0.014	46.52	2180	9.49	151.60	0.13

(v/v): volum of wastewater cassava/volum of distilled water, $\mu_{\text{máx}}$: maximum specific growth rate, tg: generation time, $X_{\text{máx}}$: maximum cell concentration, P_x : productively in biomass, r_s : substrate consumption rate, $Y_{x/s}$: substrate yield coefficient.

Relative to the substrate consumption, although the resuly for concentration of 60% is less than others (80% and 100%), the culture showed greater efficiency of substrate consumption rate (68.29mg/L.h) when compared to study employed cassava starch as a carbon organic source for the microalgae *Chlorella protothecoides*, which was 2.5mg/L.h (LU et al., 2010).

It also appears that the use of cassava wastewater without dilution demonstrates considerable biomass production, resulting in a maximum cell concentration of 2180mg/L and productively in biomass of 9.49mg/L.h, making it economically viable and environmentally friendly since the use of water for dilution is not necessary.

3.2 Analysis of different operating modes in bioreactor.

The Figure 2 shows the cell growth and chemical oxygen demand (COD) curve in System A. The maximum specific growth rate of the batch culture was 0.049h^{-1} and the maximum cell density of 5299mg/L. The cell growth and organic carbon consumption for the Systems B and C are shown in Figures 3 and 4 and the maximum cell density were 12010mg/L and 8162mg/L, respectively. Fed-batch cultures with microalgae *Chlorella protothecoides* employing hydrolysate cassava starch as organic carbon source showed maximum cell concentrations of 48g/L and 53g/L (LIU et al., 2010; 2011).

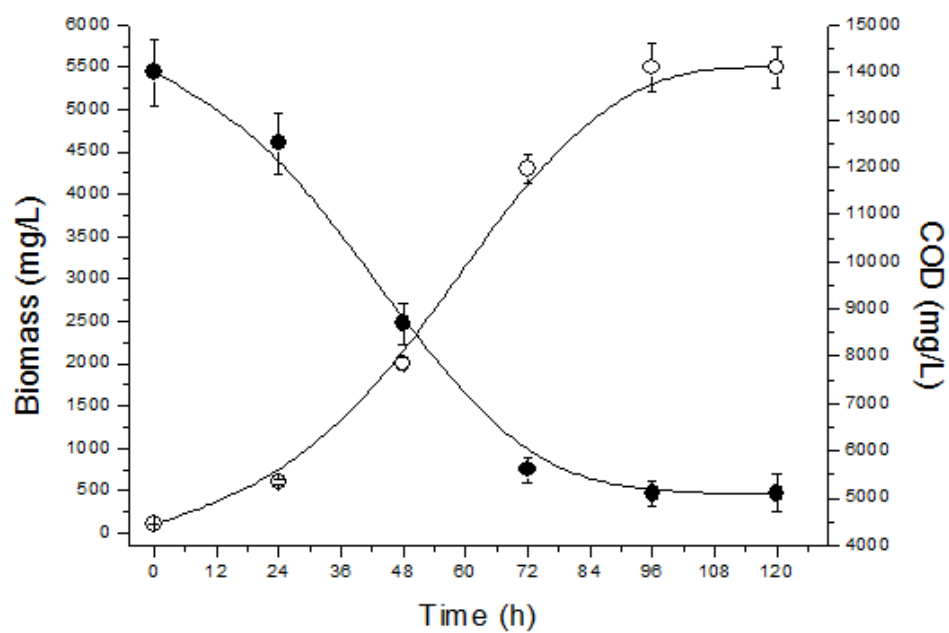


Fig. 1: Cell growth and organic carbon consumption by chemical oxygen demand (COD) curve in System A.

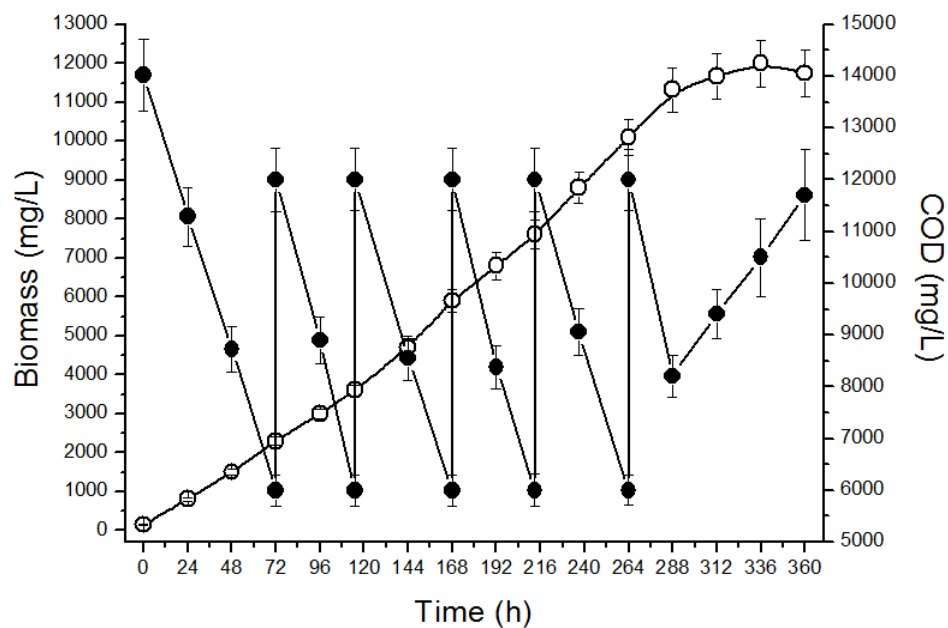


Fig. 2: Cell growth and organic carbon consumption by chemical oxygen demand (COD) curve in System B (open circle: biomass concentration, closed circle: COD).

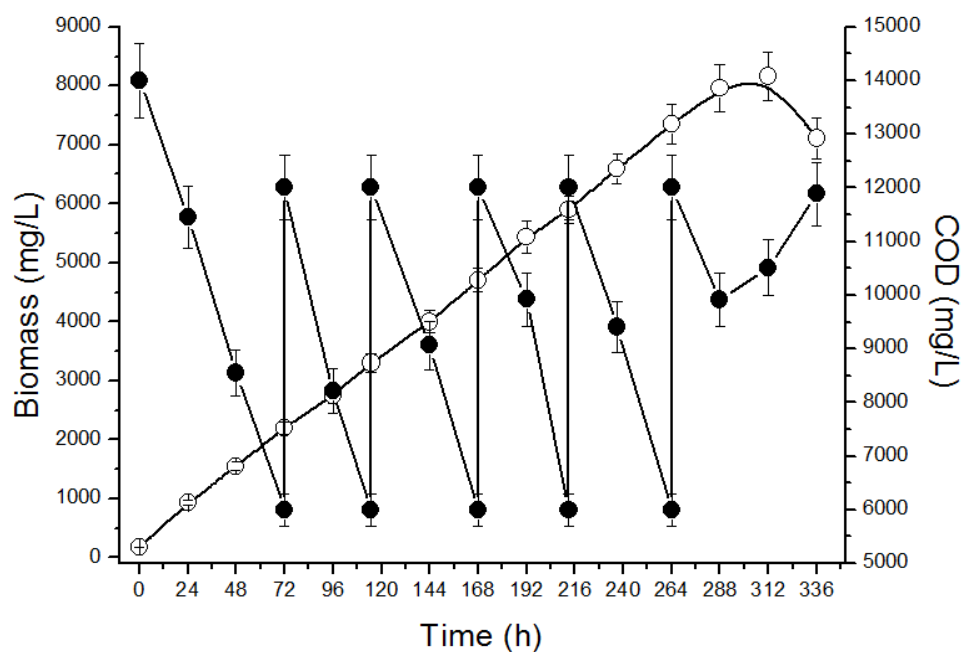


Fig. 3: Cell growth and organic carbon consumption by chemical oxygen demand (COD) curve in System C (open circle: biomass concentration, closed circle: COD).

