



LILIANA MARCELA FRANCO ACOSTA

**“ESTUDO DE FONTES DE CARBONO ORGÂNICOS NO CULTIVO
HETEROTRÓFICO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris*”**

CAMPINAS – SP

2012



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PROCESSOS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROCESSOS EM TECNOLOGIA QUÍMICA - ACPTQ**

LILIANA MARCELA FRANCO ACOSTA

**“ESTUDO DE FONTES DE CARBONO ORGÂNICOS NO CULTIVO
HETEROTRÓFICO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris*”**

Orientadora: Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, na área de Processos em Tecnologia Química.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química apresentada e aprovada pela banca examinadora em 18 de Dezembro de 2012.

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

CAMPINAS – SP,

Dezembro, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Acosta, Liliana Marcela Franco

Ac72e

Estudo de fontes de carbono orgânicos no cultivo heterotrófico da microalga *Chlorella vulgaris* / Liliana Marcela Franco Acosta. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Telma Teixeira Franco.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Microalga. 2. Chlorella . 3. Cultivo. I. Franco, Telma Teixeira, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Studies the organic carbon sources for heterotrophic culture from microalgae *Chlorella vulgaris*

Palavras-chave em Inglês: Microalgae, *Chlorella* , Cultivation

Área de concentração: Processos em Tecnologia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora: Telma Teixeira Franco, João Carlos Monteiro de Carvalho, Leonardo Brantes Bacellar Mendes

Data da defesa: 18-12-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PROCESSOS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROCESSOS EM TECNOLOGIA QUÍMICA - ACPTQ

A comissão examinadora, abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado **ESTUDO DE FONTES DE CARBONO ORGÂNICOS NO CULTIVO HETEROTRÓFICO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris***, elaborada por Liliana Marcela Franco Acosta, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

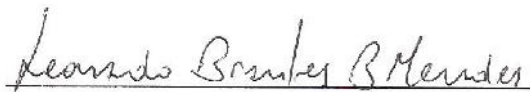
Comissão Examinadora:



Prof. Dra. Telma Teixeira Franco



Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho



Dr. Leonardo Brantes Bacellar Mendes

Campinas (SP)- Brasil

Dezembro, 2012

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho de mestrado marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram de forma decisiva para sua concretização.

Agradeço primeiramente a Deus e a meus pais, por a força e apoio incondicional ao longo destes anos.

A professora Telma Teixeira Franco, minha orientadora, pela oportunidade em executar este projeto de pesquisa.

Aos meus colegas e amigos, Renato, Talita e Lucy, obrigada pelo enorme apoio e pela sua total disponibilidade.

Aos amigos do LEBBPOR, obrigada por seu carinho e amizade.

A todos meus amigos, às pessoas especiais da minha vida, por me completarem, por me tornarem na pessoa que sou hoje e por me fazerem crescer. Obrigada pelo apoio, compreensão, paciência e enorme carinho. Deus abençoe vocês sempre! Vocês sempre estarão no meu coração.

A CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Em cultivos heterotróficos, fontes orgânicas de carbono são utilizadas para fornecer energia e carbono ao micro-organismo. A glicose é uma das fontes mais utilizadas em cultivos de microalgas, gerando elevadas taxas de crescimento. Outras fontes como frutose, xilose, glicerol, sacarose, arabinose também podem ser utilizadas e a escolha entre essas fontes orgânicas é função principalmente das taxas de crescimento e do custo de aquisição. Visando elevadas produtividades e a redução do custo do cultivo heterotrófico da *Chlorella vulgaris*, diferentes fontes de carbono orgânico foram avaliadas (glicerol, sacarose, frutose e melaço de cana). Os máximos valores de concentração celular, pH e produtividade, foram para a sacarose hidrolisada na concentração inicial de 20 g.L⁻¹ obtidos após 122 horas de cultivo (5,3g.L⁻¹; 8.80 e 0.040 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente) e para o melaço de cana hidrolisado na concentração de 30 g.L⁻¹ obtidos após 60 horas de cultivo (3,92 g.L⁻¹; 8,55 e 0,059 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente). Glicerol, sacarose e frutose não foram consumidos pelas células. As melhores concentrações de sacarose hidrolisada (20 g.L⁻¹) e melaço de cana hidrolisado (15 g.L⁻¹) foram utilizadas em fermentador de 3 L em regime de batelada alimentada, as velocidades específicas de crescimento para o melaço de cana aumentaram após cada alimentação desde 0,0512 h⁻¹ até 0,0644 h⁻¹. No entanto, para a sacarose hidrolisada a velocidade diminuiu de 0,0251 h⁻¹ até 0,0143 h⁻¹. A concentração de lipídeos foi para a sacarose hidrolisada (23,77 %), e (10,72%) para o melaço de cana. Paralelamente, foram analisadas condições de estocagem da microalga *Chlorella vulgaris*, em ultrafreezer, empregando-se três criopreservantes: glicerol, metanol e DMSO, nas concentrações de 5 e 10%. Os resultados, após 270 dias de estocagem, indicam que a microalga *Chlorella vulgaris* não sobrevive nas condições estabelecidas. No entanto, para uma estocagem de até 180 dias pode-se empregar 10% de glicerol ou 10% de DMSO, necessitando somente 2 repiques da microalga após o armazenamento para atingir sua velocidade normal de crescimento (0,2686 d⁻¹), velocidade reportada para a microalga sem armazenamento no ultrafreezer.

ABSTRACT

In heterotrophic culture, sources of organic carbon are utilized to give energy and carbon to microorganisms. Glucose is one of the main sources utilized in micro algae culture which produces high growing rates. Another sources such as fructose, xylose, glycerol, saccharose and arabinosa, could also be utilized. The function of growing rates and acquisition costs is precisely to help us to choose the best one between these sources. With the idea of getting high productivities and to reduce costs of heterotrophic crops of *Chlorella vulgaris*, different sources of organic carbon were studied (glycerol, saccharose, fructose and sugar cane honeydew). The highest values of cellular concentration, pH and productivity, were obtained from hydrolyzed saccharose with an initial concentration of 20 g.L⁻¹ after 122 hours of cultivation (5,3g.L⁻¹; 8.80 y 0.040 g.L⁻¹.h⁻¹, respectively). Glycerol, saccharose y fructose were not consumed by the cells. The best concentrations of hydrolyzed saccharose (20 g.L⁻¹) and hydrolyzed sugar cane honeydew (15 g.L⁻¹) were utilized in a 3 L fermenters in feed batch. The growing speed of the sugar cane honeydew increased after each feeding from 0,0512 h⁻¹ to 0,0644 h⁻¹. However, the growing speed for hydrolyzed saccharose decreased from 0,0251 h⁻¹ to 0,0143 h⁻¹. The concentration of fat acids for the hydrolyzed saccharose was 23,77 % and for the sugar cane honeydew was 10,72%. Storage conditions in ultrafreezer for the microalgae *Chlorella vulgaris* were studied at the same time using three different protectants such as glycerol, methanol and DMSO, all of them in 5% and 10% concentrations. The outcomes obtained after 270 days showed that the *Chlorella vulgaris* microalgae could not survive with the given conditions. However, 10% of glycerol or DMSO could be used in a 180-day storage and only 2 periodic transfer of the microalgae were needed after the storage to obtain the normal growing speed (0.2686 d⁻¹), which was the reported speed of the microalgae without ultrafreezer storage.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
NOMENCLATURA.....	VII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 Biodiesel.....	3
3.2 Microalgas.....	4
3.2.1 Microalgas como fonte de biodiesel.....	6
3.2.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	12
3.3 Cultivos heterotróficos	14
3.3 Criopreservação de microalgas.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Micro-organismo e condições de cultivo	22
4.2 Preparo do Ágar inclinado para cultivo heterotrófico.....	22
4.3 Preparo do inóculo e condições de axenia.....	23
4.4 Condições experimentais	24
4.4.1 Cultivo em incubadora rotatória.....	24
4.4.2 Cultivo em biorreator	24
4.5 Metodologia Analítica	25
4.6 Condições de cultivo	27
4.6.1 Cultivo com glicerol.....	27

4.6.2	Cultivo com sacarose e sacarose hidrolisada.....	28
4.6.3	Cultivo com melaço hidrolisado	28
4.6.4	Condições de cultivo.....	28
4.7	Hidrólise da sacarose.....	28
4.8	Hidrólise do melaço de cana e detoxificação	29
4.9	Criopreservação de microalgas.....	30
4.9.1	Micro-organismo	30
4.9.2	Condições de cultivo e protocolo de criopreservação.....	30
4.9.3	Estocagem e amostragem.....	31
4.10	Cálculo dos parâmetros cinéticos	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Cultivo em glicerol.....	33
5.2	Cultivo em glicose/Glicerol	36
5.3	Cultivo em sacarose.....	41
5.4	Hidrólise da sacarose.....	42
5.5	Cultivo em sacarose hidrolisada	43
5.5.1	Comparação dos cultivos com glicose e com sacarose hidrolisada.	50
5.6	Inibição pela frutose	52
5.6.1	Calculo da constante de inibição K_i	56
5.7	Hidrólise do melaço de cana	58
5.8	Cultivo em melaço de cana hidrolisado.....	60
5.8.1	Comparação dos cultivos com glicose, sacarose hidrolisada e melaço de cana hidrolisado.....	66
5.9	Batelada alimentada com sacarose hidrolisada	68
5.9.1	Comparação dos cultivos com glicose e sacarose hidrolisada.	72

5.10 Batelada com melaço de cana hidrolisado	73
5.10.1 Comparação dos cultivos com glicose, sacarose hidrolisada e melaço de cana hidrolisada.	78
5.11 Criopreservação de microalgas.....	80
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição de ácidos graxos da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .	5
Tabela 2: Comparação da eficiência da produção estimada de biodiesel a partir de plantas vasculares e microalgas	8
Tabela 3: Comparação do conteúdo de lipídeos de alguns micro-organismos oleaginosos.	9
Tabela 4: Comparação dos principais parâmetros de qualidade do diesel e biodiesel de microalga.	10
Tabela 5: Companhias que investem atualmente na produção para comercialização de combustíveis de algas.	11
Tabela 6: Estudos realizados em sistema heterotrófico com diferentes fontes de carbono e tipo de cultivo para a espécie <i>Chlorella vulgaris</i> .	13
Tabela 7: Composição química do melaço de cana da América do Sul.	18
Tabela 8: Crioprotetores utilizados na conservação de micro-organismos.	20
Tabela 9: Composição do meio sintético BBM (pH 6,8).	22
Tabela 10: Parâmetros cinéticos avaliados.	32
Tabela 11: Parâmetros cinéticos no cultivo com 10g/L de glicose (cultivo controle).	34
Tabela 12: Parâmetros cinéticos obtidos nos cultivos avaliados	38
Tabela 13: Resultados da hidrólise da sacarose (10 g.L ⁻¹) em autoclave (T:121°C) e banho termostático (T: 80 °C).	43
Tabela 14: Resultados da hidrólise da sacarose em banho termostático com diferentes concentrações de ácido clorídrico.	43
Tabela 15: Parâmetros cinéticos obtidos a partir dos experimentos com sacarose hidrolisada.	47
Tabela 16: Comparação dos cultivos com glicose e com sacarose hidrolisada	50

Tabela 17: Parâmetros cinéticos nos cultivos com glicose e frutose.	53
Tabela 18: Composição do melaço de cana.....	58
Tabela 19: Resultados da hidrólise do melaço de cana em banho termostático com diferentes concentrações de ácido clorídrico.	59
Tabela 20: Composição do melaço de cana hidrolisado e detoxificado.	59
Tabela 21: Parâmetros cinéticos obtidos a partir dos experimentos com melaço de cana hidrolisada.	63
Tabela 22: Comparação dos cultivos com glicose, sacarose hidrolisada e melaço de cana hidrolisado.	66
Tabela 23: Parâmetros cinéticos obtidos durante a batelada alimentada e incubadora rotatória para o cultivo de <i>C. vulgaris</i> em sacarose hidrolisada.	71
Tabela 24: Comparação dos cultivos com glicose e com sacarose hidrolisada	72
Tabela 25: Parâmetros cinéticos obtidos durante a batelada alimentada e incubadora rotatória para o cultivo de <i>C. vulgaris</i> em melaço de cana hidrolisado.....	77
Tabela 26: Comparação dos cultivos com glicose e com sacarose hidrolisada	79
Tabela 27: Velocidades específicas de crescimento da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> após armazenagem em ultrafreezer nos tempos avaliados.	82
Tabela 28: Velocidades específicas de crescimento da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> após armazenagem em ultrafreezer nos tempos avaliados.	83
Tabela 29: Velocidades específicas de crescimento da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> após armazenagem em ultrafreezer nos tempos avaliados.	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Perfis de concentração de glicose (‘▲’), glicerol (‘●’) celular no cultivo com glicose (‘■’) e celular no cultivo com glicerol (‘●’) para a <i>Chlorella vulgaris</i> nos experimentos estudados.	35
Figura 2: Perfis de pH e crescimento celular nos cultivos com glicose (a) e glicerol (b).	35
Figura 3: Fotografia do cultivo com glicose 10 g.L ⁻¹ . a: 0h; b: 96h.	36
Figura 4: Fotografias do cultivo com glicerol 2g.L ⁻¹ . a: 0h; b: 48h; c:120h.....	36
Figura 5: Perfis de concentração de glicose (‘▲’), glicerol (‘●’), e celular nos cultivos (‘■’) para a <i>Chlorella vulgaris</i> nos experimentos estudados. Controle (a), 8 g.L ⁻¹ de glicose e 2 g.L ⁻¹ de glicerol (b), 6 g.L ⁻¹ de glicose e 4 g.L ⁻¹ de glicerol (c).....	39
Figura 6: Perfis de pH nos cultivos controle e nas proporções de glicose e glicerol avaliadas.	40
Figura 7: Comparação dos valores máximos dos principais parâmetros cinéticos obtidos nos experimentos com diferentes proporções de glicose e glicerol.....	40
Figura 8: Perfis de pH, concentração celular e de sacarose do experimento com concentração inicial de 2g.L ⁻¹ de sacarose. Perfil de crescimento celular e de pH com sacarose (a), perfil de consumo de substrato e crescimento celular com sacarose (b).	41
Figura 9: Perfis de pH (‘ ’) e concentração celular (‘■’) para os experimentos com diferentes concentrações de sacarose hidrolisada. 2 g.L ⁻¹ (a), 5 g.L ⁻¹ (b), 8 g.L ⁻¹ (c), 10 g.L ⁻¹ (d) e 20 g.L ⁻¹ (e),	45
Figura 10: Perfis de concentração de glicose (‘▲’), frutose (‘●’) e celular (‘■’) para os experimentos com diferentes concentrações de sacarose hidrolisada. 2 g.L ⁻¹ (a), 5 g.L ⁻¹ (b), 8 g.L ⁻¹ (c), 10 g.L ⁻¹ (d) e 20 g.L ⁻¹ (e).....	46
Figura 11: Comparação dos valores máximos dos principais parâmetros cinéticos obtidos nos experimentos com diferentes proporções de glicose e glicerol.....	48

Figura 12: Perfis de pH, concentração celular e concentração de frutose. Perfil de crescimento celular e de pH com frutose (a), perfil de consumo de substrato e crescimento celular com frutose (b).	49
Figura 13: Perfis de concentração celular e consumo de glicose dos experimentos com glicose (‘●’) e sacarose hidrolisada (‘◆’).	51
Figura 14: Perfis de concentração de glicose (‘▲’), frutose (‘●’) e celular (‘■’) para os experimentos avaliados. Cultivo controle, 10 g.L ⁻¹ glicose (a), 1 g.L ⁻¹ frutose (b), 2 g.L ⁻¹ frutose (c), 5 g.L ⁻¹ frutose (d), 8 g.L ⁻¹ frutose (e), 10 g.L ⁻¹ frutose (f).	54
Figura 15: Perfis de pH (‘ ’) e concentração celular (‘■’) para os experimentos com diferentes concentrações de frutose. 1 g.L ⁻¹ frutose (a), 2 g.L ⁻¹ frutose (b), 5 g.L ⁻¹ frutose (c), 8 g.L ⁻¹ frutose (d), 10 g.L ⁻¹ frutose (e).	55
Figura 16: Linearização dos valores de concentração e velocidade específica de crescimento por o método de Lineweaver-Burk. (‘●’) Linearização obtida das fermentações sem frutose no meio de cultivo; (‘◆’) Linearização obtida das fermentações adicionadas de frutose no meio de cultivo.	56
Figura 17: Perfis de pH (‘ ’) e concentração celular (‘■’) para os experimentos com diferentes concentrações de melaço de cana hidrolisado. 5 g.L ⁻¹ melaço de cana h (a), 10 g.L ⁻¹ melaço de cana h (b), 15 g.L ⁻¹ melaço de cana h (c), 20 g.L ⁻¹ melaço de cana h (d), 25 g.L ⁻¹ melaço de cana h (e), 30 g.L ⁻¹ melaço de cana h (f).	61
Figura 18: Perfis de concentração de glicose (‘▲’), frutose (‘●’) e celular (‘■’) para os experimentos com diferentes concentrações de melaço de cana hidrolisado. 5 g.L ⁻¹ melaço de cana h (a), 10 g.L ⁻¹ melaço de cana h (b), 15 g.L ⁻¹ melaço de cana h (c), 20 g.L ⁻¹ melaço de cana h (d), 25 g.L ⁻¹ melaço de cana h (e), 30 g.L ⁻¹ melaço de cana h (f).	62
Figura 19: Comparação dos valores máximos dos principais parâmetros cinéticos obtidos nos experimentos com diferentes concentrações de melaço de cana hidrolisada.	64
Figura 20: Perfis de concentração celular dos experimentos com glicose (‘●’), sacarose hidrolisada (‘◆’) e melaço de cana hidrolisado (‘▲’). 2 g.L ⁻¹ glicose (a), 5 g.L ⁻¹ glicose (b), 10 g.L ⁻¹ glicose (c).	67
Figura 21: Perfis de concentração celular da batelada alimentada da <i>C. vulgaris</i> em sacarose hidrolisada. Crescimento celular (‘■’) e glicose (‘▲’).	69

Figura 22: Perfis de crescimento celular e DOD na batelada alimentada da microalga <i>C. vulgaris</i> em sacarose hidrolisada. Crescimento celular ('●') e concentração de oxigênio dissolvido DOD ('◆').	70
Figura 23: Fermentação empregando sacarose hidrolisada como fonte de carbono para a <i>C. vulgaris</i> .	70
Figura 24: Perfis de concentração celular da batelada alimentada da <i>C. vulgaris</i> em melaço de cana hidrolisada. Crescimento celular ('■') e glicose('▲').	75
Figura 25: Perfis de crescimento celular e DOD na batelada alimentada da microalga <i>C. vulgaris</i> em melaço de cana hidrolisado. Crescimento celular ('●') e concentração de oxigênio dissolvido DOD ('◆').	75
Figura 26: Fermentação empregando melaço de cana hidrolisado como fonte de carbono para a <i>C. vulgaris</i> . Início da fermentação (a), final da fermentação (b).	76
Figura 27: Cinética de crescimento para a microalga <i>Chlorella vulgaris</i> antes de ser armazenada no ultrafreezer. (cinética zero).	81
Figura 28: Perfis de crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> após de 15 dias de armazenagem no ultrafreezer empregando diferentes criopreservantes. Cinética zero ('■'), primeiro repique ('▲'), segundo repique ('●'), terceiro repique ('◆').	86
Figura 29: Perfis de crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> após de 30 dias de armazenagem no ultrafreezer empregando diferentes criopreservantes. Cinética zero ('■'), primeiro repique ('▲'), segundo repique ('●'), terceiro repique ('◆').	87
Figura 30: Perfis de crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> após de 60 dias de armazenagem no ultrafreezer empregando diferentes criopreservantes. Cinética zero ('■'), primeiro repique ('▲'), segundo repique ('●'), terceiro repique ('◆'), quarto repique('■').	88
Figura 31: Perfis de crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> após de 90 dias de armazenagem no ultrafreezer empregando diferentes criopreservantes. Cinética zero ('■'), primeiro repique ('▲'), segundo repique ('●'), terceiro repique ('◆'), quarto repique('■').	89
Figura 32: Perfis de crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> após de 180 dias de armazenagem no ultrafreezer empregando diferentes criopreservantes. Cinética zero ('■'), primeiro repique ('▲'), segundo repique ('●'), terceiro repique ('◆'), quarto repique('■').	90

Figura 33: Perfis de crescimento da *Chlorella vulgaris* após de 270 dias de armazenagem no ultrafreezer empregando diferentes criopreservantes. Cinética zero (■), primeiro repique (■), segundo repique (●).....91

NOMENCLATURA

Abreviaturas

Abs	Absorbância	
C/N	Razão mássica de Carbono/Nitrogênio	
DMSO	Dimetilsulfóxido	
(m/v)	Relação massa por volume	
(m/m)	Relação massa por massa	
Siglas		
cel/ml	Concentração celular por mililitro	cel/ml
[I]	Concentração do inibidor	g.L^{-1}
n	Número de amostragens analisadas	-
K_i	Constante de inibição	g.L^{-1}
K_m	$-1/x_0$	
P_x, P_{x_max}	Produtividade celular, Produtividade celular máxima	$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
r_s	Taxa de consumo de substrato	$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
S	Concentração do Substrato	g.L^{-1}
s	variância	
T_0, t	Tempo inicial e tempo de residência	H
t_q	Tempo de geração	D
X_0, X_{max}, X	Concentração celular inicial, máxima e no tempo t	g.L^{-1}
x	Média	-
x_i	Intercepto da reta com presença de inibidor	-
x_0	intercepto da reta sem inibidor	-
$Y_{x/s}$	Fator de conversão	g.g^{-1}
VVM	Volume de ar por volume de meio por minuto	VVM

Símbolos Gregos

λ	Duração da fase lag	h^{-1}
μ	Velocidade específica de crescimento	$\text{h}^{-1}, \text{d}^{-1}$
μ_{max}	Velocidade máxima específica de crescimento de um dado ensaio	h^{-1}

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios das sociedades modernas são as crescentes demandas por energias limpas e menos poluentes. Com as questões relativas à poluição ambiental e ao aquecimento global, as preocupações sobre o futuro levaram a ciência a se concentrar em fontes alternativas de energia renovável, sustentável e ambientalmente amigável a fim de encontrar soluções rápidas e efetivas para essas questões.