The kinetic parameters using different cultures strategies are show in Table 6. The System A results in higher substrate yield coefficient ($0.52\text{mg}_{\text{biomass}}/\text{mg}_{\text{COD}}$), content of lipids (14.03%), productivity in biomass ($53.12\text{mg}/\text{L.h}$) and lipid ($7.45\text{mg}/\text{L.h}$). Studies employing cassava starch hydrolysate to supplement the synthetic medium showed productivities in the range of $37.6\text{mg}/\text{L.h}$ (LIU et al., 2010). The use of cassava wastewater has an advantage in mitigation costs to water, exogenous organic carbon and enzymes such as alpha-amylase and glucoamylase that are required in starch hydrolysis. Although some species contain a relatively low lipid content, as in the case of the results obtained with the *Phormidium* sp., high cell productivity can be translated into significant lipid productivity (Pittman et al., 2011).

Tab. 3: Kinetic parameters for different operating systems.

Systems	r_s (mg/L.h)	$Y_{X/S}$ (mg/mg)	$X_{\text{máx}}$ (mg/L)	Lipid (%)	P_X (mg/L.h)	P_L (mg/L.h)	CE_N (%)	CE_P (%)
System A	102.55	0.52	5200	14.03	53.12	7.45	17.59	16.13
System B	105.11	0.39	12010	9.9	35.28	3.49	49.92	52.42
System C	97.99	0.28	8162	9.06	25.60	2.32	31.81	27.84

System A: culture medium composed of cassava wastewater diluted, System B: batch operation with starch feeding, System C: batch operation with cassava wastewater feeding, r_s : substrate consumption rate, $Y_{X/S}$: substrate yield coefficient, $X_{\text{máx}}$: maximum cell concentration, P_X : productively in biomass, P_L : lipid productivity, CE_N : conversion efficiency of nitrogen, CE_P : conversion efficiency of phosphorus.

The System B strategy show the better results for substrate consumption rate, maximum cell density and conversion efficiency of organic substrate, nitrogen and phosphorus, of $105.11\text{mg}/\text{L.h}$, $12010\text{mg}/\text{L}$, 78.67%, 49.92% and 52.42%, respectively. According Pittman and employees (2011), fed-batch systems are listed as one of the strategies with greater efficiency in the production of biomass and some byproducts. The best performance obtained for these parameters using cassava starch in feeds can be explained due to an inhibition likely occurred by high concentrations of nitrogen, phosphorus and other

nutrients present in cassava wastewater that used in feeds of System C. Probably the lower performance in systems that utilized feeds, is due to an inhibition in cellular metabolism due to factors such as lack of a source of nitrogen in the case of System B. In the case of System C have a reverse situation, the feed solution comprises a significant concentration of various nutrients such as nitrogen, phosphorous and others.

Heterotrophic systems present economic advantage in the production of biomass, being widely used in industry microbial. Batch cultures is generally used in laboratory studies by presenting systems with low complexity, in the case of fed-batch cultures, more complex models are employees in obtaining high cell density (XIONG et al., 2008; BUMBAK et al., 2011; SUALI & SARBATLY, 2012).

Glucose is the organic carbon source with higher employment in heterotrophs systems, his cost is estimated to be about 80% of the total médium cost. A viable alternative to mitigate the costs would be replacement of glucose by low cost substrates, such as starch and cellulose-hydrolyzed solution. In the case of starch, the price of glucose is twice as that of his cost, which means that the medium cost could be reduced about 40% (XU et al., 2006; LI et al., 2007).

The major advantage of using microalgae in wastewater treatment systems is the cost reduction in the treatment technology. In the case of agro-industrial effluents, such as cassava wastewater, a characteristic that differs from other wastes is the high organic load and representative concentrations of nitrogen and phosphorus, essential components for microalgal metabolism. (PITTMAN et al., 2011). The Table 7 shows the recovery of the organic matter, nitrogen and phosphorus present in wastewater, through its bioconversion systems in heterotrophic cultures employed three different systems. Background can also analyze how much can be saved by employing such systems out instead of using a synthetic medium consisting of nutrients such as glucose, sodium phosphate and ammonium nitrate. Analyzing the results, there is a saving up to 0.53, 0.58 and 0.57cent/m³ employ the Systems A, B and C, respectively, and demonstrating the viability of the use of wastewater in heterotrophic cultivation of *Phormidium* sp.

Tab. 4: Economic aspects of substrates in different cultivation strategies.

Parameters	Cassava wastewater modified (g/m ³)	Recovery by bioconversion (g/m ³)			global economy system (cent/m ³)		
		Batch	Fed-batch A	Fed-batch B	Batch	Fed-batch A	Fed-batch B
COD ^a	14.00	9.24	11.01	10.36	0.5	0.5	0.5
N-NTK ^{b,d}	0.14	0.02	0.07	0.04	0.01	0.03	0.02
P-PO ₃ ⁴⁻ ^{c,d}	0.10	0.02	0.05	0.05	0.02	0.05	0.05

^a glucose (500US\$/ton), ^b ammonium nitrate (500US\$/ton), ^c sodium phosphate (1000US\$/ton), ^d Agricultural Prices, National Agricultural Statistics.

4 CONCLUSION

Heterotrophic systems with fed-batch culture has been widely employed in microbial industry by having the most common way to enhance cell density and product concentration. Due to of the constraint of the substrate through further control, microbial cells undergo logphase growth during almost the whole cultivation cycle. The use of feed in cultures coupled with the use of cassava wastewater, as well as organic carbon source feeds into the System C, demonstrated the feasibility of the process employed for the production of biomass since there is a large effluent volume generated by the industry of cassava flour. According to Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2011), Brazil is the second largest producer of cassava, demonstrating the high availability of the substrate used, which when not reused requires appropriate treatment to be dropped into bodies of water. The cyanobacterium *Phormidium* sp. shown to metabolize the nutrients contained in the cassava wastewater without this need supplemental another source of organic carbon, resulting in a process of low cost substrates and mitigation of water use in the production of biomass and bioproducts such as lipids.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for this research was provided by São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil).

6 REFERENCES

- AGRICULTURAL PRICES, NATIONAL AGRICULTURAL STATISTICS. United States Department of Agricultural (USDA). Available: <http://www.ers.usda.gov/>
- APHA, AWWA, WEF (American Public Health Association, American Waterworks Association. Water Environmental Federation). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. Prot City Press, Baltimore, Maryland, p.1325, 2005.
- BLIGH, E.G. and DYER J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian journal of biochemistry and physiology, 37:911 - 917, 1959.
- BOROWITZKA, M.A. Algal biotechnology products and processes matching science and economics. Journal of Applied Phycology, v.4, p.267 - 279, 1992.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Statistics for Experiments, John Wiley and Sons, New York, 1978.
- BUMBAK, F.; COOK, S.; ZACHLEDER, V.; HAUSER, S.; KOVAR, K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. Applied Microbiology Biotechnology, v.91, p.31-46, 2011.
- CARVALHO, A.P.; PONTES, I.; GASPAR, H.; MALCATA, F.X. Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. Enzyme and Microbial Technology, v.38(3-4), p.358 - 366, 2006.
- CHEN, F.; JOHNS, M.R. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. Journal of Applied Phycology, v.3, p.203 - 209, 1991.
- CHEN, F.; JOHNS, M.R. Substrate inhibitory of *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate in heterotrophic culture. Process Biochemistry, v.29, p.245 - 252, 1994.
- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F.J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. Biotechnology, v.3(1), p.21–34, 2004.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). Available: http://www.fao.org/index_en.htm
- GLADUE, R.M.; MAXEY, J.E. Microalgal feeds for aquaculture. Journal of Applied Phycology, v.6(2), p.131 - 141, 1994.
- GROBBELAAR, J.U. Algal nutrition: mineral nutrition. In: RICHMOND, A. (ed) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell, Oxford, p.97–115, 2004.

HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: RICHMOND, A. (ed) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell, Oxford, p.83–94, 2004.

LEE, Y.K. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. Journal of Applied Phycology, v.9, p.403 – 411, 1997.

LEE, Y.K. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. Journal of Applied Phycology, v.13(4), p.307 - 315, 2001.

LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, v.98(4), p.764-771, 2007.

LU, L.; ZHAI, Y.; LIU, M.; WU, Q. Biodiesel production from algal oil using cassava (*Manihot esculenta* Crantz) as feedstock. Journal Applied Phycology, v.22, p.573-578, 2010.

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.

PITTMAN, J.K.; DEAN, A.P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. Bioresource Technology, v.102, p.17-25, 2011.

RIPPKA, R.; DERUELES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Journal of General Microbiology, v.111, p.1-61, 1979.

STATSOFT, Inc. *STATISTICA for Windows* [Computer program manual]. [Online]. Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, 2004. Available: <http://www.statsoftinc.com>.

SUALI, E; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.16, p.4316– 4342, 2012.

XIONG, W.; LI, X.; XIANG, J.; WU, Q. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. Applied Microbiology and Biotechnology, v.78, p.29-36, 2008.

XIE, T.; SUN, Y.; DU, K.; LIANG, B.; CHENG, R.; ZHANG, Y. Optimization of heterotrophic cultivation of *Chlorella* sp. for oil production. Bioresource Technology, v.118, p.235–242, 2012.

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

WEN, Z.Y.; CHEN, F. Perfusion culture of the diatom *Nitzschia laevis* for ultra-high yield of eicosapentaenoic acid. *Process Biochemistry*, v.38(4), p.523–529, 2002.

WU, Z.Y.; SHI, X.M. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. *Letters of Applied Microbiology*, v.44(1), p.13 - 18, 2007.

CAPÍTULO V

Apresentação

O quarto artigo que constitui a tese (Evaluation of different nitrogen sources in the production of oils from *Phormidium* sp. in heterotrophic systems) está apresentado no Capítulo V. O artigo contempla um estudo de cinco diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura, molibdato de amônio, nitrato de sódio, nitrito de sódio e ureia) no cultivo da cianobactéria *Phormidium* sp. empregando amido de mandioca commercial como fonte de carbon orgânico. A partir da seleção da melhor fonte de nitrogênio (nitrato de sódio) para as condições empregadas, realizou-se um estudo do acúmulo do lipídeo a partir da depleção total da fonte de nitrogênio após iniciada a fase de crescimento do micro-organismo. A seleção do amido como substrato orgânico se deu devido à ausência de nitrogênio em sua composição, facilitando a depleção empregada no estudo de acúmulo lipídico.

Evaluation of different nitrogen sources in the production of oils from *Phormidium* sp. in heterotrophic systems

Érika Cristina Francisco^a, Eduardo Jacob-Lopes^b, Telma Teixeira Franco^a

^aSchool of Chemical Engineering, University of Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Tel. + 55 (19) 35213966. E-mail: franco@feq.unicamp.br (T.T. Franco)

^bFood Science and Technology Department, Federal University of Santa Maria, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel. +55 (55) 32208822. E-mail: jacoblopes@pq.cnpq.br (E. Jacob-Lopes)

Abstract

The cyanobacteria have great potential for aquaculture industries, bioproducts, bioenergy and bioremediation, as in the reduction of ammonia, phosphorus and organic compounds. The manipulation of the medium and modes of operation of bioreactors are needed to induce the production of biomass and bioproducts, such as lipid. Nitrogen is an essential nutrient for the metabolism of microorganisms and metabolic pathways. The aim of the study was to evaluate the different nitrogen sources and their depletion in heterotrophic cultures of the cyanobacterium *Phormidium* sp. Was studied as a nitrogen source the yeast extract, ammonium molybdate, sodium nitrate, sodium nitrite and urea, under the C/N ratios of 20, 40 and 60. The cultures conditions that showed better results for lipid production was the use of sodium nitrate and C/N ratio of 60, resulting in lipid content of 13.22% and lipid productivity of 7.62mg/L.h. From the depletion of sodium nitrate, after 120 hours of culture, obtained a lipid productivity and lipid content of 10.43mg/L.h and 25.07%, respectively. The fatty acid profile showed, in the presence of nitrogen, saturated fatty acid fraction and monounsaturated of 76.72% and 23.88%, respectively. The depletion of sodium nitrate induced a change in the lipid profile, directing the production of saturated fatty acids (98.97%). The properties of biodiesel obtained in both steps of the process fall in the standards set by standardization of the quality of biodiesel.

Keywords: Microalgae/cyanobacteria; heterotrophic metabolism; nitrogen depletion

INTRODUCTION

The cyanobacteria are known for the production of photosynthetic pigments, are also sources of various products such as carotenoids, phycobiliproteins and bioactive compounds as anticancer, antibacterial, antifungal and immunosuppressive agents (BURJA et al., 2001). Because of potentially important compounds, many cyanobacterial strains are grown in the commercial sector. Most products are complex organic compounds with unique structures and can not be synthesized in the laboratory. For this reason, cyanobacteria are known as "cell factories". Many researches focus on the study of the metabolism of cyanobacteria in order to produce high value-added bioproducts in large scale (BURJA et al., 2003; HONG & LEE, 2007).

The heterotrophic cultures of microalgae on a large scale, it is generally advantageous in relation to costs when compared with photosynthetic systems. However, the superior performance of biomass productivity is the driving force of these systems. The growth controlled under aseptic conditions in fermentors decrease the loss of nutrients and increases the product quality. The final cost of biomass productivity and products is the essential feature of the farming systems and depends mainly on the cultivation conditions and medium formulation (BOROWITZKA, 1992).

Many factors are essential for the metabolism of cyanobacteria and direct routes to produce the desired final product. Among such factors, the availability and source of nitrogen is one of the most important. Nitrogen is a constituent of structural and functional cellular proteins and under certain cultivation strategies, such as nitrogen limitation, cells may have high concentrations of lipids, such as in photosynthetic systems employing diatoms and chlorophytes (LIU et al., 2012).

From these informations, the objective was to study different sources of nitrogen and evaluate nutrient depletion in heterotrophic cultures of cyanobacterium *Phormidium* sp.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and culture media

Axenic cultures of *Phormidium* sp. were originally isolated by professor Eduardo Jacob-Lopes (Federal University of Santa Maria) from the Cuatro Ciénegas desert (26°59'N, 102°03'W-Mexico). Stock cultures were propagated and maintained in solidified agar-agar

(20g/L) containing synthetic BGN medium (RIPPKA et al., 1979) with the following composition (g/L): K_2HPO_4 (0.03g.L^{-1}), MgSO_4 (0.075g.L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.036g.L^{-1}), ammonium citrate and iron (0.0006g.L^{-1}), Na_2EDTA (0.001g.L^{-1}), NaCl (0.00072g.L^{-1}), NaNO_3 (0.015g.L^{-1}), citric acid (0.0006g.L^{-1}), Na_2CO_3 (1.5g.L^{-1}), trace metals [H_3BO_3 (0.0028g.L^{-1}), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.0018g.L^{-1}), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.00022g.L^{-1}), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.00039g.L^{-1}), $\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.00004g.L^{-1})]. The incubation conditions used were 25°C , a photon flux density of $15 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 12h.

Bioreactor

Measurements were made in a bubble column bioreactor. The system was built of borosilicate glass, covered with aluminum foil, and had an external diameter of 12.5cm and height of 16cm, resulting in a height/diameter (h/D) ratio equal to 1.28 and a nominal working volume of 2.0L. The dispersion system of the reactor consisted of a 2.5cm diameter air diffuser located inside the bioreactor. The air flow was monitored 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 $0.22\mu\text{m}$ and total diameter of 50mm (Millex FG®, Billerica-MA, USA). The bioreactor including filtering units was previously sterilized by autoclaving at 121°C for 40 minutes and then for 30 minutes containing the synthetic medium.