A alta do petróleo apresentada nos últimos anos tornou o biodiesel uma alternativa viável para o uso conjunto ao diesel, ou até mesmo sua completa substituição. As principais matérias primas comerciais para biodiesel nos últimos anos incluem óleo de soja, colza, palma, milho, gordura animal e óleos residuais, dependendo da abundância local. Contudo, apesar de serem renováveis e produzidas em grande escala, a produção de biodiesel não é satisfatória para suprir a demanda global, além de utilizar grandes áreas de terra para seu cultivo. O cultivo de palma produz óleo em baixas quantidades (menos de 5% da biomassa total) em comparação com as microalgas (10-40% da biomassa total). Cerca de 80% do custo total de produção de biodiesel são derivados dos custos da matéria-prima. Este fato exerce uma clara pressão sobre a produção de fontes de óleo vegetais mais baratas. Por estas razões, o biodiesel de microalgas emerge como uma promessa de fonte de energia alternativa, apresentando vantagens como, por exemplo, cultivo em pequenas áreas de plantação.

Embora a produção de lipídeos de microalgas para combustíveis seja promissora, em escala industrial ainda são um processo inviável, devido os custos elevados da matéria-prima e das tecnologias de coleta da biomassa e extração dos lipídeos.

Deste modo, para tornar o biodiesel de microalgas a um processo competitivo no mercado são necessárias novas pesquisas, visando o desenvolvimento e principalmente, o aperfeiçoamento dos sistemas de produção em escala comercial, a fim de reduzir custos e aumentar a produtividade.

Neste sentido, o cultivo heterotrófico de microalgas pode oferecer vantagens quando comparada ao sistema fotossintético, como a ausência de luz, diminuindo gastos com a iluminação constante. A utilização de efluentes ou subprodutos agroindustriais com alto conteúdo de carbono orgânico (água de maceração de milho, bagaço de mandioca, melaço de cana de açúcar, melaço e vinhaça de soja, resíduos de frutas, entre outros) podem ser empregados em tais cultivos. Essas características poderiam reduzir o custo dos sistemas heterotróficos, sendo uma alternativa econômica e ambiental viável para obtenção de lipídeos a partir de biomassa de microalgas.

O presente trabalho de mestrado estudou sistemas heterotróficos de microalgas, cujo objetivo foi avaliar o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* CPCC90, empregando diferentes fontes de carbono orgânico visando aumentar seu crescimento e produtividade em lipídeos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a produção de biomassa e de lipídeos da microalga *Chlorella vulgaris* em meios de cultura contendo carbono orgânico.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a conversão das fontes de carbono orgânico glicerol, sacarose e melaço de cana em biomassa e lipídeos;
- Maximizar o acúmulo de lipídeos associado a elevadas produtividades celulares;
- Avaliar a viabilidade de estocagem em ultrafreezer da microalga *Chlorella vulgaris* empregando três crioprotetores: Dimetilsulfóxido, metanol e glicerol, nas concentrações de 5 e 10%, e tempos de 15, 30, 60, 90, 180 e 270 dias.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biodiesel

Na última década, o desenvolvimento de biocombustíveis foi considerado uma das maiores estratégias para minimizar os problemas ambientais e de geração de energia em muitos países (Gao, Zhai *et al.*, 2010). Dentre estas fontes alternativas de energia se encontra o biodiesel (Lam e Lee, 2012).

O biodiesel segundo a resolução brasileira n. 7, de 19/03/2008, da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), é um combustível

composto de alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou gorduras animais (Brasil, 2008; Soares, 2010). O mesmo possui propriedades físico-químicas semelhantes ao diesel de petróleo e pode substituir, parcial ou totalmente o diesel fóssil em motores a combustão do ciclo diesel ou em outros sistemas (Chisti, 2008). Este pode ser misturado com o diesel mineral em diferentes concentrações, sendo conhecida a mistura pela letra B, acrescentada ao número que corresponde à fração mássica de biodiesel. Por exemplo, se uma mistura contém 5% de biodiesel é chamada B5. No Brasil foi estabelecida a obrigatoriedade da adição de 5% de biodiesel ao diesel mediante a Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005, após a obrigatoriedade de 2% (Brasil, 2005).

Segundo Meng, Chen *et al.* (2008) o biodiesel apresenta vantagens frente à outras fontes alternativas de combustíveis tais como, caráter renovável e biodegradável, maior ponto de fulgor, boa lubricidade, menor emissão de gases poluentes, menor impacto ambiental, possibilidade de ser adicionado ao diesel de petróleo formando blendas; possibilidade de ser utilizado diretamente em motores ou após pequenas modificações do equipamento, dentre outras (Meng, Chen *et al.*, 2008; Song, Fu *et al.*, 2008; Huang, Zong *et al.*, 2009).

3.2 Microalgas

Microalgas pertencem a um grupo grande e heterogêneo de micro-organismos de ambientes aquáticos (marinhos e de água doce) e do solo. Este grupo inclui uma enorme diversidade de formas e funções ecológicas e são responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da terra (Chisti, 2008). Muitas das espécies ainda não foram identificadas. No entanto, relata-se a existência de 200.000 até alguns milhões de microalgas. São seres com alto potencial comercial, por sua composição bioquímica, e diversidade ilimitada de bioprodutos, dando às microalgas, uma alternativa de estudo para o aproveitamento em diferentes atividades econômicas (Pulz, 2004; Amaro, Guedes *et al.*, 2011).

As microalgas podem ser cultivadas em água doce ou em situações de salinidade extrema, e são capazes de produzir inúmeros bioprodutos, dentre eles: ácidos graxos,

carotenóides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis, bioativos dentre outros (Revsbeck, 1983; R., 2006; Song, Fu *et al.*, 2008). De forma geral, os cultivos de microalgas apresentam elevadas taxas de crescimento, fato que proporciona alta produção de biomassa em curtos intervalos de tempo. A produtividade de alguns sistemas algáceos é superior a de quaisquer culturas agrícolas conhecidas (Pulz, 2004). Cabe comentar que, tanto a quantidade quanto a qualidade dos bioprodutos é variável em função das condições de cultivo utilizadas.

Diferentes espécies de algas produzem variadas quantidades de óleo, algumas delas produzem até 50% de óleo por massa seca (Morowvat, Rasoul-Amini *et al.*, 2010). Os ácidos graxos das microalgas conhecidas apresentam composição semelhante a dos ácidos graxos utilizados na produção de biodiesel, neste caso é importante dizer que para a produção de biodiesel são desejáveis os ácidos graxos C16:0, C16:1, C18:0 e indesejáveis os C18:3 (Song, Fu *et al.*, 2008).

A Tabela 1 descreve a composição de ácidos graxos presente na microalga *Chlorella vulgaris* de acordo com a literatura.

Tabela 1: Composição de ácidos graxos da microalga *Chlorella vulgaris*.

Acido Graxo	Conteúdo %
16:0 (Acido Hexadecanóico)	15,2 - 22,6
17:0 (Acido Heptadecanóico)	0,1
18:0 (Acido esteárico)	14,6
16:1n9c (Acido palmitoleico)	0,35 - 1,17
18:1	16,3
18:2	79,4
18:3	0,1
18:1n9c (Acido Oleico)	5,6 - 50,8
18:2n6,9c (Acido linoleico)	3,39 - 9,73
18:3n6 (γ-linoleico)	24,42

Fonte:(Lee, Yoo *et al.*, 2010).

3.2.1 Microalgas como fonte de biodiesel

As primeiras publicações sobre o potencial de microalgas como fonte de combustível foram no início dos anos 1980 (Wake e Hillen, 1980; Sawayama, Inoue *et al.*, 1995) e tais estudos tem aumentado de maneira considerável nos últimos anos, sendo catalogadas como candidatas promissoras de sistemas de energia eficiente (Chisti, 2007). As maiores vantagens do cultivo de microalgas são não competir com a agricultura por terras aráveis e o uso de água salgada nos sistemas de cultivo, possibilitando a redução da demanda por água potável. O cultivo e coleta de microalgas não é restrito a poucos períodos do ano, já que seu cultivo é menos susceptível as condições meteorológicas (Rupprecht, 2009).

A literatura descreve três gerações de biocombustíveis: os biocombustíveis de primeira geração obtidos a partir de produtos alimentícios com alto conteúdo de açúcares (por exemplo, beterrabas, mandioca, cana de açúcar, batatas) ou de óleo (soja, canola); biocombustíveis de segunda geração, produzidos a partir de fontes lignocelulósicas (por exemplo, resíduos florestais, bagaço de cana de açúcar); e biocombustíveis de terceira geração, produzidos a partir de microalgas e outros micro-organismos (Meng, Yang *et al.*, 2009). A segunda geração de biocombustíveis é significativamente mais sustentável do que a primeira. Alguns estudos da literatura têm mostrado que os biocombustíveis de primeira geração podem economizar até 60% das emissões de carbono em comparação aos combustíveis fósseis, enquanto biocombustíveis de segunda geração elevam esse número para 80% (Pronina, 1998; Miao e Wu, 2006; Meng, Yang *et al.*, 2009). Os combustíveis de primeira geração têm também restrição ao uso de terra cultivável e, mesmo as reservas de grãos para fins alimentícios, parecem ser escassas. Esta promove o efeito “dominó” com aumento expressivo no preço dos mesmos, acarretando inclusive aumento dos preços de outros alimentos (Gressel, 2008).

Service (2009) cita algumas desvantagens da produção de biocombustíveis a partir de matérias primas alimentares, tais como o aumento potencial do valor dos

alimentos, o grande volume de água utilizado para a irrigação de tais culturas e a poluição de corpos d'água por fertilizantes nitrogenados, e enfatiza que, futuramente, bicomcombustíveis provenientes de cadeias produtivas de elevado valor entrarão em declínio e deverão ser substituídos por aqueles derivados de resíduos.

A produção de biodiesel a partir de lipídios microbianos pode ser vista como uma excelente alternativa para redução do custo dos combustíveis obtidos a partir de matérias primas alimentares. Os organismos unicelulares produtores de óleos (*single cell oils*, SCO), definidos como aqueles que apresentam um conteúdo lipídico acima de 20%, tem atraído grande atenção mundial. Dentre os micro-organismos, tais como microalgas, bactérias, fungos e leveduras. A primeira produção comercial de SCO iniciou em 1995, durando apenas seis anos, e após esse período ela foi encerrada por não ser rentável (Ratledge, 2008). Segundo Francisco et al. (2009), as microalgas, produtoras de lipídeos microbianos são promissoras matérias-primas para a produção de biodiesel, visto que diversas características essenciais de seus óleos são desejáveis e adequadas à substituição de diesel.

Neste sentido o biodiesel de terceira geração apresenta vantagens frente os outros, podendo representar uma importante tecnologia a ser desenvolvida para a nova matriz energética que as sociedades estão buscando.

Muitos trabalhos reportam que o rendimento em óleo obtido por área de cultivo é bastante mais significativo em cultivos de microalgas quando comparado ao rendimento obtido com o cultivo de oleaginosas (Tabela 2), o que de acordo com algumas estimativas o rendimento por acre de óleo de algas é 200 vezes maior que o rendimento de óleo de vegetais (Abou-Shanab, Matter *et al.*, 2011).

Tabela 2: Comparação da eficiência da produção estimada de biodiesel a partir de plantas vasculares e microalgas

Matéria-prima de biodiesel	Área necessária para atender a demanda mundial de óleo (10 ⁶ hectares)	Porcentual de superfície terrestre global necessária	Percentual de área global de terra arável necessária
Algodão	15000	101	757
Soja	10900	73	552
Semente de mostarda	8500	57	430
Girassol	5100	34	258
Colza/Canola	4100	27	207
Pinhão manso	2600	17	130 (0) ^a
Óleo de Palma	820	5,5	41
Microalga (10 g/m ² /dia, 30% TAG)	410	2,7	21 (0) ^b
Microalga (50 g/m ² /dia, 50% TAG)	49	0,3	2,5 (0) ^b

^a Pinhão manso cultivado principalmente em terras marginais.

^b Assumindo que as lagoas de microalgas e bioreatores estão localizados em área de terra não arável. **Fonte:** (Smith, Sturm *et al.*, 2010).

As microalgas apresentam elevadas concentrações dos ácidos graxos: C16:0, C16:1 e C18:1, ditos compostos desejáveis na produção de biodiesel (Meng, Yang *et al.*, 2009). A Tabela 3 traz uma comparação entre os conteúdos de lipídeos de microalgas e de outros micro-organismos produtores de lipídeos.

Tabela 3: Comparação do conteúdo de lipídeos de alguns micro-organismos oleaginosos.

	Micro-organismos	Conteúdo de lipídeos (%) peso seco	Composição do conteúdo total de lipídeos (m/m)					
			C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Microalga	<i>Botryococcus braunii</i>	25-75						
	<i>Cylindrotheca</i> sp	16-37						
	<i>Nitzschia</i> sp.	45-47	12-21	55-57	1-2	58-60	4-20	14-30
	<i>Schizochytrium</i> sp	50-77						
	<i>Chlorella</i> sp	15-50						
Bacteria	<i>Arthrobacter</i> sp	>40						
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38						
	<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25	8-10	10-11	11-12	25-28	14-17	-
	<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24						
Leveduras	<i>Candida curvata</i>	58						
	<i>Cryptococcus albidus</i>	65						
	<i>Lypomyces starkeyi</i>	64	11-37	1-6	1-10	28-66	3-24	1-3
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72						
Fungos	<i>Aspergillus oryzae</i>	57						
	<i>Mortierella isabellina</i>	86						
	<i>Humicola lanuginosa</i>	75	7-23	1-6	2-6	19-81	8-40	4-42
	<i>Mortierella vinacea</i>	66						

Fonte: adaptada de (Meng, Yang *et al.*, 2009).

A Tabela 4 apresenta uma comparação dos principais parâmetros de qualidade do biodiesel de microalga obtido da *Chlorella protothecoides* com o diesel e as especificações estabelecidas por normas internacionais ASTM para biodiesel. Vale ressaltar que o biodiesel de microalga encontra-se dentro das especificações das normas internacionais para combustíveis.

Tabela 4: Comparação dos principais parâmetros de qualidade do diesel e biodiesel de microalga.

Propriedades	Biodiesel de <i>C. protothecoides</i>	Combustível Diesel	ASTM Padrão Biodiesel
Densidade (Kg L ⁻¹)	0,864	0,838	0,840 - 0,90
Viscosidade (mm ² s ⁻¹ a 40 °C)	5,2	1,9 – 4,1	3,5 – 5,0
Ponto flash (°C)	115	75	Min 100
Ponto de solidificação (°C)	-12	-50 a 10	-
Ponto de entupimento de filtro a frio (°C)	-11	-3,0 Max -6,7	Verão Max 0 Inverno Max < -15
Acidez mg KOH g ⁻¹	0,374	Max 0,5	Max 0,5
Poder Calorífico MJ Kg ⁻¹	41	40 – 45	-
Relação H/C	1,81	1,81	-
Número de cetano min	50	40	47
Índice de estabilidade de oxidação a 110°C min. (h)	9,1	9	6

Fonte:(Xu, Miao *et al.*, 2006)

Xu, Miao *et al.* (2006), citaram que, se a produção de microalgas fosse escalonada industrialmente, menos de 41 milhões de hectares no mundo seriam necessários para responder à atual demanda de combustíveis, o que seria uma meta representativa para a agricultura global. No entanto, os combustíveis de algas ainda não são produzidos em escala comercial, devido os altos custos das tecnologias de coleta da biomassa, extração dos lipídeos, da matéria-prima e as baixas produtividades

obtidas no processo de produção de microalgas. Suas perspectivas econômicas são promissoras, portanto muitas empresas estadunidenses buscam um processo comercialmente rentável, algumas delas estão apresentadas na Tabela 5 (Chisti e Yan, 2011).

Tabela 5: Companhias que investem atualmente na produção para comercialização de combustíveis de algas.

Companhia	Localização	Site
Algenol Biofuels	Bonita Springs, FL, USA	www.algenolbiofuels.com
Aquaflow	Nelson, New Zealand	www.aquaflowgroup.com
Aurora Algae, Inc.	Hayward, CA, USA	www.aurorainc.com
Bioalgene	Seattle, WA, USA	www.bioalgene.com
Bionavitas, Inc.	Redmond, WA, USA	www.bionavitas.com
Bodega Algae, LLC	Boston, MA, USA	www.bodegaalgae.com
LiveFuels, Inc.	San Carlos, CA, USA	www.livefuels.com
PetroAlgae Inc.	Melbourne, FL, USA	www.petroalgae.com
Phyco Biosciences	Chandler, AZ, USA	www.phyco.net
Sapphire Energy, Inc.	San Diego, CA, USA	www.sapphireenergy.com
Seambiotic Ltd.	Tel Aviv, Israel	www.seambiotic.com
Solazyme, Inc.	South San Francisco, CA, USA	www.solazyme.com
Solix Biofuels, Inc.	Fort Collins, CO, USA	www.solixbiofuels.com
Synthetic Genomics Inc.	La Jolla, CA, USA	www.syntheticgenomics.com

Fonte: (Chisti e Yan, 2011).

Desde que resolvidos os problemas dos altos custos e baixas produtividades no processo, que impedem a produção comercial de biodiesel, a partir de microalgas, estas provavelmente serão uma importante matéria-prima energética; e o óleo de algas poderá substituir fontes derivadas dos combustíveis fósseis (diesel, gasolina e

querosene), e se tornar uma das matérias primas renováveis, gerando um impacto positivo para o meio ambiente (Chisti e Yan, 2011).