Obtaining kinetic data in an experimental bioreactor

Experiments were performed in a bioreactor operating under a batch regime, fed on 2.0L of culture medium. The experimental conditions were as follows: initial concentration of inoculum of 100mg/L , temperature of 30°C , pH adjusted to 7.8, aeration of 1 VVM (volume of air per volume of culture per minute) and absence of light. The culture medium consisted of BGN synthetic medium modified and supplemented with 14g/L of cassava starch and different sources of nitrogen (yeast extract, ammonium molybdate, sodium nitrate, sodium nitrite and urea). The different carbon/nitrogen (C/N) ratio were obtained from the stoichiometry of the medium and nitrogen sources concentration as shown in Table 1.

Table: 1 different carbon/nitrogen (C/N) ratio and sources of nitrogen concentrations.

Source of nitrogen (g/L)	C/N 20	C/N 40	C/N 60
Ammonium molybdate	2.18	1.06	0.75
Nitrate sodium	2.18	1.06	0.75
Nitrite sodium	1.75	0.85	0.6
Urea	0.75	0.35	0.25
Yeast extract	2.18	1.06	0.75

Nitrogen depletion

After selection of the nitrogen source with the highest potential for production of lipids, held experiments in order to evaluate the accumulation of intracellular lipids from the depletion of nitrogen. The depletion was performed by separating the biomass of the culture medium, after 120 hours, and added to a new bioreactor containing the synthetic BGN medium supplemented with cassava starch and absence of any nitrogen source.

Sampling and analytical methods

Samples were collected aseptically in a laminar flow hood previously sterilized. The tips used for sample collection were previously sterilized by autoclaving at 121°C for 20 minutes. The cellular concentration, the dynamics of pH and the consumption of organic carbon were monitored every 12 hours during the growth phase of microorganism. The experiments were performed in duplicate and kinetic data refer to the average of four repetitions.

The dynamics of pH was determined by potentiometer (Mettler-Toledo, São Paulo-SP, Brazil). The cell concentration was gravimetrically evaluated by filtering a known volume of culture medium through a 0.45µm membrane filter (Millex FG®, Billerica-MA, USA), drying at 60°C for 24h. The organic carbon concentration was expressed in terms of chemical oxygen demand (COD) analyzed according to the closed reflux, colorimetric method of Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

The lipid fraction was extracted from the biomass by the Bligh and Dyer method (1959). The method of Hartman and Lago (1976) was used to saponify and esterify the dried lipid

extract to obtain the fatty acid methyl esters (FAMES). The fatty acid composition was determined using a VARIAN 3400CX gas chromatograph (Varian, Palo Alto-CA, USA). The FAMES were identified by comparison of the retention times with those of the standard (Supelco, Louis-MO, USA) and quantified by area normalization.

Kinetics parameters

Biomass data were used to calculate the biomass productivity [$P_X = (X_i - X_{i-1}) \cdot (t_i - t_{i-1})^{-1}$, mg/L/d], the maximum specific growth rate [$\ln(X_i/X_0) = \mu_{\max} \cdot t$, 1/d] was plotted, the generation time [$t_g = 0.693/\mu_{\max}$, d] and the lipid productivity [$P_L = P_X \cdot L_C$, mg/L/d], 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, $\mu_{\max}$ 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 ($r_s = -d\text{COD}/dt$, mg/L/d) and the substrate yield coefficient ($Y_{X/S} = -dX/d\text{COD}$, mg_{biomass}/mg_{CODsubstrate}), where COD is the carbon organic demand (mg/L) and t is the time (d).

Obtain and analysis of the lipid fraction

The lipid fraction was extracted from the biomass by the Bligh and Dyer method (1959). The method of Hartman and Lago (1976) was used to saponify and esterify the dried lipid extract to obtain the fatty acid methyl esters (FAMES). The fatty acid composition was determined using a VARIAN 3400CX gas chromatograph (Varian, Palo Alto-CA, USA). The FAMES were identified by comparison of the retention times with those of the standard (Supelco, Louis-MO, USA) and quantified by area normalization.

Results and discussions

The Kinetic parameters for different nitrogen source and C/N ratio are shown in Table 2. From the information that in the cellular composition of the cyanobacterium *Phormidium* sp. the lipid content is 8%, there is an accumulation of lipids employing the yeast extract in C/N ratio of 40, sodium nitrate in the ratios of 40 and 60, sodium nitrite under ratios of 20 and 40 and finally, the urea in the C/N ratio of 20.

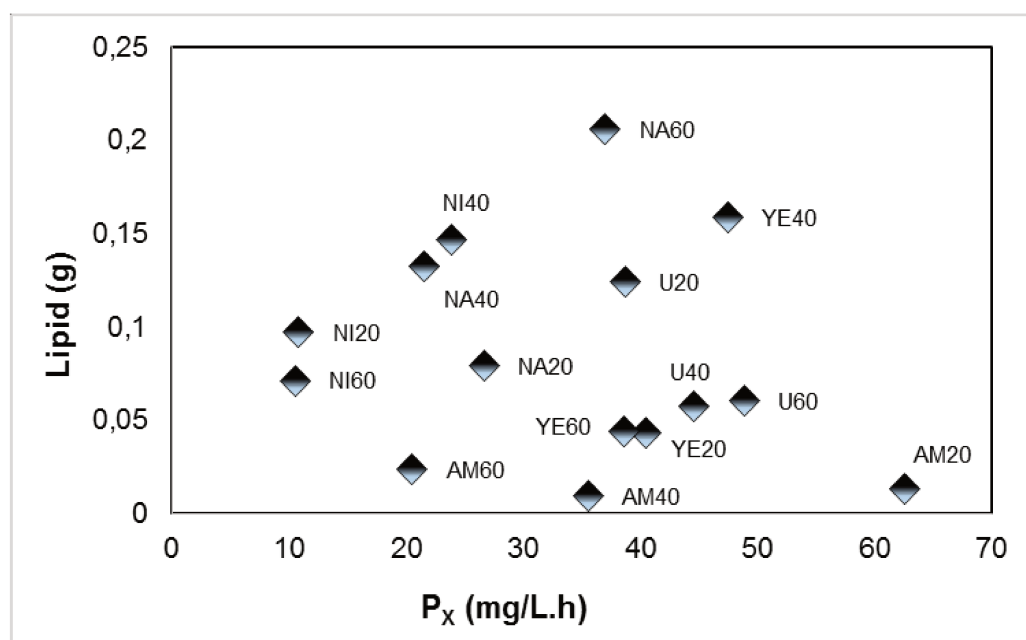
Table: 2 Kinetic parameters for different nitrogen source and C/N ratio.

Source of nitrogen	C/N ratio	r_s (mg/L.h)	$Y_{X/S}$ (mg _{cell} /mg _{COD})	μ_{max} (h ⁻¹)	X_{max} (mg/L)	Lipid (%)	P_x (mg/L.h)	P_L (mg/L.h)
Yest extract	20	108.22	0.37	0.019	4960	4.29	40.50	1.74
	40	108.65	0.35	0.068	4660	15.86	47.50	7.53
	60	107.57	0.35	0.035	4740	4.37	38.66	1.69
Ammonium molybdate	20	25.95	2.41	0.045	9120	1.32	62.57	0.82
	40	80.63	0.66	0.027	5220	0.93	35.55	0.33
	60	48.37	0.51	0.023	3080	2.37	20.55	0.49
Sodium nitrate	20	31.60	0.84	0.038	3980	7.95	26.66	2.12
	40	33.14	0.65	0.016	3200	13.22	21.53	2.84
	60	30.82	1.20	0.029	6320	20.58	37.02	7.62
Sodium nitrite	20	49.39	0.22	0.017	880	9.71	10.83	1.05
	40	55.85	0.43	0.038	2400	14.66	23.85	3.49
	60	42.73	0.24	0.039	860	7.13	10.55	0.75
Urea	20	50.37	0.92	0.024	5680	12.44	38.75	4.82
	40	45.42	0.98	0.016	6520	5.75	44.58	2.56
	60	60.82	0.96	0.029	7140	6.03	48.88	2.95

r_s : average rate of substrate conversion, $Y_{X/S}$: substrate yield coefficient, μ_{max} : maximum specific growth rate, X_{max} : maximum cell biomass, P_x : biomass productivity, P_L : lipid productivity.