3.2.2 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris é uma microalga verde unicelular, pertencente ao Reino: Protista, Filo: Chlorophyta, Classe: Chlorophyceae, Ordem: Chlorococcales, Família: Oocystaceae, e Gênero: *Chlorella* (Lee, Park *et al.*, 2008)(algaebase, 2012). São de forma esférica, com cerca de 2-10 μ m de diâmetro, sem flagelo, e contém pigmentos verdes fotossintéticos nos seus cloroplastos (Lourenço, 2007).

A Tabela 6 apresenta um resumo dos estudos realizados para a espécie *Chlorella vulgaris* com diferentes condições de cultivo e de fontes de carbono para a produção de lipídeos.

Tabela 6: Estudos realizados em sistema heterotrófico com diferentes fontes de carbono e tipo de cultivo para a espécie *Chlorella vulgaris*.

Fonte de carbono	Tipo de cultivo	T °C	Meio de cultivo	Biomassa (mg/L.d)	Lipídeos (mg/L.d)	Referência
Glicose	Erlenmeyers	25	Bristol	125	3,5	(Yeh e Chang, 2012)
Glicose/CO ₂			modificado	125	67,4	
Glicose	Semi-contínuo	30	Água residual artificial/Glicose	114	147	(Feng, Y., Li, C. <i>et al.</i> , 2011)
Glicose	Batelada		Bristol	500	129,5	(Yeh, Chen <i>et al.</i> , 2012b)
Frutose			modificado	120	20	
Sacarose				20	2,4	
Glicerol				8	1,1	
Acetato de sódio				15	1,76	
Acetato de sódio	Erlenmeyers	25	-	87	4	(Liang, Sarkany <i>et al.</i> , 2009)
Glicose				151	35	
Glicerol				91	31	
Glicose/luz				254	54	
Glicose	Erlenmeyers	28	Basal modificado	1400	325	(Mitra, Van Leeuwen <i>et al.</i> , 2012)
Soro de leite de soja			-	625	75	
Vinhaça de milho			-	1450	525	
Glicose	Erlenmeyers	25	Rodriguez-López	126,7	7,5	(Orús, Marco <i>et al.</i> , 1991)

3.3 Cultivos heterotróficos

Com relação à forma de utilização da fonte de carbono as microalgas apresentam três tipos de metabolismo: autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. No metabolismo autotrófico a luz é a fonte de energia e o CO₂ a fonte de carbono sendo convertidos em energia química pelas reações fotossintéticas das células. No metabolismo heterotrófico as células utilizam somente compostos orgânicos como fonte de carbono e energia e no metabolismo mixotrófico os organismos utilizam tanto o autotrófico como o heterotrófico, dependendo da concentração de compostos orgânicos e intensidade de luz disponível (Lourengo, 2007).

Apesar das microalgas serem frequentemente consideradas fotoautotróficas, requerendo luz para seu crescimento, segundo Wen e Chen (2003), um número considerável de microalgas é capaz de crescer heterotroficamente, com um ou mais substratos orgânicos como fonte de energia. Para este tipo de microalga, tecnologias de fermentação podem ser adotadas e modificadas para produção em grande escala de bioprodutos.

As células da *Chlorella* possuem um sistema de transporte ativo induzido para a glicose, fato que poderia ser controlado pela síntese da proteína ligada à membrana citoplasmática, tendo assim um aumento significativo na captação da glicose. A captação é acompanhada por uma absorção estequiométrica de prótons de 1-1 e uma despolarização do potencial da membrana. No caso de aminoácidos, como arginina, são ativamente transportados pelas membranas celulares. O pequeno tamanho molecular de alguns ácidos orgânicos (ácido acético, ácido láctico) e álcool (etanol) permitem sua difusão para dentro das células. Em termos de crescimento e produtividade é amplamente observado que a taxa de crescimento específico de algas cultivadas heterotroficamente, empregando açúcares simples (glicose) e ácidos orgânicos (ácido acético, ácido láctico), são menores do que em sistemas autotróficos. A *Chlorella vulgaris* é uma das exceções, pois seu crescimento em sistemas heterotróficos é maior do que em sistemas autotróficos (Abeliovich, 2004).

O cultivo heterotrófico de microalgas pode ser uma alternativa viável frente ao cultivo autotrófico, pois este tipo de cultivo utiliza fontes orgânicas de carbono tais como açúcares ou ácidos orgânicos como únicas fontes de energia, deste modo se elimina a necessidade de luz, oferecendo em muitos casos um aumento significativo na produtividade da biomassa (Chen, 1996). O volume de água utilizada também é um fator representativo em cultivos heterotróficos que utilizam efluentes agroindustriais com elevado teor de carboidratos, minimizando custos com água e favorecendo o reuso de efluentes que originalmente seriam enviados para tratamento antes de seu despejo em corpos de água (Feng, Yujie, Li, Chao *et al.*, 2011).

A microalga *Chlorella* mostra-se capaz de crescer rapidamente entre 7 a 10 dias em sistemas heterotróficos (Shi, Zhang *et al.*, 2000; Miao e Wu, 2006; Heredia-Arroyo, Wei *et al.*, 2010; Shen, Yuan *et al.*, 2010; Ni, Xie *et al.*, 2011). Um organismo cultivado em heterotrofia deve possuir capacidade de se dividir e metabolizar no escuro, ser resistente e capaz de crescer em meios de baixo custo e de fácil esterilização, ter rápida adaptação ao novo ambiente (robustez), com uma fase lag curta ou ausente e resistência a fermentadores e equipamentos periféricos (Tan, 1996; Wen e Chen, 2003).

Segundo Amaro, Guedes *et al.* (2011) a produtividade de óleos nas microalgas é melhorada no cultivo heterotrófico, gerando maior interesse nestes tipos de cultivos. Um aumento do conteúdo de lipídios de 40% foi observado na *Chlorella protothecoides*, ao passar de cultivo autotrófico para heterotrófico.

Microalgas heterotróficas são capazes de crescer na ausência de luz, portanto, devem obter energia a partir de pelo menos uma fonte de carbono orgânico, as mais empregadas são o acetato e a glicose (Springer, 1994; Vazhappilly, 1998).

Glicose é a fonte de carbono mais empregada em cultivos heterotróficos de microalgas, atingindo taxas maiores de crescimento quando comparado com outros substratos, tais como açúcares, álcoois de açúcar, fosfato de açúcares, ácidos

orgânicos e álcoois. Isso pode acontecer porque a glicose contém maior concentração de energia por mol em comparação com outros substratos. Por exemplo, a glicose produz 2,8 KJ / mol de energia em comparação com 0,8 KJ /mol de acetato, e promove mudanças fisiológicas em *Chlorella vulgaris*, afetando as vias metabólicas de assimilação de carbono, tamanho das células e maior armazenamento de materiais, tais como amido e lipídios (Perez-Garcia, Escalante *et al.*, 2011b).

Estudos com *Chlorella* indicaram a glicose como a melhor fonte de carbono em cultivos heterotróficos, atingindo altas concentrações de biomassa e lipídeos (Huang, Chen *et al.*, 2010; Yeh, Chen *et al.*, 2012b). No entanto a glicose é uma fonte carbono de custo elevado, responsável por 60-75% do custo total do biodiesel (Canakci M, 2008). Neste sentido é importante estudar fontes alternativas de carbono de baixo custo e que gerem produtividades de biomassa e óleo similares ou superiores as obtidas com glicose. Portanto, alguns pesquisadores têm avaliado fontes de carbono orgânico hidrolisadas como, por exemplo, hidrolisado de milho, melaço e sorgo. A utilização de hidrolisados em cultivos heterotróficos, em termos econômicos, pode reduzir em até 50% os custos de produção, o que é importante para a produção de biodiesel (Xu, Miao *et al.*, 2006; Gao, Zhai *et al.*, 2010; Huang, Chen *et al.*, 2010; Yan, Dong, Lu, Yue *et al.*, 2011; Liu, Huang *et al.*, 2012).

Um dos principais subprodutos gerado na produção de biodiesel é o glicerol bruto, sendo que aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido correspondem ao glicerol (Johnson, 2007; Ethier, Woisard *et al.*, 2011). O aumento na produção de biodiesel levou ao aumento também de glicerol, gerando um excesso de oferta e, conseqüentemente, a redução do preço no mercado (Johnson, 2007; Tang, 2009). Investigações recentes avaliaram o potencial de aplicação do glicerol bruto em diferentes setores, como por exemplo: na alimentação animal, processos de fermentação para a produção de 1,3 propanodiol (intermediário da síntese de polímeros empregados na fabricação de cosméticos), indústria alimentícia e farmacêutica de acordo com (Tang, 2009), obtenção de pigmentos a partir de microalga *Spirulina platensis* (Narayan M, 2005; Chi, Pyle *et al.*, 2007), produção de hidrogênio gasoso

(Ethier, Woisard *et al.*, 2011) e ácido docosahexaenóico (DHA), dentre outros (Chi, Pyle *et al.*, 2007).

Glicerol é uma substância que tem a capacidade de aumentar a força osmótica em solução e conseqüentemente, mantém o equilíbrio osmótico nas células, fonte de energia econômica, além de ser um soluto compatível com enzimas e membranas, quase sem efeitos tóxicos em altas concentrações (Perez-Garcia, Escalante *et al.*, 2011b).

A sacarose um dos produtos de armazenamento no citoplasma das células vegetais constitui até 60% da biomassa seca de algumas plantas e pode ser obtida principalmente a partir da cana de açúcar e beterraba. Sua hidrólise produz 1 mol de glicose e 1 mol de frutose por mol de sacarose. Dentre as diversas finalidades da sacarose, ela pode ser utilizada na produção de etanol e em outros processos fermentativos. A produção de etanol a partir da cana de açúcar promove a formação de um resíduo que contém sacarose, podendo ser utilizado em cultivos fermentativos (Olguín, Sánchez-Galván *et al.*, 2008; Satyawali e Balakrishnan, 2008).

Dentre as fontes de carbono orgânico de baixo custo encontra-se o melaço de cana que é um resíduo da indústria açucareira, composto principalmente pelos açúcares sacarose, glicose e frutose, alguns colóides em suspensão, metais pesados (principalmente cobre e zinco), vitaminas e compostos nitrogenados. Sua composição varia de acordo com a variedade de cana, condições agroclimáticas da região, processo de fabricação do açúcar, armazenagem etc (Godbole, 2002). Tem sido utilizado como matéria prima para fermentação de ácidos orgânicos (butírico, succínico, láctico e cítrico) (Huang, Xiang *et al.*, 2011), produção de biodiesel a partir da *Chlorella protothecoides*, (Yan, Dong, Lu, Yue *et al.*, 2011), em cultura mista com *Rhodotorula glutinis* e *Chlorella vulgaris* na produção de lipídeos (Cheirsilp, Suwannarat *et al.*, 2011), produção de antaxantina por *Chlorella zofingiensis* (Liu, Huang *et al.*, 2012).

A Tabela 7 apresenta a composição química aproximada do melaço de cana.

Tabela 7: Composição química do melaço de cana da América do Sul.

Propriedade	Composição	Propriedade	Composição	Propriedade	Composição
Brix (°) ^a	87-93	Gordura total (%) ^c	0,4	Cálcio (%) ^c	0,74
Gravidade específica ^a	1,46 -1,50	Fibra total (%) ^b	0	Magnésio (%) ^c	0,35
Sólidos totais (%) ^a	81-96	Cinzas (%) ^b	8.1	Glicina (%) ^c	0,10
Água (%) ^b	17,3	Oxido de Cálcio (%) ^a	1,3 – 3,9	Leucina (%) ^c	0,01
Açúcar total (%) ^a	49-54	Fósforo (%) ^b	0,08	Lisina (%) ^c	0,01
Açúcares redutores (%) ^a	2,5 – 5,2	Potássio (%) ^b	2,4	Treonina (%) ^c	0,06
Sacarose (%) ^b	52	Sódio (%) ^b	0,2	Valina (%) ^c	0,02
Glicose (%) ^b	12	Cloro (%) ^b	1,4	Colina (ppm) ^c	600
Frutose (%) ^b	9	Enxofre (%) ^b	0,5	Niacina (ppm) ^c	48,86
Proteína crua (%) ^b	3	Acido pantoténico (ppm) ^c	42,90	Tiamina (ppm) ^c	0,88
Piridoxina (ppm) ^c	44	Riboflavina (ppm) ^c	4,40		

^a (Godbole, 2002)^b (Satyawali e Balakrishnan, 2008)^c (Fajardo, 2007)**Fonte:** (Godbole, 2002; Fajardo, 2007; Satyawali e Balakrishnan, 2008)

Outro aspecto que se deve levar em consideração em sistemas heterotróficos é a relação carbono/nitrogênio (C/N), que podem influenciar o teor de lipídeos acumulados pela célula, controlando a síntese de lipídios (Gordillo, 1998). Altas taxas de C/N favorecem o acúmulo lipídico, que é provocado pelo esgotamento de nitrogênio na cultura (Ratledge, 1989). Chen (1991), em seus estudos com a microalga *Chlorella sorokiniana* estabeleceram uma taxa de 20 como ideal, para a relação de C/N, obtendo um aumento no teor lipídico proporcional ao aumento da taxa C/N. Tais autores também citam que a relação C/N pode ser utilizada para manipular a composição de ácidos graxos, obtendo altas concentrações de ácidos graxos insaturados para baixas taxas de C/N.

3.3 Criopreservação de microalgas

Dentre as técnicas de preservação em longo prazo para microalgas se encontram a liofilização, o congelamento em ultrafreezers e a criopreservação em nitrogênio (Morgan, 2006a).

A técnica mais utilizada na conservação de microalgas utilizadas na CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) e UTEX (The culture collection algae) é a criopreservação em nitrogênio líquido (Andersen, 2005). Contudo em nosso laboratório contamos com um ultrafreezer e visamos utilizá-lo no armazenamento e criopreservação das microalgas. Nosso objetivo principal é padronizar uma metodologia definida para preservação da *Chlorella vulgaris*, a fim de otimizar o espaço físico, custo, material e trabalho da manutenção dos cultivos.

As técnicas de preservação empregando congelamento à -80°C requerem a utilização de um agente crioprotetor para evitar o rompimento das células (Zdenek, 2003). Os crioprotetores são compostos que eliminam ou diminuem significativamente a destruição das estruturas celulares durante o congelamento. Para a conservação e preservação da viabilidade dos micro-organismos, morfológica, bioquímica, taxonômica e genéticas é necessário que o criopreservante não seja tóxico, seja hidrofílico, não seja facilmente reativo com a água, previna a hiperconcentração na suspensão,

estabilize as pontes de hidrogênio nos cristais, previna a formação de cristais grandes, e tenha boa penetração celular (somente para crioprotetores endocelulares). A escolha de um criopreservante ou a combinação deles dependerá do micro-organismo e deverá ser determinada empiricamente, pois vários fatores afetarão a eficiência do mesmo, como, por exemplo, a espécie, linhagem, tamanho e forma das células, fase e taxa de crescimento, temperatura de incubação, osmolaridade, composição do meio criopreservante, quantidade de água dentro da célula, sua densidade quando congelada, taxa de congelamento, entre outros. Dentre esses fatores, o mais importante é a composição do meio em que as células estão suspensas durante o congelamento. (Morgan, 2006b).

Tem-se estudado a capacidade de preservação de diferentes substâncias crioprotetoras, segundo a cepa a armazenar. A Tabela 8 apresenta a utilização de crioprotetores em artigos publicados para diferentes micro-organismos. O numerador indica o número de artigos que utilizaram somente o composto, e o denominador indica a utilização do composto em conjunto com outro crioprotetor (Zdenek, 2003).

Tabela 8: Crioprotetores utilizados na conservação de micro-organismos.

Composto	Vírus	Bactéria	Fungo	Alga	Protozoo
Dimetilsulfóxido	14/6	42/12	31/8	42/7	76/56
Metanol	-	2/0	2/1	17/2	0/1
Etanol	-	-	1/0	1/0	-
Álcool polivinílico	-	0/1	1/0	-	1/0
Etilenoglicol	-	1/0	3/1	1/1	2/1
propilenoglicol	-	1/0	2/0	1/1	0/2
Trietenoglicol	-	-	-	-	1/0
Dietilenoglicol	-	2/0	-	-	-
Polietilenoglicol	-	3/0	2/0	0/1	0/1
Óxido de polietileno	1/0	3/0	-	-	-
Glicerol	7/6	63/23	79/5	17/4	56/48
Manitol e ducitol	-	-	1/0	1/0	-
Inositol	-	0/1	1/0	-	-
Sorbitol	1/0	-	1/1	2/7	0/3
Glicose	1/0	2/9	5/3	-	0/12
Xylose	-	-	-	-	0/2
Sacarose	6/0	14/7	4/5	4/2	0/2

Lactose	-	2/3	1/1	-	-
Maltose	-	-	-	0/1	0/8
Trealose	1/0	1/2	3/1	-	-
Rafinose	-	-	-	0/1	-
Dextrano	1/0	7/1	1/0	1/1	0/1
Hidroxietilamido	-	-	1/0	-	0/3
Metilcelulose	-	1/0	-	-	-
Ficoll	-	1/0	0/1	0/1	0/1
Goma arábica	-	1/0	-	-	-
Acetamida	-	1/0	-	-	0/1
Dimetilformamida	-	1/0	-	-	-
Dimetilacetamida	-	1/0	-	-	0/1
Succinimida	-	1/0	-	-	-
Metilpirrolidona	-	1/0	-	-	-
Polivinilpirrolidona	1/0	7/1	1/0	5/2	0/12
Prolina	-	-	-	2/1	-
Acido glutâmico	-	3/1	-	1/1	-
Acetato de amônio	1/0	-	-	-	-
Citrato	1/0	-	-	-	--
Sangue	-	5/16	-	-	19/51
Soro de sangue	12/10	11/11	1/9	1/0	10/59
Soro de albumina	7/0	6/2	-	-	1/7
Gelatina	-	4/1	2/1	-	-
Peptona	3/0	8/7	1/14	0/1	1/3
Soja tripticase	-	0/8	1/1	0/1	0/10
Extrato de concha	-	2/0	-	-	-
Glicoproteínas	-	2/0	1/2	-	-
Mucina	-	1/0	-	-	-
Valinomicina	-	1/0	-	-	-
Gramicidina	-	1/0	-	-	-
Extrato de levedura	-	3/8	1/14	-	0/10
Extrato de malta	-	2/0	1/10	-	-
Leite desnatado	3/1	32/11	2/6	3/0	0/3
Gema de ovo	1/0	1/0	-	1/0	-
Mel	-	2/0	-	-	-

Fonte:(Zdenek, 2003)

Tendo como referência a literatura, protocolos de criopreservação encontrados foram adaptados ao uso do ultrafreezer para a conservação de microalgas. Deste modo, foram testados os três crioprotetores mais usados para criopreservação de microalgas, como foi apresentado na tabela 8: Dimetilsulfóxido (DMSO), Metanol e glicerol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo e condições de cultivo

Foi utilizada a microalga *Chlorella vulgaris* CPCC90, obtida do Canadian Phycological Culture Centre, mantida e propagada em ágar inclinado em meio sintético BBM (Stein, 1973). Sua composição encontra-se descrita na Tabela 9 e ao meio foi adicionado ágar numa concentração de 15 g.L⁻¹. As condições de manutenção foram de 20°C e 10 g.L⁻¹ de glicose, em ausência de luz.

Tabela 9: Composição do meio sintético BBM (pH 6,8).

Componente	(g.L ⁻¹)	Componente	(g.L ⁻¹)
Na ₂ EDTA	0,050	Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0,00498
KOH	0,0031	H ₂ SO ₄	0,00184
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,025	H ₃ BO ₃	0,01142
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,00882
K ₂ HPO ₄	0,075	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00144
KH ₂ PO ₄	0,175	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,00157
NaCl	0,025	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,00049
NaNO ₃	0,250	MoO ₃	0,00071

4.2 Preparo do Ágar inclinado para cultivo heterotrófico

Chlorella vulgaris CPCC90, foi transferida para Erlenmeyers de 250 ml contendo ágar inclinado em meio BBM, acrescentado a fonte de carbono a ser avaliada em concentração de 2 g.L⁻¹ (glicerol, sacarose hidrolisada ou melaço hidrolisado), e

nitrato de sódio em quantidade suficiente para manter a relação de C/N em 20. Os frascos de ágar inclinado foram cultivados na ausência de luminosidade numa temperatura de 26°C, por aproximadamente 8 dias.

4.3 Preparo do inóculo e condições de axenia

Após 8 dias de cultivo, aos frascos inclinados de *Chlorella vulgaris* (CPCC90) foram adicionados 3 ml de meio BBM e, com a ajuda de uma alça de inoculação descartável, as células foram ressuspensas na fase líquida, agitando o frasco para sua homogeneização. Todo o volume de células ressuspensas foi transferido para um novo Erlenmeyer para obtenção de uma concentração de células homogênea. Foram adicionados 2,5 ml de suspensão de células a cada um dos Erlenmeyer contendo 47,5 ml de meio BBM com 5 g.L⁻¹ da fonte de carbono a ser avaliada (glicerol, sacarose hidrolisada ou melaço hidrolisado) e nitrato de sódio em quantidade suficiente para manter a razão C/N em 20. Os Erlenmeyers foram mantidos em incubadora rotatória, sob agitação constante a 140 rpm e temperatura de 26°C, em ausência de luminosidade.

A concentração celular do inóculo foi monitorada diariamente por medida da densidade óptica a 680nm em Espectrofotômetro digital UV-Vis, Genesys-10 UV. O inóculo foi utilizado em sua fase exponencial de crescimento, entre 70 e 96 horas de cultivo, atingindo concentrações entre 5 e 6 g.L⁻¹. O inóculo foi adicionado ao meio de cultivo e cada fermentação foi iniciada em concentração celular de 0,3 g.L⁻¹.

Todos os procedimentos foram executados assepticamente, em câmara de fluxo laminar, e os materiais e meios de cultivo utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos. A axenia dos cultivos foi verificada por microscopia ótica, em um Microscópio modelo BVM-100 (Marca Bel Photonics, Milano, Itália).

4.4 Condições experimentais

4.4.1 Cultivo em incubadora rotatória

Os cultivos foram incubados em incubadora rotatória (modelo 430-RD- Nova Ética), sob agitação constante a 140 rpm e temperatura de 26°C, na ausência de luminosidade. O volume de trabalho foi de 50 ml e a concentração do inóculo de 0,3 g.L⁻¹. Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

4.4.2 Cultivo em biorreator

As melhores condições encontradas em incubadora rotatória, para os substratos testados, foram executadas em um biorreator BioFlo/Celli Gen 115 (New Brunswick) com volume útil de 2,0 litros. A concentração de oxigênio dissolvido (DOD) e pH foram monitoradas por eletrodos específicos. A velocidade de agitação, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido foram registradas pelo software Bio Command Track and Trend. Revisão C. 2011(New Brunswick Scientific). O volume de trabalho foi de 1,5 litros e 0,3 g.L⁻¹ de concentração inicial de inóculo. A temperatura do sistema foi mantida constante em 26 °C e os cultivos foram realizados na ausência de luminosidade cobrindo-se a cuba do fermentador com papel pardo.

A velocidade de agitação foi relacionada com a concentração de oxigênio dissolvido, de modo que a concentração de oxigênio dissolvido fosse mantida no mínimo em 20%. A velocidade de agitação variou entre 150 rpm e 250 rpm. A aeração foi fixada em 1,5 VVM (2,25 litros de ar/min)

Foram realizadas duas alimentações, para todos os experimentos, com meio BBM concentrado 7,5 vezes mantendo sempre a relação carbono/nitrogênio em 20. As alimentações foram realizadas após esgotamento da fonte de carbono no meio de cultivo.

As amostragens foram realizadas em espaços diferentes de tempo, variando com o crescimento da microalga, sendo monitorado o consumo de substrato e crescimento celular.

Todas as fermentações foram realizadas em duplicata.

4.5 Metodologia Analítica

O pH foi monitorado ao longo dos cultivos por método potenciométrico utilizando-se um potenciômetro (QUIMIS, modelo Q-400A).

A concentração celular foi determinada por medida da densidade ótica, a 680nm em um espectrofotômetro digital UV-Vis, Genesys-10 UV. Como branco foi utilizada água destilada para os cultivos com glicerol, pois o meio de cultivo possui tonalidade semelhante a da água e, para os cultivos com melaço de cana hidrolisado e sacarose hidrolisada foram utilizados o próprio meio, isento de células, pois os meios de cultivos possuem uma tonalidade marrom. Paralelamente, a concentração celular foi verificada por massa seca, utilizando filtração a vácuo de 15mL de meio de cultura em membrana de 0,22 μ m. A biomassa filtrada foi seca em estufa à 60°C e submetida à peso constante. Finalmente foram realizadas curvas de calibração para o cálculo da concentração celular, baseados nas relações obtidas em cada ponto por massa seca e densidade ótica.

O consumo de glicose foi determinado pelo método enzimático colorimétrico glicose-oxidase, marca Laborlab. Para a análise foi empregado 20 μ L da amostra e adicionados 2 mL do reagente enzimático, incubados a 37°C por 10 min. Após resfriamento a absorbância foi lida a 505 nm em um Espectrofotômetro digital UV-VIS, Genesys-10 UV.

O consumo do glicerol foi determinado pelo método enzimático colorimétrico para determinação de triglicérides, marca Laborclin. Para a análise foi empregado 10 μ L da amostra e adicionados 1 mL do reagente enzimático, incubados a 37°C por 15 min.

Após resfriamento a absorbância foi lida a 505 nm em um Espectrofotômetro digital UV-VIS, Genesys-10 UV.

Os açúcares redutores totais foram determinados pelo método colorimétrico Somogyi-Nelson (Nelson, 1944). Para a análise foi empregado 50 μ L da amostra e adicionados 0,5 mL do reagente AB (carbonato de sódio anidro, bicarbonato de sódio, tartarato de sódio e potássio, sulfato de cobre pentahidratado e ácido sulfúrico concentrado), incubados em banho com água fervente por 10 min. Após rápido resfriamento em banho de gelo foram adicionados 0,5 mL do reagente C (molibdato de amônio, ácido sulfúrico concentrado e arseniato de sódio) e, após 10 minutos, 5 mL de água destilada. A leitura de absorbância foi a 620 nm em um Espectrofotômetro digital UV-VIS, Genesys-10 UV. O consumo da frutose foi determinado pela diferença entre açúcares redutores totais e glicose. No final de cada cultivo foram avaliados os açúcares redutores por cromatografia de troca iônica em sistema Metrohm (bomba Professional IC 850 Anion-MCS-LP Gradient, amostrador com injetor automático 863 Compact Auto Sampler, detector amperiométrico 871 Advanced Bioscan; aparelho de interface 771 IC Compact). Duas colunas Metrosep Carb 1-150 (copolímero de poliestireno/ divinilbenzeno), tamanho de partícula 5 μ m; com dimensões de 150 x 4.0mm) foram conectadas em série utilizando NaOH 100 mM com fluxo de 1,0 mL/min como eluente, temperatura da coluna e do detector de 30°C. O volume de injeção de amostra foi de 20 μ L.

A verificação da axenia dos cultivos foi por microscopia ótica, em um Microscópio modelo BVM-100 (Marca Bel Photonics, Milano, Itália).

A umidade do melaço de cana foi determinada empregando um Karl Fischer volumétrico modelo 701 KF Titrino; 703 Stand, (Marca Metrohm), forno Thermaprep. A temperatura utilizada foi de 150 °C, com um fluxo de nitrogênio de 75 mL/min e tempo de extração de 800 segundos.

As cinzas do melaço de cana foram determinadas por incineração da amostra em numa mufla a temperatura de 550°C durante 4 horas.

O teor de lipídeos foi determinado pelo método de Bligh & Dyer (Bligh, 1959). Foram pesadas 500 mg de biomassa, adicionados 5 ml de HCl 2M e incubadas em banho-maria a 80°C por 1 hora. Após a incubação a amostra foi centrifugada a 4500 rpm por 15 min. e o líquido foi removido por seringa. A extração dos lipídeos foi feita com uma mistura de solventes orgânicos (metanol e clorofórmio) visando criar um sistema trifásico, no qual os lipídeos ficam dissolvidos em clorofórmio, podendo ser separado da biomassa. Foram adicionados 4 mL de metanol, 2mL de clorofórmio e 3,6 mL de água na biomassa digerida, posteriormente centrifugada a 4500 rpm por 10 min., cuja fase inferior (clorofórmio) foi retirada empregando uma seringa. Foi feita uma re-extração dos lipídeos na biomassa digerida adicionando 4 mL de uma solução 10% v/v de metanol em clorofórmio na amostra, e levada a centrífuga a 4500 rpm por 10 min. Finalmente foi evaporado o clorofórmio em um evaporador rotatório a 75°C sob pressão a vácuo de até 30 polegadas de Hg. Os lipídeos extraídos foram secos em estufa até peso constante a 60°C por 24 horas. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas.

4.6 Condições de cultivo

4.6.1 Cultivo com glicerol

Para o cultivo em glicerol o ágar inclinado e o inóculo empregados foram preparados utilizando glicose como fonte de carbono numa concentração de 10 g.L⁻¹.

Para a fermentação o meio sintético BBM foi suplementado com: i) glicerol na concentração de 2g.L⁻¹, ii) relações de glicose/glicerol 80:20(m/m), (8 g.L⁻¹ glicose; 2 g.L⁻¹ glicerol) e 60:40(m/m)(6 g.L⁻¹ glicose; 4 g.L⁻¹ glicerol) e iii) controle empregando glicose na concentração de 10g.L⁻¹, sempre mantendo uma relação carbono/nitrogênio constante em 20. A razão C/N foi ajustada pela adição de NaNO₃. O pH do meio de cultivo foi ajustado a 6,8 com HCl 1M e NaOH 1 M.

4.6.2 Cultivo com sacarose e sacarose hidrolisada

Meio sintético BBM, suplementado com: i) sacarose na concentração de 2g.L^{-1} , ii) sacarose hidrolisada nas concentrações de 2; 5; 8; 10 e 20g.L^{-1} , e iii) frutose na concentração de 2g.L^{-1} , sempre mantendo uma relação carbono/nitrogênio constante em 20. A razão C/N foi ajustada pela adição de NaNO_3 . O pH do meio de cultivo foi ajustado a 6,8 com HCl 1M e NaOH 1 M.

4.6.3 Cultivo com melaço hidrolisado

O meio sintético BBM foi suplementado com: i) melaço hidrolisado nas concentrações de 5; 10; 20; 25 e 30g.L^{-1} , sempre mantendo a relação carbono/nitrogênio constante em 20. A razão C/N foi ajustada pela adição de NaNO_3 . O pH do meio de cultivo foi ajustado a 6,8 com HCl 1M e NaOH 1 M.

4.6.4 Condições de cultivo

Os cultivos foram incubados utilizando 20 Erlenmeyer aletados e âmbar de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultivo como volume de trabalho, considerando $0,3\text{ g.L}^{-1}$ de inóculo inicial na fase exponencial de crescimento. Os Erlenmeyers foram mantidos em incubadora rotatória a 140 rpm e 26°C na ausência de luminosidade. Amostragem foi realizada considerando o descarte do frasco para cada tempo avaliado. Os cultivos foram realizados em duplicata e as medições dos dados cinéticos referem-se à média de três repetições.

4.7 Hidrólise da sacarose

A sacarose foi hidrolisada segundo o referenciado por Gao, Zhai *et al.* (2010), a uma solução de 500g.L^{-1} de sacarose (xarope) foram adicionados 0,0183 L de ácido

(HCl 3 M) correspondente a 0,0037% (m/v). Essa mistura foi incubada em banho a 80°C por 30 minutos, com posterior resfriamento em banho de gelo até temperatura ambiente. O pH foi neutralizado utilizando-se uma solução de NaOH 3M.

4.8 Hidrólise do melaço de cana e detoxificação

O melaço de cana foi hidrolisado pela adição de ácido clorídrico, a uma solução de 500g.L⁻¹ de melaço de cana foram adicionados 0,1372 L de ácido (HCl 3M) correspondente a 0,0273% (m/v). Essa mistura foi incubada em banho a 80°C por 30 minutos, com posterior resfriamento em banho de gelo até temperatura ambiente. O pH foi neutralizado utilizando-se uma solução de NaOH 3M.

O melaço de cana foi detoxificado com carvão granular ativado numa concentração de 5% (m/v), com posterior agitação constante a 200 rpm durante 2 horas. Após este tempo a solução foi filtrada a vácuo com papel de filtro whatman nº1, seguida de centrifugação a 10000 rpm, 5°C por 15 min. Adaptado de Valduga (2007).

A porcentagem da hidrólise da sacarose e do melaço de cana foi calculada por meio da equação abaixo, levando em consideração as concentrações de sacarose, glicose e frutose na solução final (Rodrigues, 2000).

$$\% \text{hidrólise} = \frac{\text{Açúcares redutores}}{(\text{açúcares redutores} + 1,05 \times \text{Açúcares não redutores})} \times 100$$

Sendo,

1,05= relação entre as massas moleculares dos açúcares redutores e não redutores. (360,28 g.mol⁻¹/342,24 g.mol⁻¹)

Açúcares redutores= glicose e frutose (g.L⁻¹)

Açúcares não redutores= sacarose (g.L⁻¹)

4.9 Criopreservação de microalgas

4.9.1 Micro-organismo

Chlorella vulgaris CPCC90, foi mantida e propagada em ágar inclinado contendo meio sintético BBM, cuja composição encontra-se descrita na Tabela 9. A este meio foi adicionado ágar numa concentração de 15 g.L⁻¹ e as condições de manutenção foram de 20°C e 1 klux de luminosidade.

4.9.2 Condições de cultivo e protocolo de criopreservação

O meio sintético BBM, foi suplementado com os crioprotetores: dimetilsulfóxido (DMSO), metanol ou glicerol, todos da marca Merck. As concentrações avaliadas foram de 5 e 10%. O pH do meio de cultivo foi ajustado a 6,8 com adição de HCl 1M e NaOH 1 M.

Chlorella vulgaris (CPCC90) foi cultivada em tubo de ensaio inclinado, nas condições anteriormente descritas, durante 4-5 dias aproximadamente. Após esse tempo foram adicionados a cada tubo inclinado 2 ml de meio de cultivo BBM e, com ajuda de uma alça de inoculação descartável, as células da superfície do ágar foram desprendidas e ressuspensas no líquido. As células ressuspensas foram transferidas para um Erlenmeyer para obtenção de uma concentração homogênea. A concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer. Posteriormente esta suspensão foi diluída com meio de cultivo BBM ate atingir uma concentração celular entre 0,5 – 1 x10⁶ cel/ml.

Foram preparadas soluções estoque de 20% e 40% (m/v) dos crioprotetores dimetilsulfóxido, metanol e glicerol, posteriormente esterilizadas por filtração por membrana empregando filtro de 0,22 µm.

Para cada criotubo de 2ml foram adicionados 1,5 ml da suspensão fresca de células da microalga e 0,5 ml de solução de 20% ou 40% de cada criopreservante. As soluções dos tubos foram homogeneizadas suavemente e armazenados no recipiente

de congelação Mr Frosty (Nalgene, Thermo Scientific, Mexico), pré-resfriado entre 2-8°C. Logo após o preparo dos tubos, o recipiente foi armazenado em freezer convencional por 1 hora e, em seguida, em ultra freezer a -77°C por 2 horas. Depois deste tempo os tubos foram retirados da caixa de congelamento Mr Frosty e colocados em caixas normais de armazenamento no ultrafreezer.

As caixas de congelamento Mr Frosty foram utilizadas, pois diminuem a temperatura gradativamente em uma vazão de 1°C por minuto, evitando estresse das células por rápido congelamento.

4.9.3 Estocagem e amostragem

O estudo da estocagem foi realizado em um ultra freezer So-Low modelo PV 85-13 (cincinnati, Ohio USA) a temperatura de -77 °C.

Foram estabelecidos tempos de armazenagem de 15, 30, 60, 90, 180 e 270 dias. Após os tempos estabelecidos, os criotubos foram retirados e descongelados em banho-maria a 37 °C por aproximadamente 4 minutos. Em seguida os criotubos foram centrifugados por 10 minutos a 1240 rpm e retirado o sobrenadante. Posteriormente foi adicionado 1ml de meio de cultivo BBM a cada criotubo para facilitar a retirada das células e as mesmas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 4 ml de meio de cultivo BBM. Os tubos de ensaio foram mantidos nas condições de 26°C e 1 klux de luminosidade com acompanhamento diário do crescimento das células por contagem celular em câmara de Neubauer. Também foram realizados n-repiques após cada cinética de crescimento, até que a velocidade específica de crescimento da microalga atingisse a velocidade inicial de crescimento, ou seja, a velocidade específica de crescimento da microalga antes da armazenagem em freezer. Esta velocidade foi denominada de cinética zero.

Todos os procedimentos foram executados assepticamente em câmara de fluxo laminar, e o material e meio de cultivo foram esterilizados a 121°C por 20 minutos. Os

cultivos foram realizados em triplicata e as medições dos dados cinéticos referem-se à média de três repetições, para os cálculos da média e variância foram utilizadas as equações:

$$\text{Desvio padrão} = \sqrt{S}; \quad S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}; \quad \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Sendo:

n=numero de amostras; x_i =amostra; $\bar{x}$ =média; s=variância.

4.10 Cálculo dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos calculados para todos os cultivos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros cinéticos avaliados.

Parâmetro	Equação
Velocidade máxima específica de crescimento	Inclinação da reta $\ln(X)$ x t
Tempo de geração	$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}}$
Máxima produtividade celular	$P_X = \frac{X_{\max} - X_0}{t_{X_{\max}} - t_0}$
Fator de conversão de substrato em células	$Y_{X/S} = \frac{X_{\max} - X_0}{S_0 - S_{X_{\max}}}$
Taxa de consumo de substrato	$r_S = \frac{S_0 - S_{X_{\max}}}{t_{X_{\max}} - t_0}$
Constante de inibição K_i	$x_i = \frac{1}{k_m \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)}$

Fonte: adaptado de (Doran Pauline, 1995).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo em glicerol

O uso do glicerol como fonte de carbono orgânico para o cultivo de *C vulgaris* foi avaliado em um ensaio contendo 2 g.L⁻¹ de glicerol PA. Paralelamente, foi realizado um ensaio controle contendo 10 g.L⁻¹ de glicose.

A Tabela 11 apresenta um resumo dos principais parâmetros cinéticos obtidos no cultivo controle, contendo 10 g.L⁻¹ de glicose. A Figura 1 apresenta os perfis de crescimento celular e de consumo de substrato da *C vulgaris* nas condições testadas. A concentração celular de 4,7 g.L⁻¹ foi obtida para o meio contendo 10 g.L⁻¹ glicose, enquanto não houve crescimento celular para o ensaio contendo glicerol. O consumo de glicose durante a fermentação foi evidenciado em 96 horas de cultivo enquanto não foi observado consumo de glicerol.

A Figura 2 apresenta a variação do pH durante a fermentação (controle e glicerol), foi observado que no cultivo contendo glicerol o pH permaneceu praticamente constante por 120 horas de fermentação, enquanto no cultivo contendo glicose houve aumento do pH durante o cultivo de 6,6 a 8,9.

Tabela 11: Parâmetros cinéticos no cultivo com 10g/L de glicose (cultivo controle).