Yeast extract in C/N ratio of 40 resulted in the higher substrate consumption rate (108.65mg/L.h) and maximum specific growth rate (0.068h⁻¹). The substrate yield coefficient, maximum cell concentration and biomass productivity were obtained with ammonium molybdate in C/N ratio of 20, being 2.41mg_{cell}/mg_{COD}, 9120mg/L and 62.57mg/L.h, respectively. For parameters that represent the lipid fraction, the lipid content (20.58%) and lipid productivity (7.62mg/L.h), representative values obtained using sodium nitrate to a C/N ratio of 60. Some studies have reported the urea in the range of 0.8-1.7g/L, as nitrogen source with the highest potential in obtaining lipids in microalgae cultivation under certain culture conditions, such as photosynthetic systems (XI et al., 2000; SUALI & SARBATLY, 2012).

From the lipid yield under different culture conditions, shown in Figure 1, it appears that the best source of nitrogen and C/N ratio for heterotrophic cultivation of cyanobacteria *Phormidium* sp. employing cassava starch as organic carbon source, is sodium nitrate in C/N ratio of 60.



AM: ammonium molybdate, NA: nitrate sodium, NI: nitrite sodium, U: urea, YE: yeast extract, C/N ratio: 20, 40 and 60.

Figure: 1 Lipid productivity for different nitrogen source and C/N ratio.

The kinetics parameters obtained in the end of the two phases are show in Table 3, in the presence of nitrogen (phase A), held until 120 hours, and in the absence of nitrogen (phase B). From the analysis of the kinetic parameters, there is an increased in the substrate consumption rate (46.66mg/L.h), the maximum cell concentration (5590mg/L), lipid content (24.07%) and lipid productivity (10.47mg/L.h) performed after depletion of nitrogen from the medium.

Hsieh and Wu (2009) report that the induction of lipid accumulation can be performed from different conditions, such as the depletion of nitrogen, high concentrations of salts and stress induced by extreme temperatures and light intensities. The properties of biodiesel obtained for the two phases in the presence and absence of nitrogen source, demonstrating the regulatory standards for the quality of biodiesel (ASTM 6751, 2002; ANP 255, 2002; UNE 14214, 2003).

Table: 3 Kinetic parameters for sodium nitrate depletion and biodiesel properties.

Kinetic parameters							
Phase	r_s (mg/L.h)	$Y_{X/S}$ (mg _{cell} /mg _{COD})	μ_{max} (h ⁻¹)	X_{max} (mg/L)	Lipid (%)	P_x (mg/L.h)	P_L (mg/L.h)
A	33.14	0.65	0.016	3200	13.22	21.53	2.84
B	46.66	0.46	0.014	5590	25.07	41.59	10.43
Biodiesel properties							
Phase	EC (%)	CN	SV	IV (gl ₂ 100g ⁻¹)	GI (%)	LCFS (%)	CFPP (°C)
A	99.99	54.88	406.82	21.47	23.88	12.48	39.21
B	99.97	57.87	432.55	4.64	2.00	1.50	11.76

Phase A: nitrogen phase, phase B: nitrogen depletion phase, r_s : average rate of substrate conversion, $Y_{X/S}$: substrate yield coefficient, μ_{max} : maximum specific growth rate, X_{max} : maximum cell biomass, P_x : biomass productivity, P_L : lipid productivity, EC: ester contente, CN: cetane number, SV: saponification value, IV: iodine value, DU: degree of unsaturation, LCFS: long-chain saturated fator, CFPP: cold filter plugging point.

The cell growth, organic carbon consumption by chemical oxygen demand (COD) and lipid production curve in nitrate sodium source and C/N 60 are show in the Figure 2. From the figure, observed that the biomass enters in the stationary phase after 156 hours and lipid

production in 216 hours, and there was a 11.85% increase in lipid content after depletion of sodium nitrate.

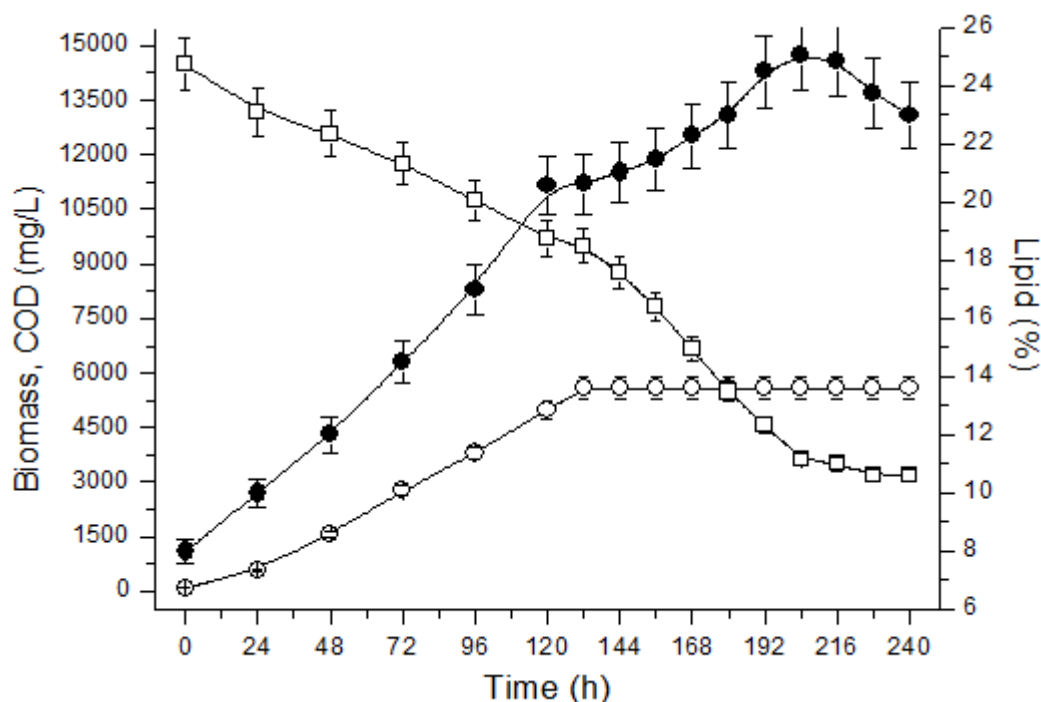


Figure: 2 Cell growth, organic carbon consumption by chemical oxygen demand (COD) and lipid production curve in nitrate sodium source and C/N 60 (open circle: biomass concentration, closed circle: lipid, open square: organic carbon).

The profile of the fatty acids is shown in Table 4. A total of seven fatty acids were identified in the phases. In the phase A, the majority was acids caproic (65.9%) and oleic (23.88%) and in phase B, acids caproic (51.93%) and caprylic (43.62%). It is observed that the fraction of fatty changes from the depletion of sodium nitrate, from the predominance of saturated fatty acids (76.72%) and monounsaturated (23.88), to almost totalitarian composition of saturated fatty acids (98.97%) after depletion.

Table: 4 Fatty acid profile employing sodium nitrate in a C/N ratio of 60 and depletion of nitrogen.

Fatty acid	120h	144h	168h	192h	216h	240h
	(phase A)	(phase B)				
C6:0 (%)	65.9	58.4	54.99	52.24	52.08	51.93
C8:0 (%)	5.43	37.49	40.35	42.39	43.41	43.62
C10:0 (%)	ND	ND	ND	4.46	4.32	3.42
C14:0 (%)	ND	4.1	3.85	ND	ND	ND
C18:0 (%)	5.39	ND	ND	ND	ND	ND
C18:1n9c (%)	23.88	ND	ND	ND	ND	ND
C22:6n3 (%)	ND	ND	0.16	0.80	0.88	1.00
SFAs (%)	76.72	99.99	99.19	99.81	99.09	98.97
MUFAs (%)	23.88	ND	ND	ND	ND	ND
PUFAs (%)	ND	ND	0.16	0.80	0.88	1.00

Phase A: nitrogen phase, phase B: nitrogen depletion phase, ND: not detected, SFAs: saturated fatty acids, MUFAs: monounsaturated fatty acids, PUFAs: polyunsaturated fatty acids.