Parâmetro	Resultado		
Glicose inicial (g.L^{-1})	10,74	$\pm$	0,15
μ_{max} (h^{-1})	0,029	$\pm$	0,001
X_{max} (g.L^{-1})	4,77	$\pm$	0,01
pH	8,89	$\pm$	0,02
t_g (h)	23,90	$\pm$	0,45
r_s ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0,05	$\pm$	0,00
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,42	$\pm$	0,00
t_x (h)	96,00	$\pm$	0,00
$t_{x\text{max}}$ (h)	96,00	$\pm$	0,00
X (%)	100,00	$\pm$	0,00

Densidade celular máxima (X_{max} [g.L^{-1}]); velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max} [h^{-1}]) foi calculada pelo gráfico $\ln(X)$ x t ; tempo de geração: $t_g = \ln(2)/\mu_{\text{max}}$ [h]; tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima ($t_{x\text{max}}$ [h]); tempo total de residência celular (t_x [h]); produtividade celular: $P_x = \Delta X / \Delta t$ [$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$]; conversão global de substrato (X, [%]); fator de conversão de substrato em células: $Y_{x/s} = \Delta X / -\Delta S$ [$\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{substrato}}$]; taxa de consumo de substrato ($r_s = -\Delta S / \Delta t$ [$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$]).

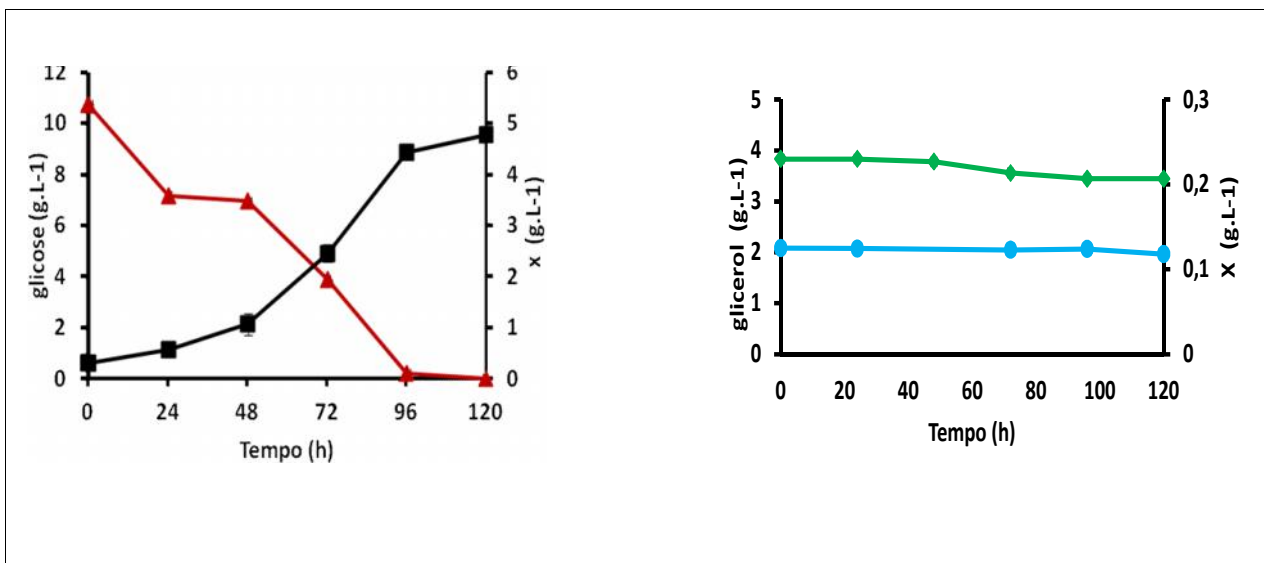


Figura 1: Perfis de concentração de glicose ('▲'), glicerol ('●') celular no cultivo com glicose ('■') e celular no cultivo com glicerol ('◆') para a *Chlorella vulgaris* nos experimentos estudados.

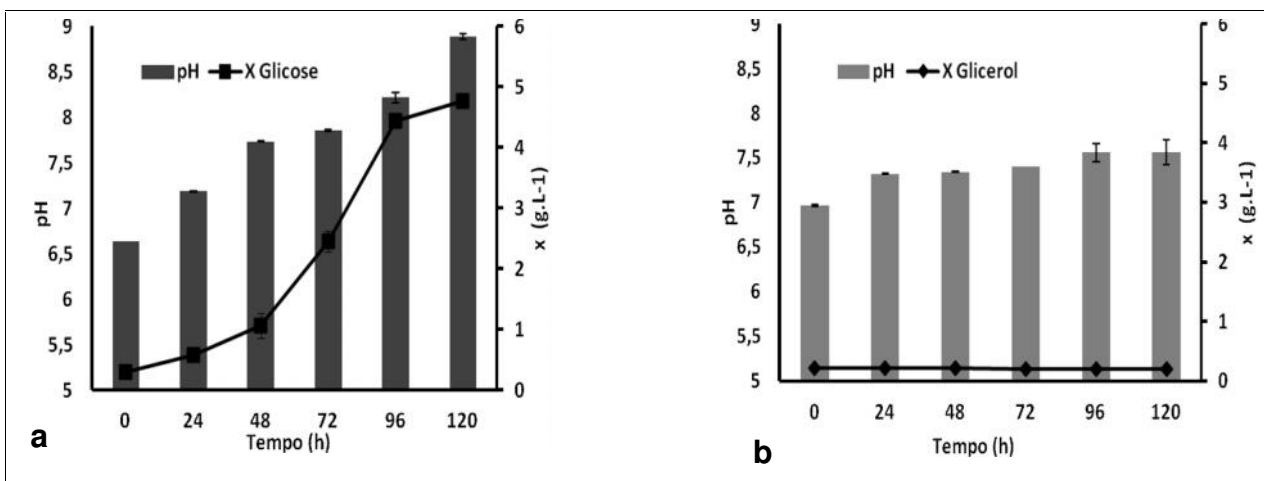


Figura 2: Perfis de pH e crescimento celular nos cultivos com glicose (a) e glicerol (b).

As Figuras 3 e 4 apresentam as fotografias das lâminas de microscopia para os cultivos (controle) e glicerol. Observa-se na Figura 4 uma alteração na morfologia das células da microalga por causa do glicerol no meio, este induz uma desidratação parcial da célula diminuindo assim seu tamanho após 96 horas de cultivo.

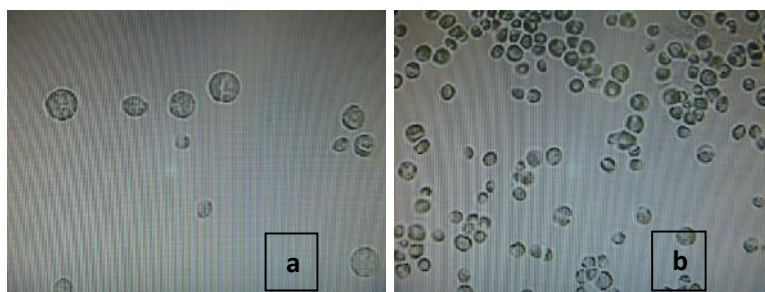


Figura 3: Fotografia do cultivo com glicose 10 g.L⁻¹. a: 0h; b: 96h.

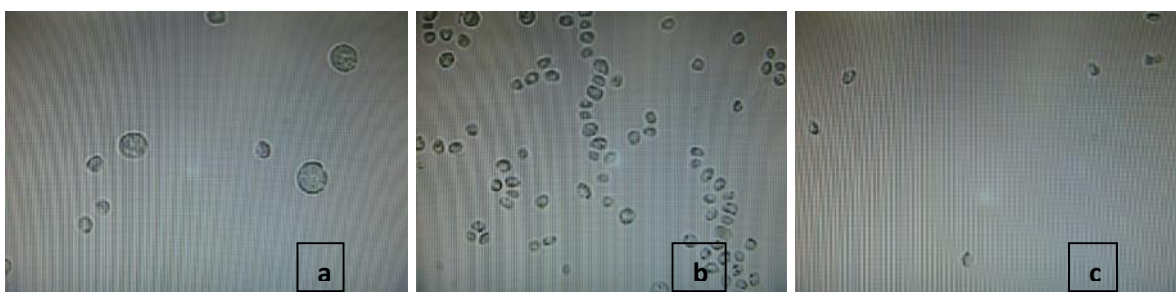


Figura 4: Fotografias do cultivo com glicerol 2g.L⁻¹. a: 0h; b: 48h; c:120h.

Resultados similares foram reportados para a *Chlorella vulgaris* ESP-31 por Yeh, Chen *et al.* (2012b), onde a microalga não apresentou crescimento empregando glicerol como fonte de carbono.

5.2 Cultivo em glicose/Glicerol

Conforme resultados de cultivo em meios de cultura contendo glicerol como fonte de carbono orgânico não foi evidenciado seu consumo por *C. vulgaris*. Portanto, decidiu-se estudar uma nova metodologia, de acordo com a estratégia de Heredia-Arroyo, Wei *et al.* (2010): Foram utilizadas diferentes proporções de glicose/glicerol em meio de cultivo BBM visando acompanhar o consumo destes substratos pela *C. vulgaris*. Paralelamente, foi realizado um ensaio controle contendo 10 g.L⁻¹ de glicose em BBM. A Figura 5 apresenta os perfis de crescimento celular e consumo dos substratos por *C. vulgaris*, a Figura 6 apresenta os perfis de pH nos cultivos, para os

testes utilizando 100% de glicose, relações de glicose/glicerol de 80/20 e 60/20. A máxima concentração celular nas blendas de glicose/glicerol foi obtida para a relação 80/20 atingindo $3,87 \text{ g.L}^{-1}$ após 74 horas de cultivo enquanto a relação 60/40 alcançou $2,87 \text{ g.L}^{-1}$ após 74 horas de cultivo, no caso do controle foi obtida uma concentração celular de $4,61 \text{ g.L}^{-1}$ em 90 horas de cultivo. A Figura 7 apresenta uma comparação dos principais parâmetros cinéticos obtidos nos diferentes cultivos. A Tabela 12 apresenta um resumo dos principais parâmetros cinéticos obtidos nos cultivos avaliados.

Nos experimentos empregando relações de glicose/glicerol, não foi evidenciado o consumo do glicerol pela *C. vulgaris*. A máxima concentração celular foi obtida após esgotamento da glicose nos cultivos.

Tabela 12: Parâmetros cinéticos obtidos nos cultivos avaliados

Parâmetro	Controle Glicose (g.L ⁻¹)			Glicose/Glicerol (m/m)					
	10			80/20			60/40		
Glicose inicial (g.L ⁻¹)	10,26	±	0,00	8,26	±	0,00	6,36	±	0,00
Glicerol inicial(g.L ⁻¹)	-	±	-	1,81	±	0,00	4,03	±	0,00
X _{máx} (g.L ⁻¹)	4,61	±	0,06	3,87	±	0,05	2,87	±	0,07
pH _{máx}	8,66	±	0,01	9,13	±	0,01	9,18	±	0,02
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,030	±	0,001	0,032	±	0,003	0,032	±	0,005
tg(h)	23,10	±	2,05	21,66	±	0,78	21,66	±	0,05
t _{x_max} (h)	90,00	±	0,00	74,00	±	0,00	74,00	±	0,00
t _x (d)	90,00	±	0,00	74 ,00	±	0,00	74,00	±	0,00
P _x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,05	±	0,00	0,05	±	0,00	0,03	±	0,00
r (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,11	±	0,00	0,11	±	0,00	0,09	±	0,00
X(%)	100,00	±	0,0	80,00	±	0,00	60,00	±	0,00
Y _{X/S} (g/g)	0,45	±	0,01	0,38	±	0,03	0,28	±	0,01

Densidade celular máxima (X_{máx} [g.L⁻¹]); velocidade máxima específica de crescimento (μ_{máx} [h⁻¹]) foi calculada pelo gráfico ln(X) x t; tempo de geração: tg=ln(2)/μ_{máx} [h]; tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima (t_{x_máx} [h]); tempo total de residência celular (t_x, [h]); produtividade celular: P_x=ΔX/Δt [g.L⁻¹.h⁻¹]; conversão global de substrato (X, [%]); fator de conversão de substrato em células: Y_{X/S}=ΔX/-ΔS [g_{biomassa}/g_{substrato}]; taxa de consumo de substrato (r_s=ΔS/Δt [g.L⁻¹.h⁻¹]).

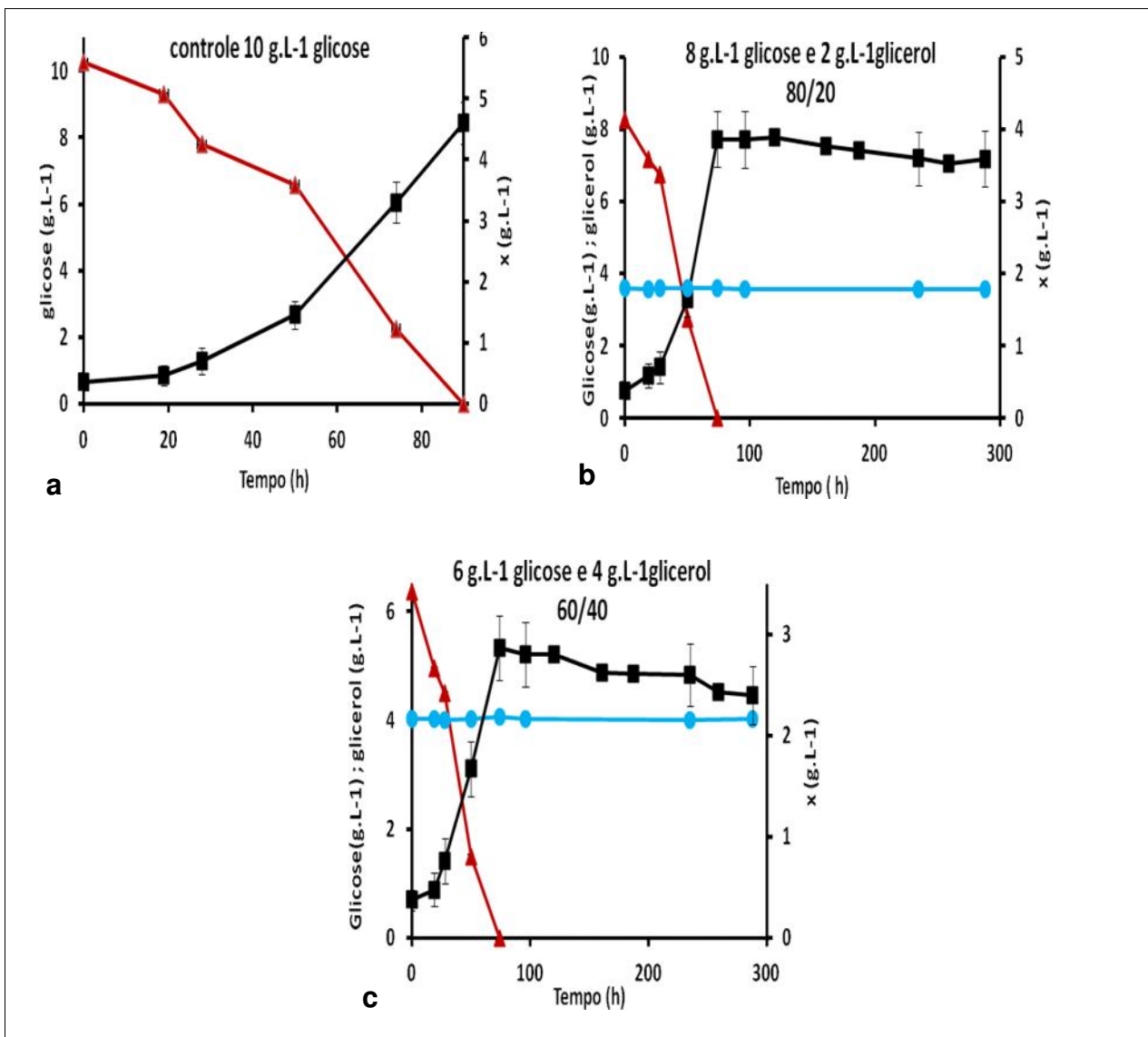


Figura 5: Perfis de concentração de glicose (‘▲’), glicerol (‘●’), e celular nos cultivos (‘■’) para a *Chlorella vulgaris* nos experimentos estudados. Controle (a), 8 g.L⁻¹ de glicose e 2 g.L⁻¹ de glicerol (b), 6 g.L⁻¹ de glicose e 4 g.L⁻¹ de glicerol (c).

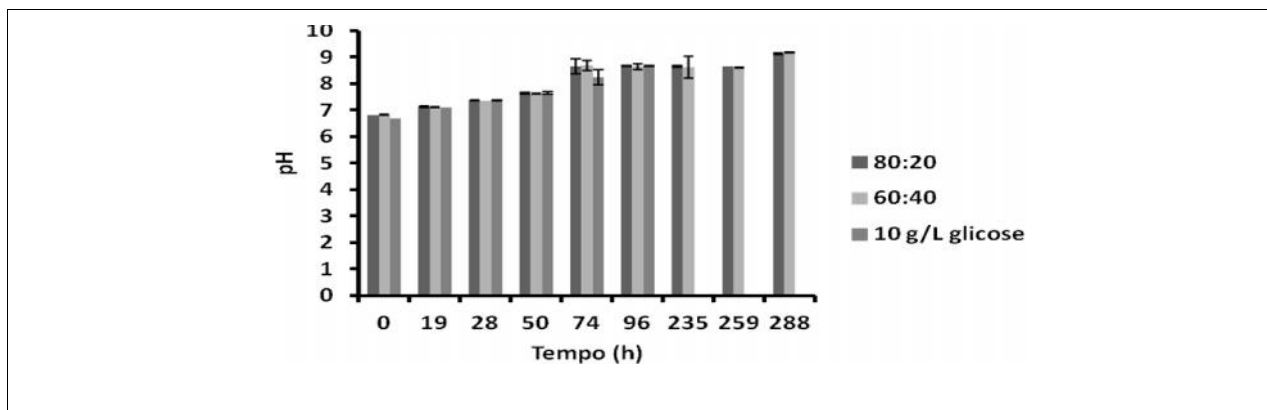


Figura 6: Perfis de pH nos cultivos controle e nas proporções de glicose e glicerol avaliadas.

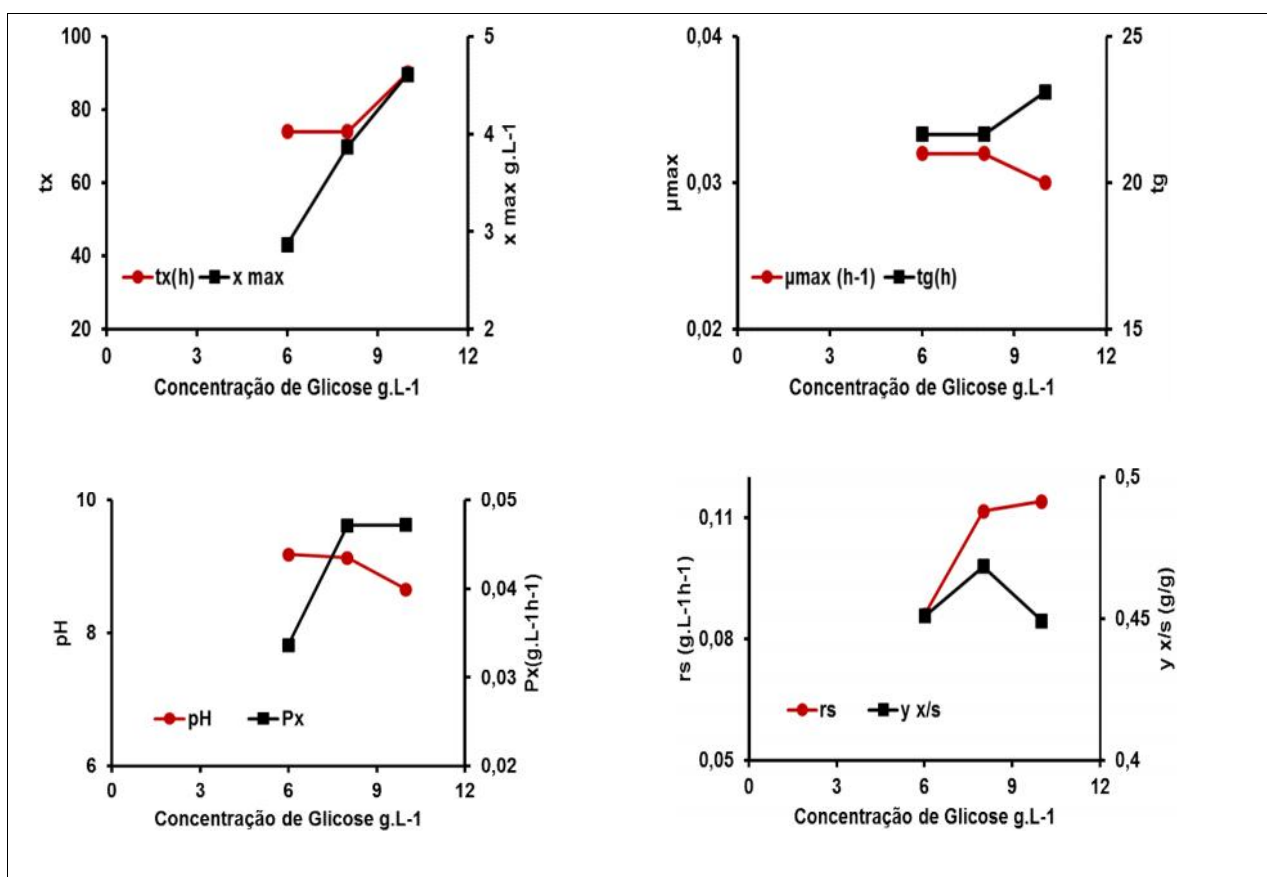


Figura 7: Comparação dos valores máximos dos principais parâmetros cinéticos obtidos nos experimentos com diferentes proporções de glicose e glicerol, controle (10 g.L⁻¹ de glicose), 80:20 (8 g.L⁻¹ de glicose), 60:40 (6 g.L⁻¹ de glicose). $t_{x_{máx}}$ =tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima (h); $X_{máx}$ =densidade celular máxima (g.L⁻¹); $\mu_{máx}$ =velocidade máxima específica de crescimento (h⁻¹); tg= tempo de geração; r_s = taxa de consumo de substrato (g.L⁻¹.h⁻¹); $Y_{x/s}$ = fator de conversão de substrato em células (g/g).

5.3 Cultivo em sacarose

Foi avaliado o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em sacarose. Os resultados dos testes contendo inicialmente 2g.L^{-1} de sacarose estão apresentados na Figura 8.

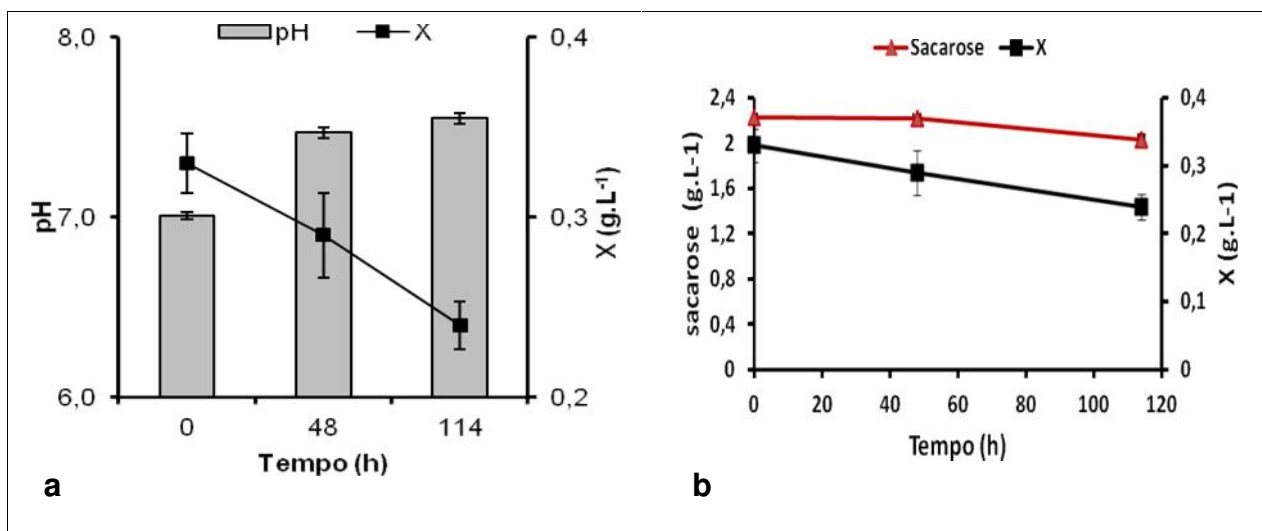


Figura 8: Perfis de pH, concentração celular e de sacarose do experimento com concentração inicial de 2g.L^{-1} de sacarose. Perfil de crescimento celular e de pH com sacarose (a), perfil de consumo de substrato e crescimento celular com sacarose (b).

A partir desses resultados verificamos que a microalga *Chlorella vulgaris* não metabolizou a sacarose, causando morte celular. Resultados similares foram apresentados por (Kessler, 1982) onde a *Chlorella protothecoides* foi incapaz de utilizar sacarose como fonte de carbono. Também para a *Chlorella vulgaris* ESP-31 foi evidenciado que não houve crescimento empregando esta fonte de carbono (Yeh, Chen *et al.*, 2012b)

Resultados negativos foram encontrados em estudos de crescimento e produção de metabólitos a partir de microalgas cultivadas em sacarose. Ainda segundo esses autores, especula-se que as microalgas não possuam a enzima invertase para assimilação dessa fonte de carbono (Perez-Garcia, Escalante *et al.*, 2011a).

Estudos evidenciaram um significativo crescimento da alga vermelha *Galdieria sulphuraria* cultivada em sacarose, mas apenas em pH 2. Isso pode ser um indicativo

de que a sacarose foi hidrolisada em glicose e frutose e estes, assimilados pela microalga (Schmidt, Wiebe *et al.*, 2005). Portanto, a próxima etapa do nosso trabalho foi avaliar o cultivo da *Chlorella vulgaris* em sacarose hidrolisada.

5.4 Hidrólise da sacarose

Segundo Xiong, Gao *et al.* (2010), a hidrólise da sacarose numa solução de $10\text{g}_{\text{sacarose}}.\text{L}^{-1}$ deve ser tratada com ácido clorídrico suficiente para um pH final 2,0 e aquecida a 121°C por 30 minutos com posterior resfriamento em banho de gelo até temperatura ambiente. A última etapa desse processo é a neutralização da solução utilizando hidróxido de sódio.

Inicialmente foram realizados testes comparando-se a utilização de banhos termostáticos e de autoclave para promover o aquecimento durante o processo de hidrólise, pois o uso de altas temperaturas no processo ocasiona um conjunto de reações complexas conhecidas como caramelização, provocando desidratação e geração de compostos que podem ser inibidores de crescimento celular (Oetterer, 2006). A Tabela 13 apresenta os resultados dos testes da hidrólise da sacarose utilizando autoclave e banho termostático. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança e indicaram que o uso do banho termostático comparado-se com a autoclave, para a obtenção da hidrólise, apresenta diferença significativa na porcentagem da hidrólise obtida. Desta forma foi escolhido o banho termostático por apresentar a maior porcentagem de hidrólise da sacarose, além de utilizar temperaturas mais baixas, reduzindo a possibilidade de formação de compostos inibidores durante o processo.

Tabela 13: Resultados da hidrólise da sacarose (10 g.L⁻¹) em autoclave (T:121°C) e banho termostático (T: 80 °C).

HCl (%) (m/v)	% hidrólise					
	Autoclave			Banho		
0,0037	65,13 ^a	±	0,21	67,00 ^b	±	0,30
0,0075	53,50 ^a	±	0,40	55,40 ^b	±	0,36
0,0111	50,87 ^a	±	0,25	54,27 ^b	±	0,25
0,0148	46,47 ^a	±	0,15	44,20 ^b	±	0,20

Letras diferentes na mesma linha, são estatisticamente diferentes (p< 0,05) pelo Teste de Tukey.

Visando melhorar a porcentagem de inversão obtida no banho termostático, diferentes concentrações (g.L⁻¹) de ácido clorídrico 3 M foram utilizadas na hidrólise de uma solução de 500g_{sacarose}.L⁻¹. A Tabela 14 mostra as porcentagens da hidrólise obtidas nos diferentes experimentos, os resultados mostram um aumento significativo na porcentagem da hidrólise da sacarose.

Tabela 14: Resultados da hidrólise da sacarose em banho termostático com diferentes concentrações de ácido clorídrico.

% hidrólise	Concentração de HCl % (m/v)	Desvio padrão da % de hidrólise
93,37	0,0037	± 0,12
93,37	0,0075	± 0,25
93,67	0,0111	± 0,25

Com base nos resultados apresentados acima, as condições estabelecidas para a realização da hidrólise da sacarose foram: solução de 500g_{sacarose}.L⁻¹, 0,0037% (m/v) de ácido clorídrico e aquecimento à 80°C por 30 min.

5.5 Cultivo em sacarose hidrolisada

A hidrólise da sacarose em meio ácido produz um mistura equimolecular de D-Glicose (aldose) e D-frutose (cetose). Devido à proporção (1:1), associada à solubilidade em água, estes dois carboidratos são de difícil separação por métodos convencionais. Dessa forma, a mistura de D-glicose e D-frutose foi utilizada no cultivo

da *Chlorella vulgaris* considerando as concentrações iniciais de 2, 5, 8, 10 e 20 g.L⁻¹ de sacarose. O rendimento médio da hidrólise da sacarose foi de $87.3 \pm 4.6\%$.

Em todos os testes o pH inicial foi superior a 6 e a razão C/N inicial foi mantida em 20 pela adição de nitrato de sódio. A Figura 9 apresenta os perfis de crescimento e de pH dos cultivos realizados com diferentes concentrações iniciais de sacarose hidrolisada. Já a Figura 10 mostra os perfis de consumo de glicose, consumo de frutose e crescimento celular. Na Tabela 15 é possível observar os valores dos parâmetros cinéticos de cada experimento realizado e a comparação desses parâmetros também pode ser visualizada na Figura 11.

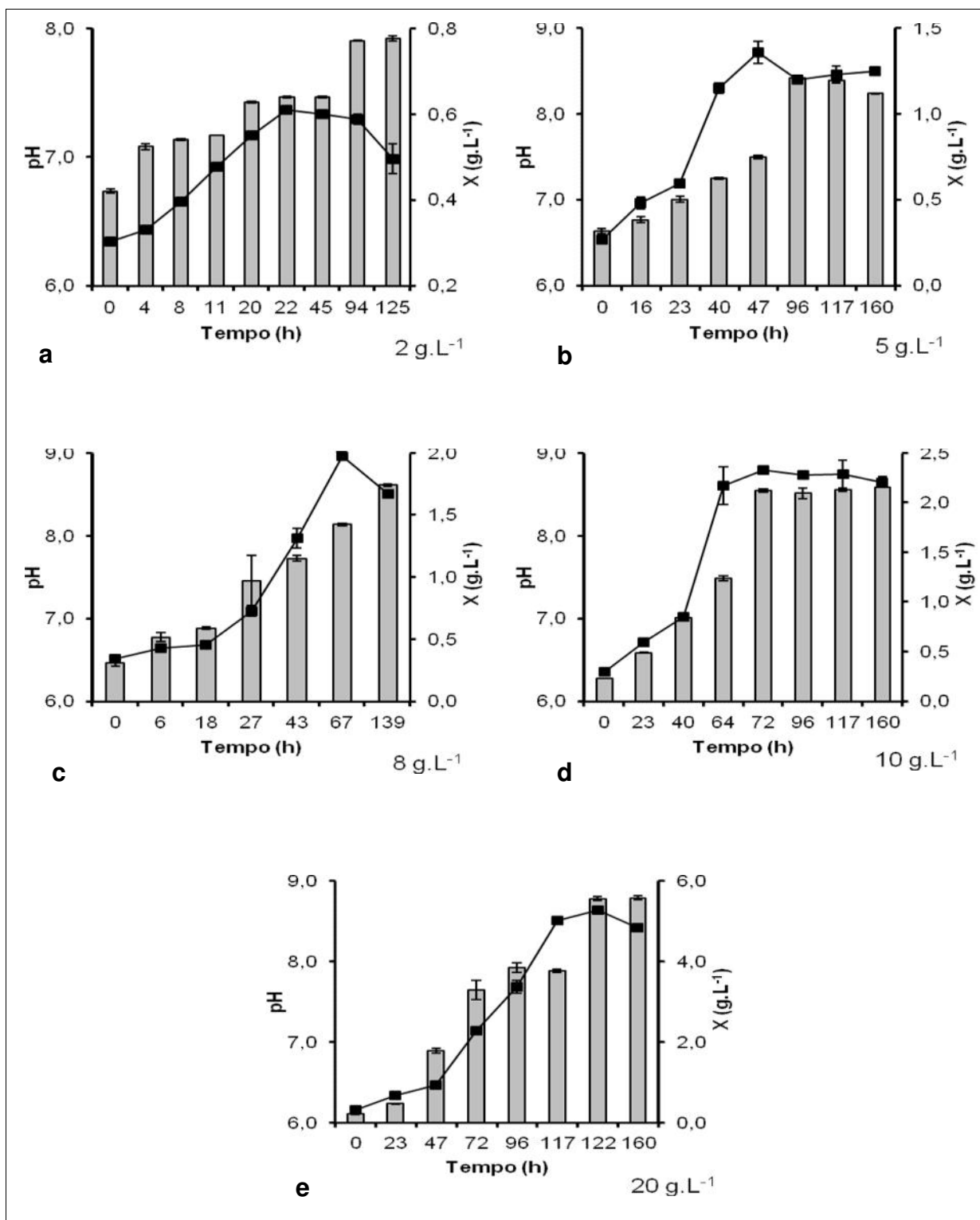


Figura 9: Perfis de pH (‘█’) e concentração celular (‘■’) para os experimentos com diferentes concentrações de sacarose hidrolisada. 2 g.L⁻¹ (a), 5 g.L⁻¹ (b), 8 g.L⁻¹ (c), 10 g.L⁻¹ (d) e 20 g.L⁻¹ (e),

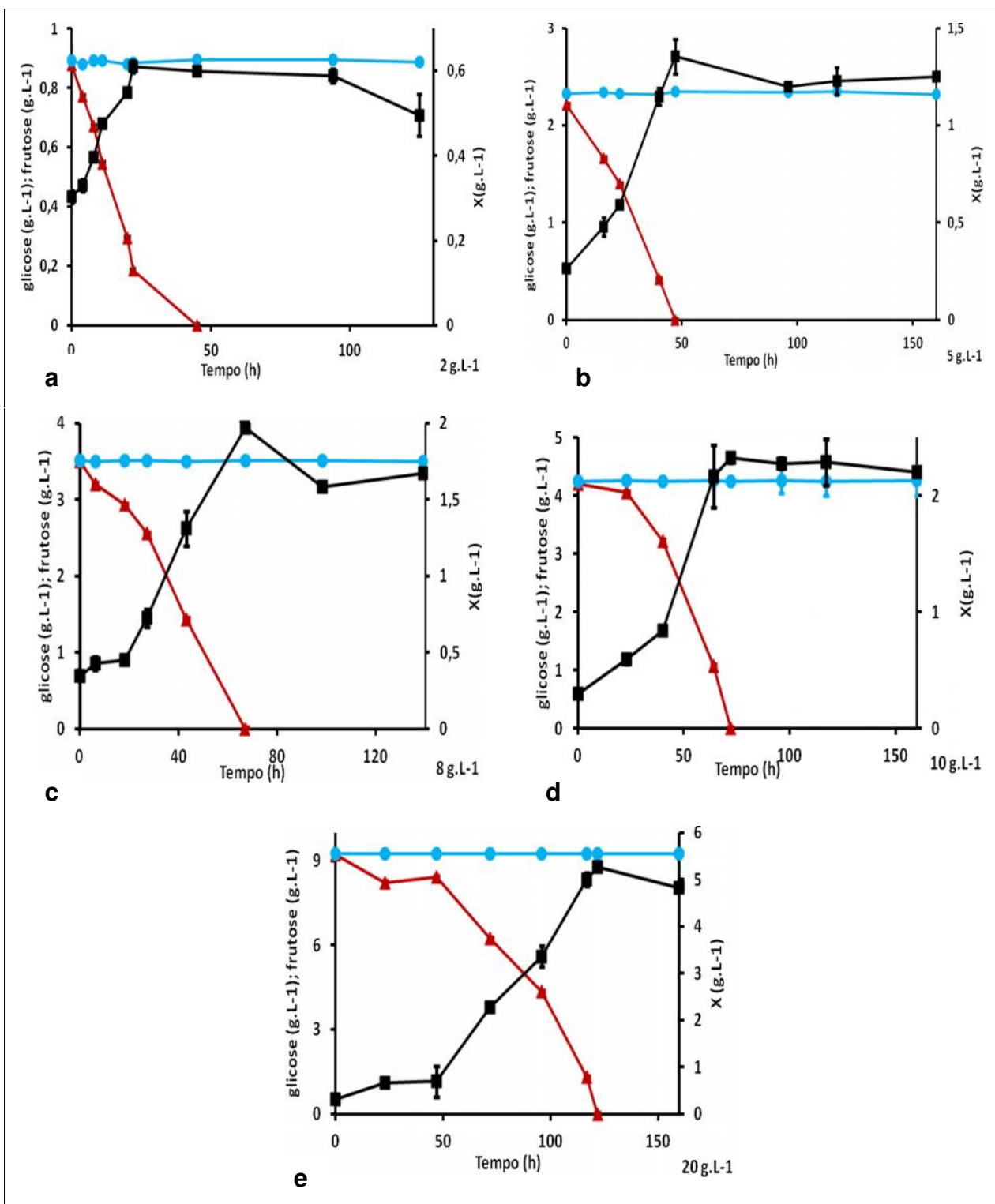


Figura 10: Perfis de concentração de glicose (‘▲’), frutose (‘●’) e celular (‘■’) para os experimentos com diferentes concentrações de sacarose hidrolisada. 2 g.L⁻¹ (a), 5 g.L⁻¹ (b), 8 g.L⁻¹ (c), 10 g.L⁻¹ (d) e 20 g.L⁻¹ (e).

Tabela 15: Parâmetros cinéticos obtidos a partir dos experimentos com sacarose hidrolisada.

Parâmetro	Sacarose hidrolisada (g.L ⁻¹)														
	2			5			8			10			20		
Glicose inicial (g.L ⁻¹)	0,88	±	0,03	2,21	±	0,10	3,50	±	0,01	4,21	±	0,32	9,23	±	0,39
X _{máx} (g.L ⁻¹)	0,61	±	0,01	1,36	±	0,06	1,97	±	0,00	2,33	±	0,03	5,28	±	0,04
pH _{máx}	7,92	±	0,02	8,42	±	0,01	8,62	±	0,02	8,59	±	0,00	8,79	±	0,03
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,031	±	0,008	0,035	±	0,001	0,027	±	0,001	0,030	±	0,001	0,026	±	0,001
tg(h)	22,35	±	2,16	19,92	±	0,48	25,20	±	0,72	23,03	±	0,24	26,87	±	0,96
t _{x_max} (h)	22,08	±	0,00	47,04	±	0,00	66,96	±	0,00	72,00	±	0,00	121,92	±	0,00
t _x (h)	22,08	±	0,00	47,04	±	0,00	66,96	±	0,00	72,00	±	0,00	121,92	±	0,00
P _x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,01	±	0,00	0,02	±	0,00	0,02	±	0,00	0,03	±	0,00	0,04	±	0,00
r (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,04	±	0,00	0,05	±	0,00	0,05	±	0,00	0,06	±	0,00	0,07	±	0,00
X (%)	43,85	±	0,00	44,22	±	0,00	43,71	±	0,00	42,10	±	0,00	41,17	±	0,00
Y _{X/S} (g/g)	0,69	±	0,01	0,61	±	0,03	0,56	±	0,00	0,55	±	0,01	0,57	±	0,01

Densidade celular máxima (X_{máx}, [g.L⁻¹]); velocidade máxima específica de crescimento (μ_{máx} [h⁻¹]) foi calculada pelo gráfico ln(X) x t; tempo de geração: tg=ln(2)/μ_{máx} [d]; tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima (t_{x_max}, [h]); tempo total de residência celular (t_x, [h]); produtividade celular: P_x= X/ t [g.L⁻¹.h⁻¹]; conversão global de substrato (X, [%]); fator de conversão de substrato em células: Y_{X/S}= X/S [gbiomassa/gsubstrato]; taxa de consumo de substrato (r_s= - S/ t [g.L⁻¹.h⁻¹]).