The biomass composition depends strongly of the cultures conditions, so the manipulation of conditions can be a strategy to obtain desired. An example of strategy may be the use of depletion of the nitrogen source, which besides being used to induce the lipid accumulation, is also used to direct the production of a saturated fatty acid fraction, as well as the production of intracellular starch (HU, 2008; KLOK et al., 2013).

CONCLUSIONS

From the study of the sources of nitrogen used under different carbon/nitrogen ratios (C/N), it is concluded that sodium nitrate under C/N ratio of 60 showed better performance in the production of lipids in heterotrophic cultivation of cyanobacteria *Phormidium* sp. in systems employing cassava starch as a source of organic carbon. The strategy of depletion of nitrogen in the cultivation was effective in lipid accumulation, and the absence of nitrogen source in the middle directed the profile of fatty acids almost completely saturated fraction.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for this research was provided by São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil).

REREFENCES

- ANP 255, Provisional Brazilian Biodiesel Standard ANP (Agência Nacional do Petróleo), 2003.
- APHA, AWWA, WEF (American Public Health Association, American Waterworks Association. Water Environmental Federation). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21st (ed) Prot City Press, Baltimore, Maryland, 2005.
- ASTM 6751, Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Distillate Fuels, 2002.
- BLIGH, E.G.; DYER, J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, v.37, p.911-917, 1959.
- BOROWITZKA, M.A. Algal biotechnology products and processes matching science and economics. Journal of Applied Phycology, v.4, p.267 - 279, 1992.
- BURJA, A.M.S; BANAIGS, B.E.; ABOU-MANSOUR, BURGESS, J.G.; WRIGHT, P.C. Marine cyanobacteria a prolific source of natural products. Tetrahedron, v.57, p.9347-9377, 2001.
- BURJA, A.M.; DHAMWICKORN, S.; WRIGHT, P.C. Cyanobacterial postgenomic research and systems biology. Trends in Biotechnology, v.21, p.504-511, 2003.
- FUEL STANDARD (BIODIESEL) DETERMINATION. Approved Under the Fuel Quality Standard Act 2000 by the Australian Minister for the Environment and Heritage, 2003.
- HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. A rapid determination of fatty acid methyl esters from lipids. Laboratory Practice, v.22, p.475-476, 1976.
- HONG, S.J.; LEE, C.G. Evaluation of central metabolism based on a genomic database of *Synechocystis* PCC6803. Biotechnology and Bioengineering, v.12, p.165-173, 2007.
- HSIEH, C.H.; WU, W.T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. Bioresource Technology, v.100, p.3921-3926, 2009.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. The Plant Journal, v.54, p.621-639, 2008.

KLOK, A.J.; VERBAANDERD, J.A.; LAMERS, P.P; MARTENS, D.E.; RINZEMA, A.; WIJFFELS, R.H. A model for customising biomass composition in continuous microalgae Production. *Bioresource Technology*, v.146, p.89–100, 2013.

LIU, W.; HUANG, Z.; LI, P.; XIA, J.; CHEN, B. Formation of triacylglycerol in *Nitzschia closterium* f. minutissima under nitrogen limitation and possible physiological and biochemical mechanisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.418–419, p.24–29, 2012.

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

SHI, X.M.; ZHANG, X.W.; CHEN, F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme of Microbiology and Technology*, v.27, p.312–8, 2000.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.16, p.4316– 4342, 2012.

UNE-EN 14214, Automotive Fuels, Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines, Requirements and TestMethods, 2003.

CAPÍTULO VI

1 CONCLUSÕES GERAIS

A cianobactéria *Phormidium* sp. apresentou capacidade de se desenvolver a partir do emprego de diferentes classes de carboidratos, monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos. Entre os carboidratos estudados, a maltodextrina e o amido de mandioca apresentaram maior eficiência na produção de biomassa e bioprodutos intracelulares. O emprego dos carboidratos estudados no cultivo heterotrófico da *Phormidium* sp., em geral, induz a produção de perfis de ácidos gordos saturados.

O planejamento experimental do cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. empregando amido de mandioca como fonte de carbono orgânico proporcionou a otimização da temperatura a 30°C e razão C/N de 68. O cultivo em batelada demonstrou maior eficiência entre os modos de operação em reator.

A partir da análise das propriedades do biodiesel, empregando amido de mandioca, verifica-se seu enquadramento às normas estabelecidas nacionais e internacionais. A adequação das propriedades demonstram a viabilidade do emprego de substratos de baixo custo, como o amido de mandioca, na produção de biodiesel de a partir do cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp.

O cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. apresentou desempenho superior na produção de biomassa e lipídeos quando comparado ao seu cultivo em fotobiorreatores.

O estudo empregando diferentes concentrações de manipueira demonstrou a potencialidade do cultivo da cianobactéria em questão, empregando a manipueira sem prévia diluição, mitigando o uso de água nos cultivos e viabilizando o tratamento do efluente agroindustrial estudado.

A diluição de 60% de manipueira em água destilada para posterior cultivo em biorreatores resultou maior produtividade de biomassa, direcionando assim, a extrapolação para cultivos em biorreatores. O emprego do Sistema C, batelada com alimentação descontínua utilizando manipueira como fonte de carbono orgânico, demonstra a viabilidade do processo de produção de biomassa acoplado ao tratamento da manipueira, uma vez que há a ocorrência de grandes volumes de efluentes gerados pela indústria de farinha de mandioca.

A cianobactéria *Phormidium* sp. demonstrou capacidade de absorver os nutrientes contidos no efluente estudado sem a necessidade da suplementação por fontes externa. A viabilidade do processo se dá devido a mitigação do uso de grandes volumes de água na produção de biomassa e bioprodutos.

A partir do estudo das diferentes fontes de nitrogênio, conclui-se que houve um acúmulo de lipídeos empregando o extrato de levedura sob razão C/N de 40, nitrato de sódio nas razões de 40 e 60, nitrito de sódio sob razões de 20 e 40 e finalmente, a ureia na razão C/N de 20. O nitrato de sódio sob relação C/N de 60 apresentou melhor desempenho na produção de lipídios no cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. empregando o amido de mandioca como uma fonte de carbono orgânico.

A estratégia de esgotamento de nitrogênio no cultivo mostrou-se eficaz no acúmulo de lipídios, sendo que a ausência da fonte de nitrogênio no meio direcionou o perfil dos ácidos graxos quase que totalmente para a fração saturada.

2 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar o escalonamento do processo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. na obtenção de lipídeos para a produção de biodiesel.

Estudar a produção de diversos bioprodutos a partir do cultivo heterotrófico empregando efluentes e resíduos, como proteínas, carotenoides e pigmentos.

Realizar um estudo de diferentes efluentes e resíduos agroindustriais na produção de biomassa e bioprodutos sem prévia diluição do efluente a fim de se desenvolver sistemas de tratamento de efluentes com custos inferiores aos tradicionais.

Avaliar a capacidade de diferentes microalgas e cianobactérias, de metabolizar fontes de carbono orgânico de baixo custo, bem como efluentes de diferentes setores.

Empregar diferentes fontes de nitrogênio no cultivo heterotrófico de diferentes espécies e avaliar as rotas metabólicas para obtenção de bioprodutos.