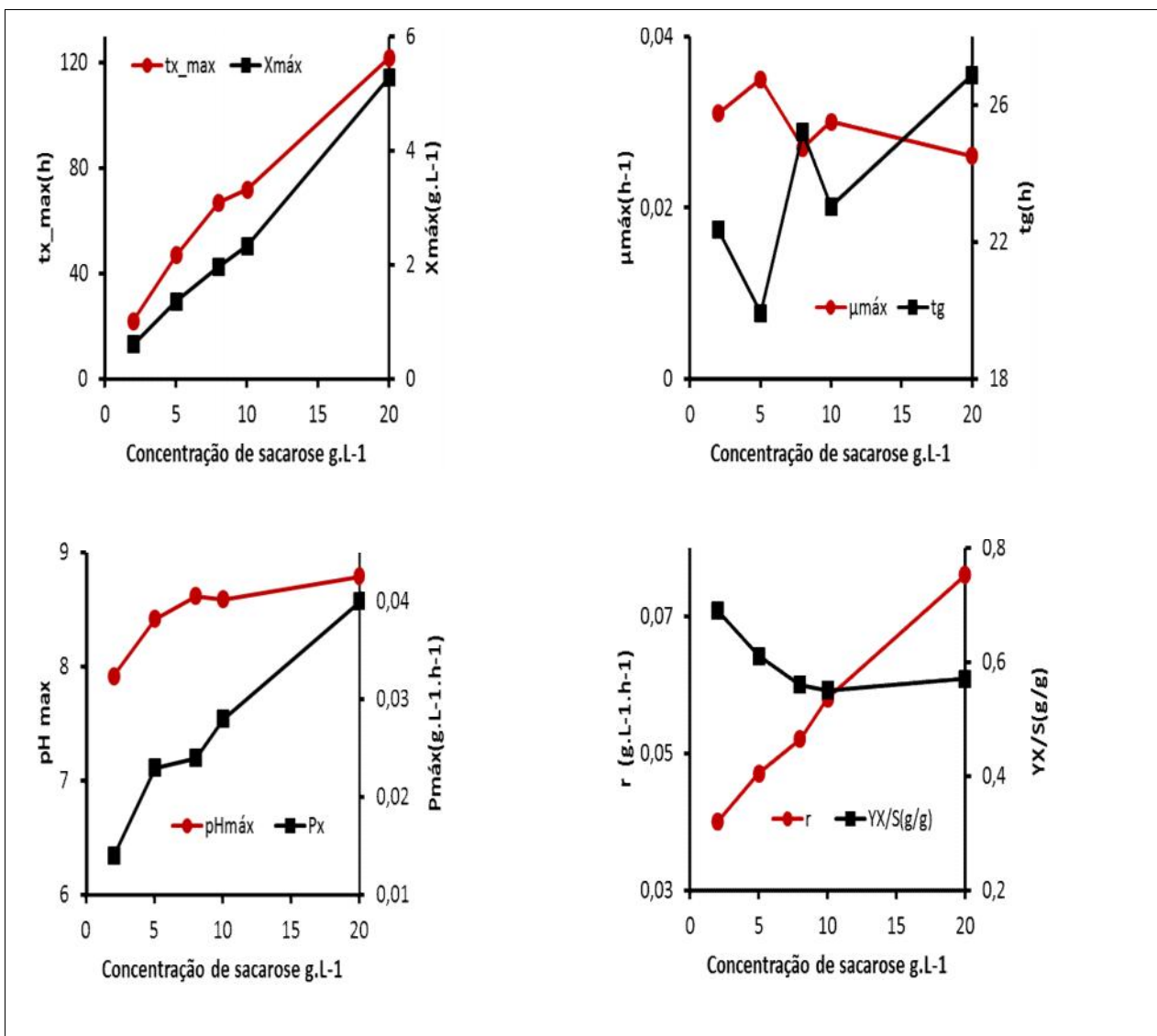


Figura 11: Comparação dos valores máximos dos principais parâmetros cinéticos obtidos nos experimentos com diferentes proporções de glicose e glicerol. $t_{x_máx}$ =tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima (h); $X_{máx}$ =densidade celular máxima (g.L⁻¹); $\mu_{máx}$ =velocidade máxima específica de crescimento (h⁻¹); tg = tempo de geração; r_s = taxa de consumo de substrato (g.L⁻¹.h⁻¹); $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato em células (g/g).

Os resultados evidenciaram o aumento do pH durante o cultivo, associado ao crescimento celular. Analogamente foi possível associar o consumo da glicose com o aumento celular. Os máximos valores de concentração celular, pH e produtividade foram, respectivamente, 5,3g.L⁻¹; 8,79 e 0,041g.L⁻¹.h⁻¹, obtidos em 121,92 horas de cultivo contendo inicialmente 20g.L⁻¹ de sacarose hidrolisada. A máxima velocidade

específica de crescimento e o mínimo tempo de geração foram $0,035 \text{ h}^{-1}$ e $19,92 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, alcançados no experimento com 5 g.L^{-1} de sacarose hidrolisada.

Em todos os testes a glicose foi totalmente consumida. O fator de conversão de glicose em células foi em torno de 0,60 para todos os casos.

Durante todo o período dos experimentos não foi evidenciado o consumo da frutose pela *Chlorella vulgaris* e, após o consumo total da glicose, o micro-organismo atingiu a fase estacionária seguida de morte celular.

Estudos utilizando frutose como fonte de carbono em cultivos heterotróficos da *Chlorella* evidenciaram baixo crescimento celular e baixas velocidades específicas de crescimento quando comparados aos resultados obtidos com outras fontes de carbono (Sun, Wang *et al.*, 2008; Liu, Huang *et al.*, 2010). Nesse sentido, um experimento foi realizado contendo inicialmente 2 g.L^{-1} de frutose para verificar a possibilidade de crescimento celular da microalga *Chlorella vulgaris* nessa fonte de carbono. Não foi observado consumo da frutose, assim como nos experimentos realizados com sacarose hidrolisada, e também foi observada morte celular do micro-organismo. Os resultados desse experimento estão expostos na Figura 12

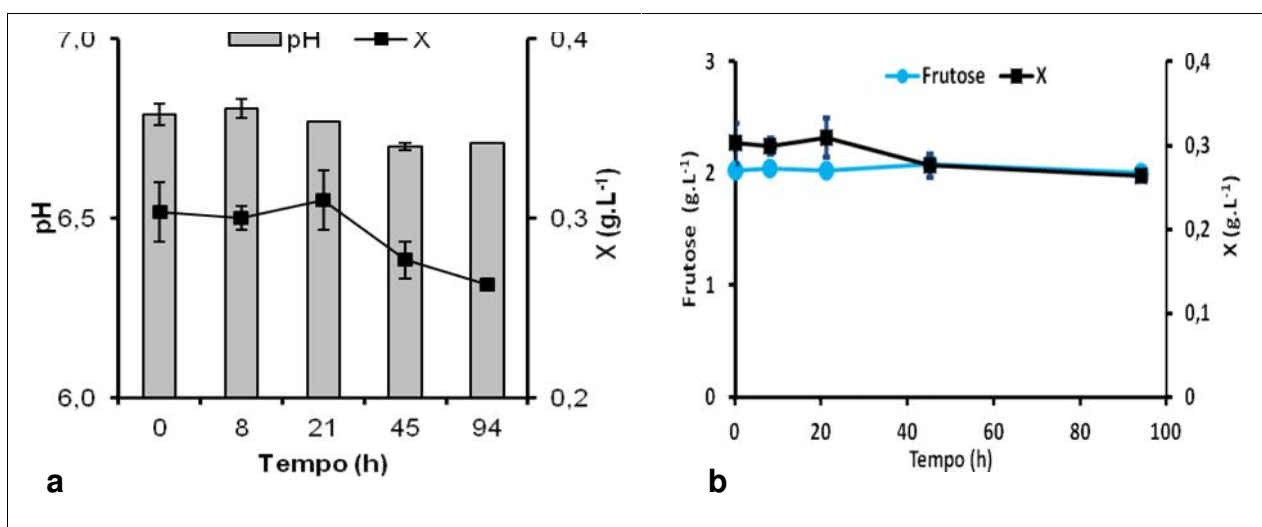


Figura 12: Perfis de pH, concentração celular e concentração de frutose. Perfil de crescimento celular e de pH com frutose (a), perfil de consumo de substrato e crescimento celular com frutose (b).

5.5.1 Comparação dos cultivos com glicose e com sacarose hidrolisada.

A Figura 13 e a Tabela 16 apresentam a comparação dos resultados obtidos utilizando glicose (Vidotti, A.D.D, 2012) e sacarose hidrolisada como fonte de carbono para o cultivo da *Chlorella vulgaris*. Os experimentos utilizados na comparação foram: i) Glicose com concentração inicial de 2,0; 5,0 e 10,0g.L⁻¹; ii) Sacarose hidrolisada que continham uma mistura de glicose e frutose com aproximadamente 2,0; 5,0 e 10,0g.L⁻¹ de glicose.

Tabela 16: Comparação dos cultivos com glicose e com sacarose hidrolisada

Fonte de Carbono	Sacarose H (g.L ⁻¹)	G _{inicial} (g.L ⁻¹)	t _{consumo} (h)	X _{max} (g.L ⁻¹)	X _{max} /X ₀	Y _{X/S} (g.g)	μ _{max} (h ⁻¹)
Sacarose Hidrolisada	5	2,21	47,04	1,36	5,09	0,61	0,035
	10	4,21	72,0	2,33	7,77	0,55	0,030
	20	9,23	121,92	5,28	16,66	0,57	0,026
Glicose (Vidotti, 2012)	-	2,14	54,0	1,29	4,66	0,47	0,028
	-	4,60	72,0	3,11	11,85	0,62	0,039
	-	9,67	84	5,04	16,84	0,49	0,039

Concentração inicial de glicose (G_{inicial}, [g.L⁻¹]); tempo de residência celular para consumo do substrato (t_{consumo}, [h]); densidade celular máxima (X_{max}, [g.L⁻¹]); razão da densidade celular máxima e inicial (X_{max}/X₀, -); fator de conversão de substrato em células: Y_{X/S}= X/- S [g_{biomassa}/g_{substrato}]; velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max} [h⁻¹]) foi calculada pelo gráfico ln(X) x t.

A partir dessa comparação notamos que, apesar das máximas concentrações celulares serem próximas, os valores das máximas taxas específicas de crescimento e tempo para consumir a glicose foram diferentes, indicando que a presença da frutose ou de compostos inibidores, formados durante o processo de hidrólise, possa influenciar negativamente no cultivo da microalga em sacarose hidrolisada. Por isso, foi realizado um ensaio de inibição para a frutose (item 5.6), a fim de esclarecer o comportamento quanto ao crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em meio contendo frutose.

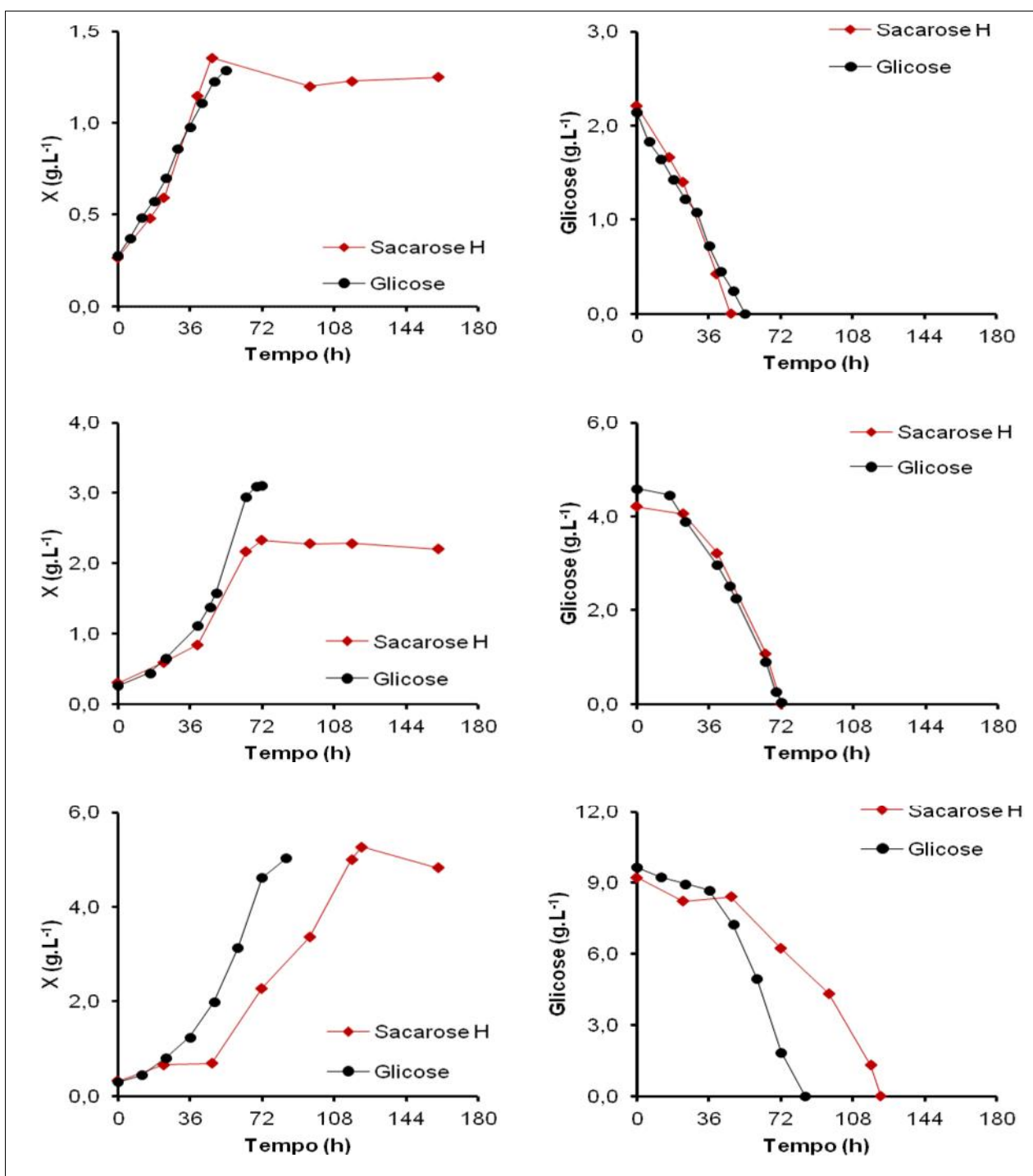


Figura 13: Perfis de concentração celular e consumo de glicose dos experimentos com glicose ('●') e sacarose hidrolisada ('◆').

Com base nos experimentos realizados foi possível avaliar o crescimento celular da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em sacarose, sacarose hidrolisada e

frutose. Os resultados com os cultivos contendo sacarose e frutose não evidenciaram crescimento celular promovendo a morte do micro-organismo em aproximadamente 100 horas de cultivo. A utilização da sacarose hidrolisada promoveu máximos valores de concentração celular, pH e produtividade ($5,28 \text{ g.L}^{-1}$; $8,79$ e $0,041 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente) obtidos em 122 horas de cultivo contendo inicialmente 20g.L^{-1} de sacarose hidrolisada. A máxima velocidade específica de crescimento e o mínimo tempo de geração foram $0,035 \text{ h}^{-1}$ e $19,92 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, alcançados no experimento com 5 g.L^{-1} de sacarose hidrolisada.

5.6 Inibição pela frutose

A fim de determinarmos a possível inibição da frutose no crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* foram avaliadas cinco concentrações de frutose $1, 2, 5, 8$ e 10 g.L^{-1} acrescentadas ao meio BBM contendo uma concentração de 10 g.L^{-1} de glicose no meio de cultivo. Paralelamente foi realizado um teste controle com glicose na concentração de 10 g.L^{-1} .

A Tabela 17 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos nas fermentações realizadas. Pode-se observar que a partir da concentração de frutose de 5 g.L^{-1} foi evidenciada uma diminuição na velocidade específica de crescimento da microalga e um aumento significativo no tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima. No entanto, para as concentrações de 1 e 2 g.L^{-1} de frutose não foi evidenciada diferença com o controle. Além disso, a concentração celular foi aproximadamente igual em todos os cultivos estudados. Pode-se concluir que concentrações acima de 5 g.L^{-1} de frutose afetam negativamente o crescimento da *C. vulgaris*. As Figuras 14 e 15 apresentam os perfis de crescimento celular, pH e consumo de substrato dos cultivos avaliados.

Tabela 17: Parâmetros cinéticos nos cultivos com glicose e frutose.

Parâmetro	Frutose (g.L ⁻¹)														
	0			1			2			5			8		
Glicose inicial (g.L ⁻¹)	9,42	±	0,01	9,19	±	0,01	9,69	±	0,00	9,20	±	0,00	9,16	±	0,00
Frutose inicial (g.L ⁻¹)	-	±	-	1,09	±	0,02	2,05	±	0,03	4,85	±	0,02	8,16	±	0,01
X _{máx} (g.L ⁻¹)	4,92	±	0,00	4,74	±	0,01	5,11	±	0,01	4,83	±	0,01	4,76	±	0,02
pH _{máx}	8,40	±	0,07	8,46	±	0,02	8,48	±	0,04	8,55	±	0,01	8,24	±	0,03
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,030	±	0,000	0,030	±	0,001	0,030	±	0,001	0,029	±	0,000	0,025	±	0,001
tg(h)	23,18	±	0,58	22,88	±	0,34	23,10	±	0,08	23,50	±	0,24	27,40	±	0,11
t _{x_max} (h)	80,00	±	0,00	80,00	±	0,00	80,00	±	0,00	95,00	±	0,00	97,00	±	0,00
t _x (h)	80,00	±	0,00	80,00	±	0,00	80,00	±	0,00	95,00	±	0,00	97,00	±	0,00
P _x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,06	±	0,00	0,05	±	0,00	0,06	±	0,00	0,05	±	0,00	0,04	±	0,00
r (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,12	±	0,01	0,11	±	0,01	0,12	±	0,00	0,10	±	0,00	0,08	±	0,05
X (%)	100,00	±	0,00	89,39	±	0,50	82,52	±	1,04	65,48	±	0,02	52,83	±	0,66
Y _{X/S} (g/g)	0,52	±	0,05	0,51	±	0,01	0,53	±	0,01	0,52	±	0,00	0,52	±	0,02

Densidade celular máxima (X_{máx} [g.L⁻¹]); velocidade máxima específica de crescimento (μ_{máx} [h⁻¹]) foi calculada pelo gráfico ln(X) x t; tempo de geração: tg=ln(2)/μ_{máx} [h]; tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima (t_{Xmáx} [h]); tempo total de residência celular (t_x, [h]); produtividade celular: P_x=ΔX/Δt [g.L⁻¹.h⁻¹]; conversão global de substrato (X, [%]); fator de conversão de substrato em células: Y_{X/S}=ΔX/-ΔS [g_{biomassa}/g_{substrato}]; taxa de consumo de substrato (r_s=ΔS/Δt [g.L⁻¹.h⁻¹]).