CAPÍTULO VII

Anexo 1

CULTIVO DE *PHORMIDIUM* SP. A PARTIR DE FONTES DE CARBONO ORGÂNICO

(Resumo do trabalho publicado no XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química)

E. C. FRANCISCO¹, E. JACOB-LOPES² e T. T. FRANCO¹

¹ FEQ (Faculdade de Engenharia Química) - UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas)

² DTCA (Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos) - UFSM (Universidade Federal de Santa Maria)

O cultivo de microalgas em sistemas heterotróficos é uma rota tecnológica eficiente que pode ser empregada na obtenção de biomassa microalgal. O uso de substratos orgânicos permite a obtenção de elevadas produtividades através de eficientes conversões dos substratos. Em face disto, o trabalho teve como objetivo avaliar diferentes fontes de carbono orgânico exógeno no cultivo da cianobactéria *Phormidium* sp. Considerou-se os monossacarídeos arabinose, frutose, glicose e xilose, em concentrações de 12,5g/L. Utilizou-se um bioreator de coluna de bolhas com relação altura/diâmetro (L/D) igual a 1,28. As condições experimentais utilizadas foram: concentração inicial de inóculo de 100mg/L, pH de 7,6, temperatura de 26°C, aeração constante de 1VVM e ausência de luminosidade. Foram avaliadas as dinâmicas do pH, concentração celular e consumo de carbono orgânico, a cada 24 horas durante as fases de crescimento do micro-organismo. Os resultados obtidos indicaram que a frutose foi a fonte de carbono com maior potencial, apresentando conversões de carbono na ordem de 86,6%, associadas a produtividades celulares de 5,61mg/Lh.

Anexo 2

UTILIZAÇÃO DA MANIPUEIRA EM CULTIVOS MICROALGAIS

(Resumo do trabalho completo publicado no XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química)

E. C. FRANCISCO¹, E. JACOB-LOPES² e T. T. FRANCO¹

¹ FEQ (Faculdade de Engenharia Química) - UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas)

² DTCA (Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos) - UFSM (Universidade Federal de Santa Maria)

Resíduos agroindustriais são uma fonte potencial de carbono orgânico para o cultivo de microalgas, em função da elevada disponibilidade de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo presentes nestas águas residuárias. Nesse sentido, o trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho da microalga *Phormidium* sp. em diferentes concentrações de manipueira. A água residuária foi coletada em uma indústria de processamento de mandioca e preparada em diferentes diluições (v/v) (5, 10, 15, 25, 50, 75 e 100%) com água destilada. Os experimentos foram desenvolvidos em erlenmeyers utilizando agitador orbital e as condições experimentais utilizadas foram: concentração inicial de inóculo de 100mg/L, pH de 7,6, temperatura de 26°C, agitação constante de 140rpm e ausência de luminosidade. Foram avaliadas as dinâmicas do pH, concentração celular e consumo de carbono orgânico, a cada 24 horas durante as fases de crescimento do micro-organismo. Os resultados obtidos indicaram que concentrações de 75% de manipueira apresentaram melhores desempenhos na produção de biomassa microalgal, com produtividades celulares na ordem de 16,2mg/Lh.

Anexo 3

ASSESSING THE POTENTIAL OF DISACCHARIDES AS EXOGENOUS CARBON SOURCE IN CULTIVATION OF CYANOBACTERIA

(Resumo do trabalho completo publicado no 15th European Congress on Biotechnology)

E.C. Francisco*, E. Jacob-Lopes, T.T. Franco

Unicamp, Limeira, Brazil

Heterotrophic cyanobacteria have been received increasing attention in recent years, because they can grow in ordinary stirred bioreactors. The productivity of heterotrophic cyanobacteria cultures can potentially be much higher than the productivity of phototrophic cultures. Glucose is the most commonly used carbon source for heterotrophic cultures of microalgae and cyanobacteria, as is the case for many other microbial species. However, it is not possible to precisely predict which specific substrates can be used or preferred by any given cyanobacteria. From this, the study aimed to evaluate the heterotrophic metabolism of the cyanobacterium *Phormidium* sp. using disaccharides as exogenous carbon source. The disaccharides lactose, maltose, sucrose and trehalose was added to the BGN11 modified medium at concentrations of 11.9 g/L to adjusted the carbon/nitrogen (C/N) ratio of 20. The experimental apparatus was composed of a bioreactor with a bubble column height/diameter (H/D) equal to 1.28. The experimental conditions were: initial concentration of inoculum of 100 mg/L, pH 7.6, temperature of 26 ± 1 °C, constant aeration at 1VVM and absence of light. The dynamics of pH, cell concentration and consumption of organic carbon was evaluated every 24 hours during the growth phase of the microorganism. The results indicated that trehalose was the carbon source with the highest potential, with substrate yield coefficient of 0.42mgbiomass/mgsubstrate in parallel to cell productivity of 7.7 mg/L h. From these results it is concluded that the cyanobacterium *Phormidium* sp. has the capability of heterotrophic metabolism disaccharides.

Anexo 4

CULTIVATION OF CYANOBACTERIA *PHORMIDIUM* SP. IN CASSAVA WASTEWATER

(Resumo do trabalho publicado no 15th European Congress on Biotechnology)

E.C. Francisco*, E. Jacob-Lopes, T.T. Franco

Cyanobacteria have been used for years in tertiary sewage treatment to eliminate pollutions compounds after organic matter by conventional secondary treatment. The wastewater must receive suitable treatment before being discharged into water bodies and several types of unit processes exist, but these are costly and produce high sludge content. The main limitation in using these systems is related to the composition of the wastewater and the possible presence of high concentrations of some compounds frequent in wastewaters from the agricultural industry that can inhibit the growth. The objective of this study was to determine the optimum concentration of wastewater of cassava to obtain biomass with cyanobacterium *Phormidium* sp. in heterotrophic systems. Heterotrophic cultivation of cyanobacteria was initially carried out in a 300mL Erlenmeyer flask containing 150mL medium under continuous shaking (200 rpm), initial concentration of inoculum of 100 mg/L, pH 7.6, temperature of $26\pm1^{\circ}\text{C}$, absence of light and at dilutions of 5, 10, 15, 25, 50, 75 and 100% (v/v) of cassava wastewater using distilled water. The dynamics of pH, cell concentration and consumption of organic carbon was evaluated every 24 hours during the growth phase of the microorganism. The results indicated that the dilution of 50% demonstrated the greatest potential in the biomass production, with substrate yield coefficient of $0.69\text{mgbiomass/mgsubstrate}$ in parallel to cell productivity of 8.4 mg/L h . These results show the ability of cyanobacterium *Phormidium* sp. in convert significant amounts of organic compounds present in cassava wastewater.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2012.08.622>

Anexo 5

ASSESSING THE POTENTIAL OF EXOGENOUS ORGANIC CARBON SOURCES IN CULTIVATION OF CYANOBACTERIA

(Resumo do trabalho publicado no 9th International Conference on Renewable Resources
and Biorefineries)

Erika Cristina Francisco¹, E. Jacob-Lopes², T.T. Franco¹

¹University of Campinas, School of Chemical Engineering, Campinas, Brazil

²Federal University of Santa Maria, Food Science and Technology Department, Santa Maria,
Brazil

The cultivation of cyanobacteria can be directed to production of varied products, like human food and animals feed, fine chemicals, biofuels and fertilizers. Most products produced by cyanobacteria are organic substances which cannot be synthesized in laboratories. In this sense, the aim of this study was to evaluate different monosaccharides in the cultivation of cyanobacteria *Phormidium* sp. The monosaccharides (arabinose, fructose, galactose, glucose, mannose and xylose) were added to BGN11 modified medium at concentrations of 12.5g/L. The experimental conditions were: initial concentration of inoculum of 100 mg/L, pH 7.6, temperature of 26±1°C, constant aeration at 1VVM and absence of light. The dynamics of pH, cell concentration and consumption of organic carbon was evaluated every 24 hours during the growth phase of the microorganism. The results indicated that fructose was the carbon source with the highest potential, with substrate yield coefficient of 0.67mg_{biomass}/mg_{substrate}, cell productivity of 600.7mg/L.d and maximum cell concentration of 5540mg/L. From these results it is concluded that the cyanobacterium *Phormidium* sp. demonstrated ability to metabolize different carbohydrates.

Anexo 6

PRODUCTION OF HIGH CELL DENSITY OF CYANOBACTERIUM *PHORIMIDUM* SP. USING CASSAVA WASTEWATER

(Resumo do trabalho publicado no 9th International Conference on Renewable Resources
and Biorefineries)

Erika Cristina Francisco¹, E. Jacob-Lopes², T.T. Franco¹

¹University of Campinas, School of Chemical Engineering, Campinas, Brazil

²Federal University of Santa Maria, Food Science and Technology Department, Santa Maria,
Brazil

The heterotrophic cultivation of cyanobacteria can be an inexpensive alternative to photoautotrophic systems. Water demand is a factor and may result in the impossibility of heterotrophic systems and an alternative is the use of agro-industrial effluents with high organic load, resulting in mitigation of costs and reuse of wastewater that originally are sent for treatment before discharge into water bodies. The agroindustrial wastewater treatment causes significant increase industrial costs and its direct disposal in soil or water bodies causing environmental impacts. In this sense, the aim of this study was the use of cassava wastewater in fed-batches cultures of cyanobacteria *Phormidium* sp. aiming high productivity cell. The experimental conditions were: initial concentration of inoculum of 100 mg/L, pH 7.6, temperature of 30±1°C, constant aeration at 1VVM, temperature of 30°C, carbon/nitrogen ratio (C/N) of 68 and absence of light. The dynamics of pH, cell concentration and consumption of organic carbon was evaluated every 24 hours during the growth phase of the microorganism. The results indicate biomass productivity of 35.28mg/L.h and maximum cell concentration of 12g/L, demonstrating the potential in the use of wastewater in cultivation of cyanobacteria *Phormidium* sp.

Anexo 7

OPTIMIZATION OF HETEROTROPHIC CULTIVATION OF *PHORMIDIUM* SP. FOR BIOMASS PRODUCTION

(Resumo do trabalho publicado no 9th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries)

Erika Cristina Francisco¹, E. Jacob-Lopes², T.T. Franco¹

¹University of Campinas, School of Chemical Engineering, Campinas, Brazil

²Federal University of Santa Maria, Food Science and Technology Department, Santa Maria, Brazil

Heterotrophic cyanobacteria cultivation is a specific niche of production of metabolic bioproducts. The heterotrophic route, where possible, overcomes major limitations of producing useful products, from cyanobacteria, that is, the dependency on light which significantly complicates the process. Studies show that the use of heterotrophic systems have the disadvantage of using exogenous carbon sources, which occasionally increase the cost of production, invalidating the obtaining of bioproducts. In this sense, the aim of this study was to determine the optimal concentration of starch not hydrolyzed and temperature to produce the cyanobacteria *Phormidium* sp. The optimization of temperature and carbon/nitrogen ratio (C/N) was determined by response surface methodology (RSM) coupled with central composite design (CCD). Heterotrophic cultivation of cyanobacteria was initially carried out in a Erlenmeyer flask containing 150mL medium BGN11 supplemented with starch under continuous shaking (200 rpm), initial concentration of inoculum of 100 mg/L, pH of 7.6 and absence of light. The dynamics of pH, cell concentration and consumption of organic carbon was evaluated every 24 hours during the growth phase of the microorganism. The results indicated that the greatest potential for biomass production was obtained fixing the carbon/nitrogen ratio and temperature at the highest level, 68 and 30°C, respectively. The biomass productivity was 50.72mg/Lh and the yield coefficient of the substrate, 0.67mg_{biomass}/mg_{starch}. These results show the ability of cyanobacterium *Phormidium* sp. in convert starch not hydrolyzed and providing viability to heterotrophic systems employing exogenous sources of organic carbon.

Anexo 8

CULTIVO HETEROTRÓFICO DA CIANOBACTÉRIA *PHORMIDIUM* SP. SOB DIFERENTES TAXAS DE AERAÇÃO

(Resumo do trabalho completo publicado no XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos)

E. C. FRANCISCO¹, M. M. MARONEZE E. ², JACOB-LOPES² e T. T. FRANCO¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

² Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Tecnologia e Ciência
dos Alimentos

O objetivo do trabalho foi avaliar diferentes aerações (0,5VVM, 1,0VVM e 1,5VVM) no cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp. empregando como fonte de carbono orgânico exógeno o amido de mandioca. Os cultivos foram desenvolvidos em biorreator de coluna de bolhas sob temperatura de 30°C e ausência de luminosidade. Melhores produtividade de biomassa (50,41mg/L.h), taxa de consumo de substrato (91,43mg/L.h) e eficiência na conversão do substrato (75,19%) foram obtidas sob aeração de 1VVM. A partir dos resultados obtidos conclui-se que a aeração de 1,0VVM proporciona melhor o desempenho no cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium* sp.

Anexo 9

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DA CIANOACTÉRIA *PHORMIDIUM* SP. EM SISTEMAS HETEROTRÓFICOS

(Resumo do trabalho completo publicado no XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos)

E. C. FRANCISCO¹, M. M. MARONEZE², E. JACOB-LOPES² e T. T. FRANCO¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

² Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Tecnologia e Ciência
dos Alimentos

O objetivo do trabalho foi analisar as respostas taxa de consumo de substrato e coeficiente de conversão do substrato em células através da otimização das condições de cultivo da cianobactéria *Phormidium* sp. em sistema heterotrófico. A partir de um planejamento experimental foram analisadas as relações entre diferentes razões de carbono/nitrogênio (C/N) e temperatura obtendo-se como respostas a taxa de consumo de substrato e o coeficiente de conversão do substrato em células. A maior taxa de consumo de substrato foi de 65,822mg/L.h sob razão C/N de 68 e temperatura de 30°C. Para a resposta coeficiente de conversão o melhor desempenho, 1,81mg_{células}/mg_{amido}, foi obtido com a razão C/N de 40 e a 30°C de temperatura.

Anexo 10

OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO HETEROTRÓFICO DA CIANOBACTÉRIA *PHOMIDIUM* SP. EMPREGANDO AMIDO DE MANDIOCA COMO FONTE DE CARBONO ORGÂNICO

(Resumo do trabalho completo publicado no XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos)

E. C. FRANCISCO¹, K. R. V. QUINHONES², E. JACOB-LOPES², T. T. FRANCO¹

¹Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

²Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Tecnologia e Ciência dos
Alimentos

O objetivo do trabalho foi realizar uma otimização das condições de cultivo da cianobactéria *Phormidium* sp. empregando amido de mandioca como substrato. A partir de um planejamento experimental foram analisadas as relações entre diferentes razões de carbono/nitrogênio (C/N) e temperatura obtendo-se como resposta a produtividade em biomassa. A maior produtividade em biomassa foi de 50,72mg/L.h sob razão C/N e temperatura de 68 e 30°C respectivamente.

Anexo 11

REUTILIZAÇÃO DE EFLUENTE AGROINDUSTRIAL NO CULTIVO HETEROTRÓFICO DA CIANOBACTÉRIA *PHORMIDIUM* SP.

(Resumo do trabalho completo publicado no XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos)

E. C. FRANCISCO¹, M. R. RAGAGNIN², E. JACOB-LOPES², T. T. FRANCO¹

¹Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Química

²Universidade Federal de Santa Maria – Depto. de Tecnologia e Ciência dos Alimentos

O objetivo do trabalho foi avaliar a taxa de consumo do substrato através de diferentes condições de cultivo da cianobactéria *Phormidium* sp. em sistema heterotrófico empregando a manipueira como fonte de carbono orgânico. A partir de um planejamento experimental foram analisadas as relações entre diferentes razões de carbono/nitrogênio (C/N) e temperatura obtendo-se como resposta a taxa de consumo do substrato. A maior taxa obtida foi de 74,07mg/L.h sob razão C/N e temperatura de 68 e 30°C respectivamente. A partir do diagrama de contorno (análise dos dados) verificou-se que as melhores respostas para a taxa de consumo de substrato são obtidas fixando-se a razão C/N e a temperatura no nível superior, elevadas temperatura e razão C/N.