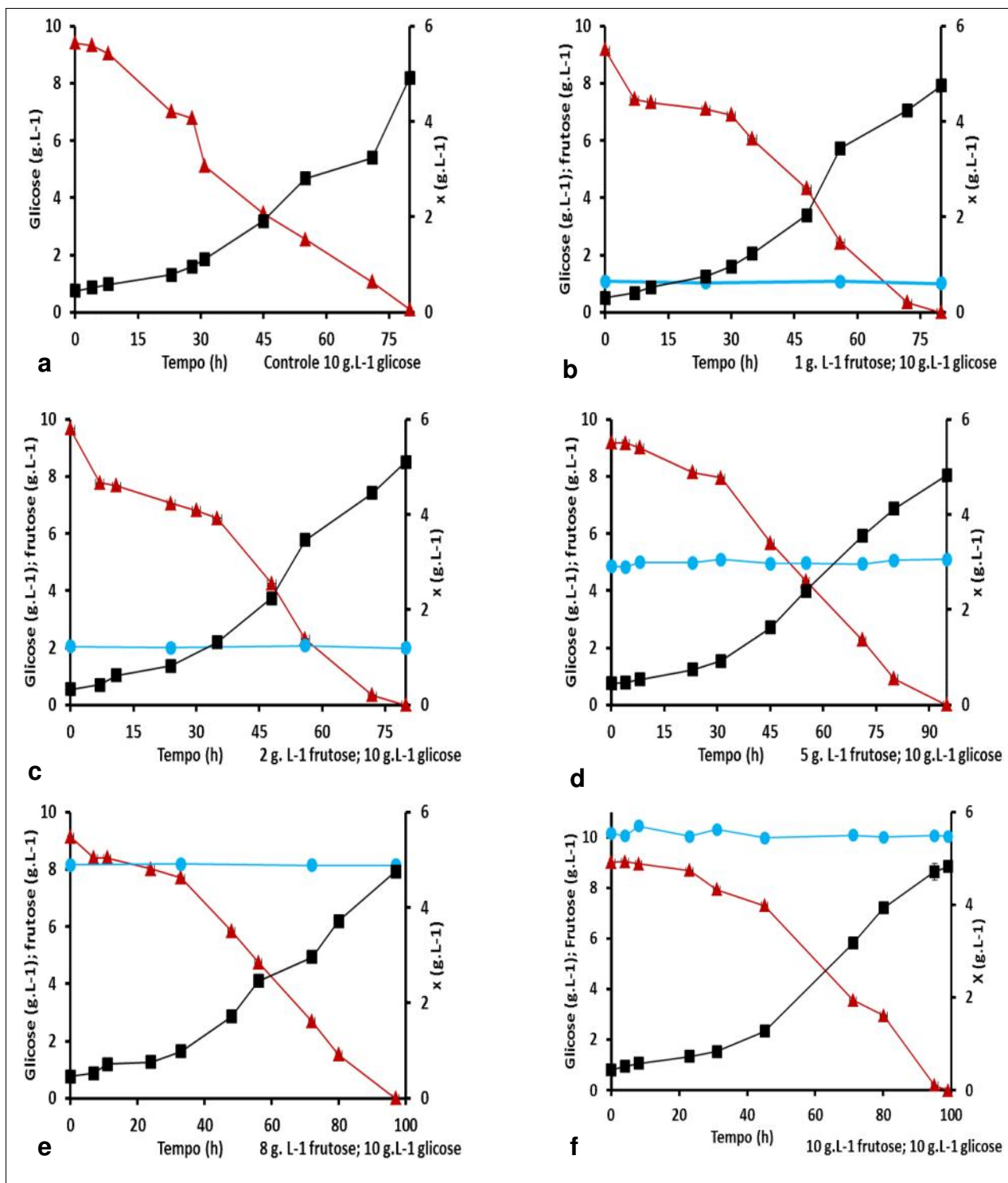


Figura 14: Perfis de concentração de glicose (‘▲’), frutose (‘●’) e celular (‘■’) para os experimentos avaliados. (a), cultivo controle, 10 g.L⁻¹ glicose (b), 1 g.L⁻¹ frutose (c), 2 g.L⁻¹ frutose (d), 5 g.L⁻¹ frutose (e), 8 g.L⁻¹ frutose (f), 10 g.L⁻¹ frutose.

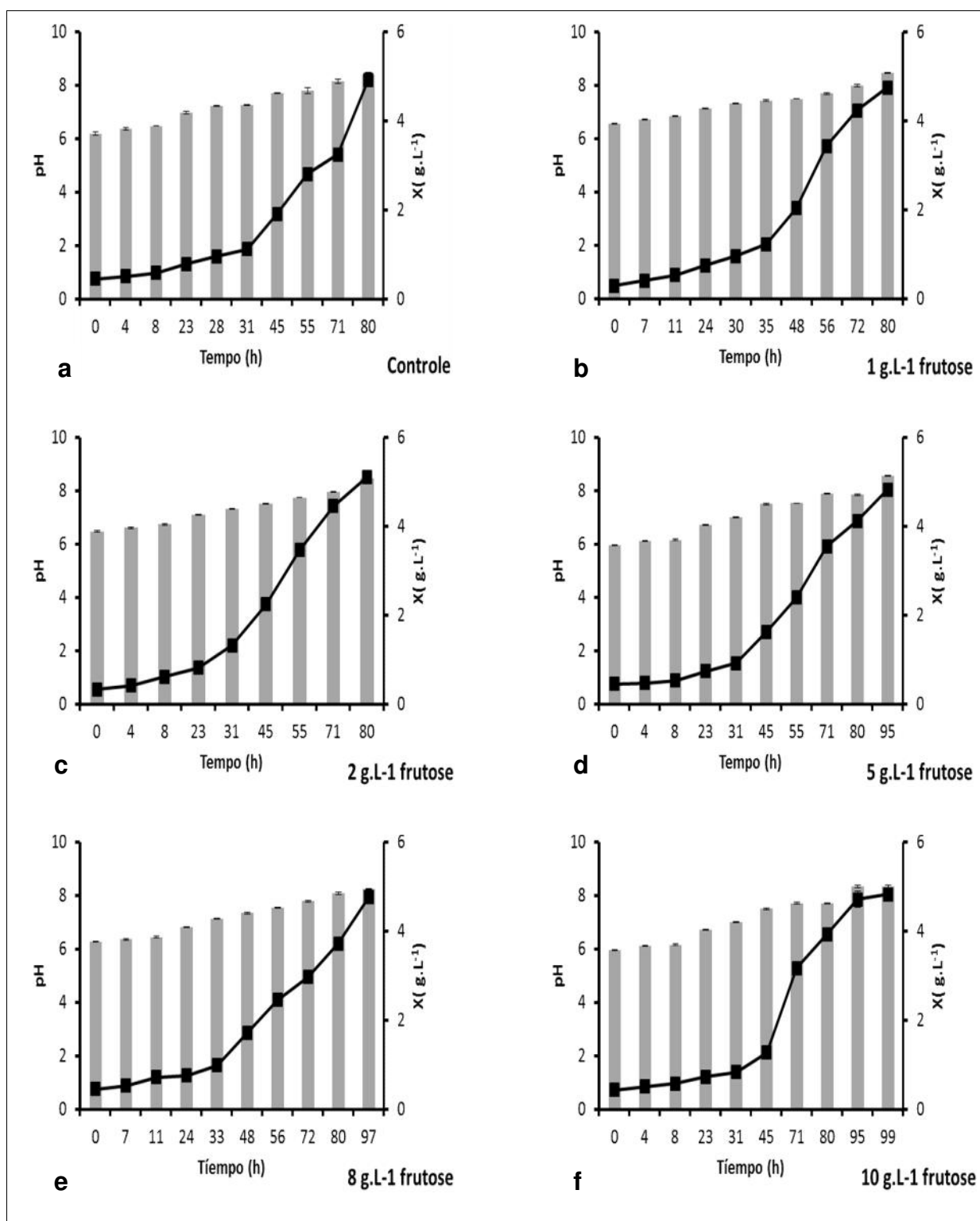


Figura 15: Perfis de pH (□) e concentração celular (■) para os experimentos com diferentes concentrações de frutose. 1 g.L⁻¹ frutose (a), 2 g.L⁻¹ frutose (b), 5 g.L⁻¹ frutose (c), 8 g.L⁻¹ frutose (d), 10 g.L⁻¹ frutose (e).

5.6.1 Cálculo da constante de inibição K_i

Baseados nos resultados obtidos nos experimentos calculou-se a constante de inibição K_i . Os valores de concentrações de substrato e velocidades específicas de crescimento foram linearizados empregando o método de Lineweaver-Burk (Jane M, 1998), como apresentado na Figura 16.

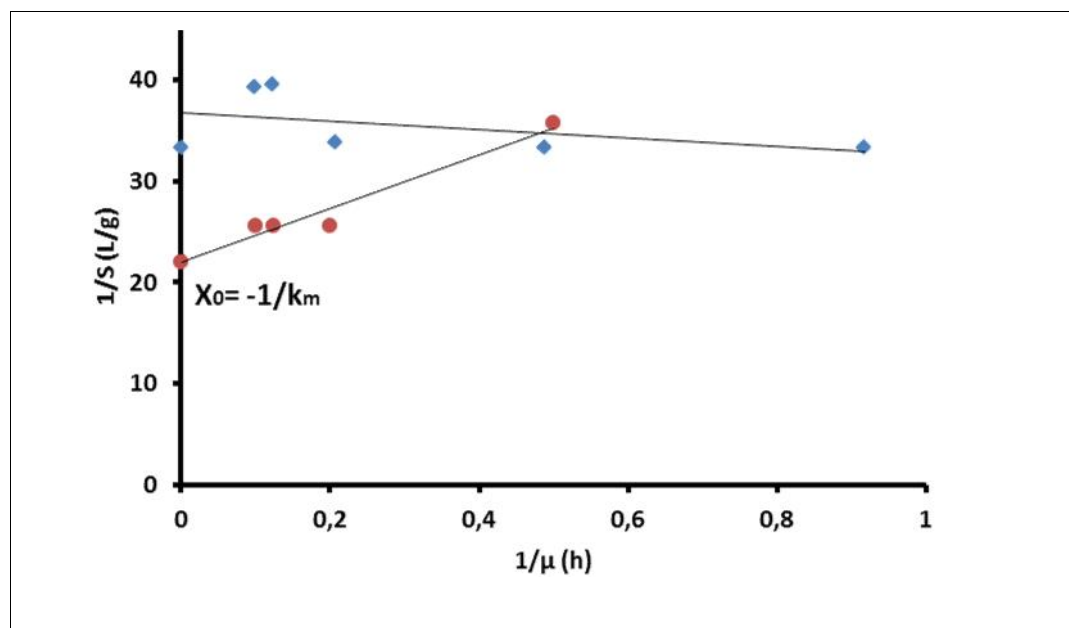


Figura 16: Linearização dos valores de concentração e velocidade específica de crescimento por o método de Lineweaver-Burk. (●) Linearização obtida das fermentações sem frutose no meio de cultivo; (◆) Linearização obtida das fermentações adicionadas de frutose no meio de cultivo.

Segundo o gráfico acima a inibição apresentada foi competitiva, pois o valor de K_m aumentou na presença do inibidor, efeito evidenciado pelo gráfico, tendo um intercepto comum no eixo $1/S$, e inclinação diferente da reta.

Os inibidores competitivos são substâncias que têm forma estrutural suficientemente semelhante a do substrato, neste caso frutose e glicose possuem estruturas químicas semelhantes, mas funções diferentes devido a sua isomeria.

Empregando a equação da inibição competitiva (Jane M, 1998), e os valores obtidos do gráfico anterior ($x_0 = -0,826$; $x_i = 5,666$) foi obtida a constante de inibição K_i .

$$k_i = 4,36 \text{ g.L}^{-1}$$

Pode-se observar na Tabela 17 que a velocidade específica de crescimento diminui a partir da concentração de 5 g.L⁻¹ de frutose. O valor exato é obtido pela constante de inibição K_i, ou seja, concentrações maiores que 4,36 g.L⁻¹ de frutose afetarão negativamente o crescimento da microalga *C. vulgaris*.

Segundo os resultados obtidos a inibição apresentada pode ser considerada uma inibição pelo substrato, este tipo de inibição afeta diversas vias metabólicas no interior da célula da microalga. Segundo, Lozano (2000), o fluxo das vias metabólicas ocorre a uma velocidade determinada na reação mais lenta da via. Esta reação tem o nome de etapa limitante do fluxo e a enzima que a catalisa encontra-se fortemente regulada, já que a sua atividade determina o fluxo da matéria na via. Se a velocidade da etapa limitante diminui, o consumo do substrato inicial também é reduzido, e fica livre para outras transferências e processos metabólicos. A velocidade da etapa limitante do fluxo pode-se alterar por diferenças de concentração do substrato.

.

5.7 Hidrólise do melaço de cana

Foi utilizado melaço de cana obtido na Usina Açucareira Ester S.A, safra 2010-2011, Cosmópolis-SP. A Tabela 18 apresenta a composição do melaço de cana empregado.

Tabela 18: Composição do melaço de cana

Componente	Quantidade (%)
Sacarose	20,81 $\pm$ 0,03
Glicose	4,48 $\pm$ 0,04
Frutose	4,78 $\pm$ 0,10
Umidade	8,44 $\pm$ 0,00
Cinzas	5,05 $\pm$ 0,21

Para aumentar a concentração de glicose presente no melaço de cana a sacarose presente no melaço foi hidrolisada, utilizando-se a metodologia de hidrólise da sacarose anteriormente apresentada. Diferentes concentrações de ácido clorídrico foram testadas visando otimizar a hidrólise do melaço de cana.

A Tabela 19 apresenta os resultados dos testes empregando diferentes concentrações de ácido na hidrólise de uma solução de 500 g.L⁻¹ de melaço de cana. As condições da hidrólise foram iguais às realizadas para a sacarose.

Os resultados indicam que a maior porcentagem de hidrólise foi obtida utilizando-se 0,0273% (m/v) de ácido clorídrico, sendo esta concentração escolhida para hidrólise do melaço de cana empregado nas fermentações.

Tabela 19: Resultados da hidrólise do melaço de cana em banho termostático com diferentes concentrações de ácido clorídrico.

% de hidrólise	Concentração de HCl % (m/v)	Desvio padrão
8,75	0,0091	0,05
40,30	0,0182	0,09
89,87	0,0273	0,12
84,37	0,0455	0,16

Baseado nos resultados acima, as condições estabelecidas para a hidrólise do melaço de cana foram: solução de 500g.L⁻¹ de melaço de cana, 0,0273% (m/v) de ácido clorídrico e aquecimento à 80°C por 30 min.

A Tabela 20 apresenta a composição final do melaço de cana, após hidrólise e detoxificação, utilizado nos cultivos com a *C. vulgaris*.

Tabela 20: Composição do melaço de cana hidrolisado e detoxificado.

Componente	Quantidade (%)
Sacarose	3,74 ± 0,02
Glicose	21,74 ± 0,05
Frutose	22,04 ± 0,10
Umidade	8,44 ± 0,00
Cinzas	5,05 ± 0,21

5.8 Cultivo em melaço de cana hidrolisado

A mistura de D-glicose e D-frutose obtida da hidrólise da sacarose presente no melaço de cana foi utilizada no cultivo da *Chlorella vulgaris* considerando as concentrações iniciais de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 g.L⁻¹ de melaço de cana hidrolisado. O rendimento médio da hidrólise do melaço de cana foi de 89,9 ± 0,12%.

Em todos os testes o pH inicial foi superior à 5 e a razão C/N inicial foi mantida em 20 pela adição de Nitrato de Sódio em quantidade suficiente. A Figura 17 apresenta os perfis de crescimento e de pH dos cultivos realizados com diferentes concentrações iniciais de melaço de cana hidrolisado. Os perfis de consumo de glicose, de frutose e crescimento celular são demonstrados na Figura 18. Na Tabela 21 é possível observar os valores dos parâmetros cinéticos obtidos para cada experimento realizado e a comparação dos parâmetros cinéticos pode ser visualizada na Figura 19.

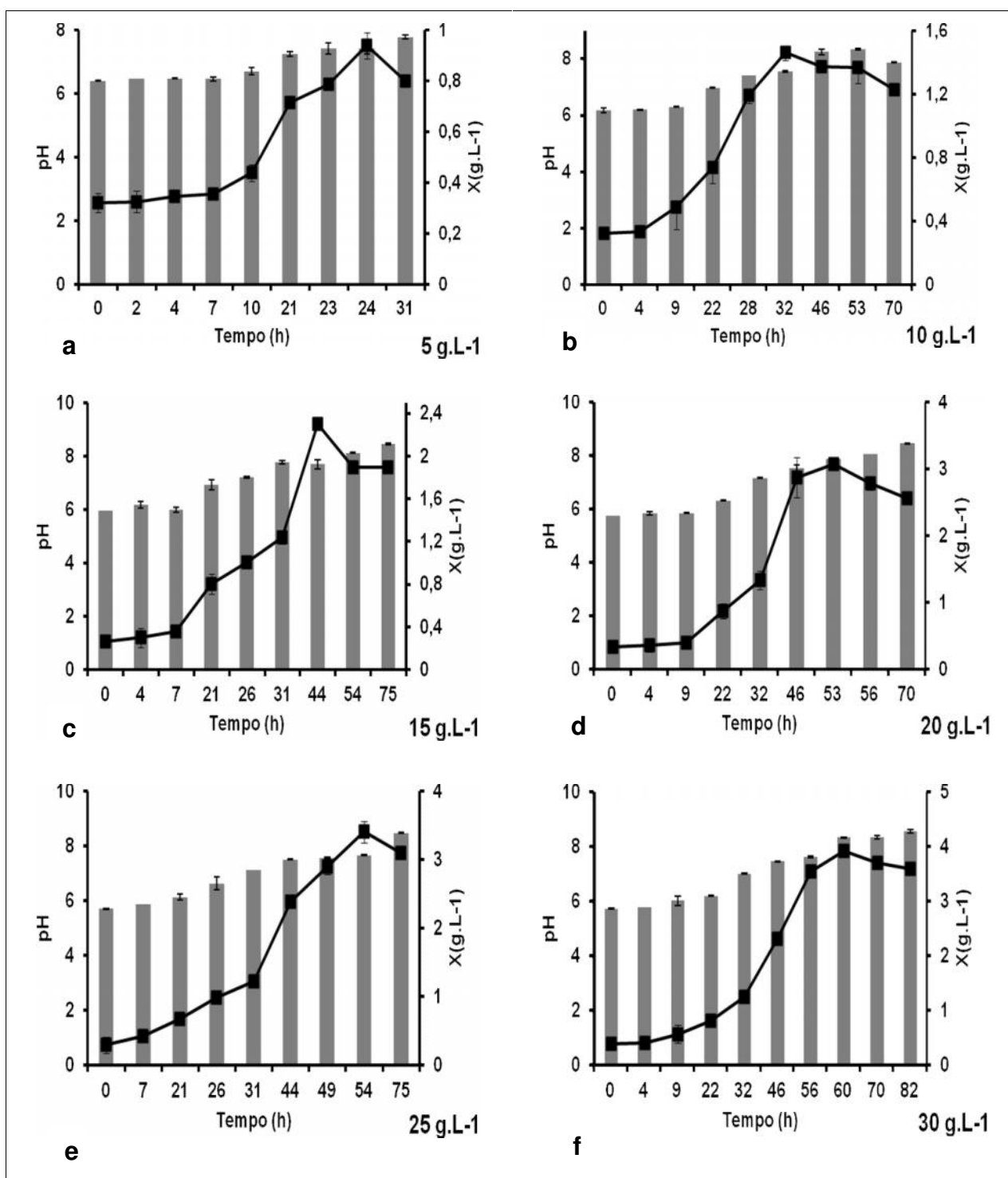


Figura 17: Perfis de pH (‘█’) e concentração celular (‘■’) para os experimentos com diferentes concentrações de melão de cana hidrolisado. 5 g.L⁻¹ melão de cana h (a), 10 g.L⁻¹ melão de cana h (b), 15 g.L⁻¹ melão de cana h (c), 20 g.L⁻¹ melão de cana h (d), 25 g.L⁻¹ melão de cana h (e), 30 g.L⁻¹ melão de cana h (f).

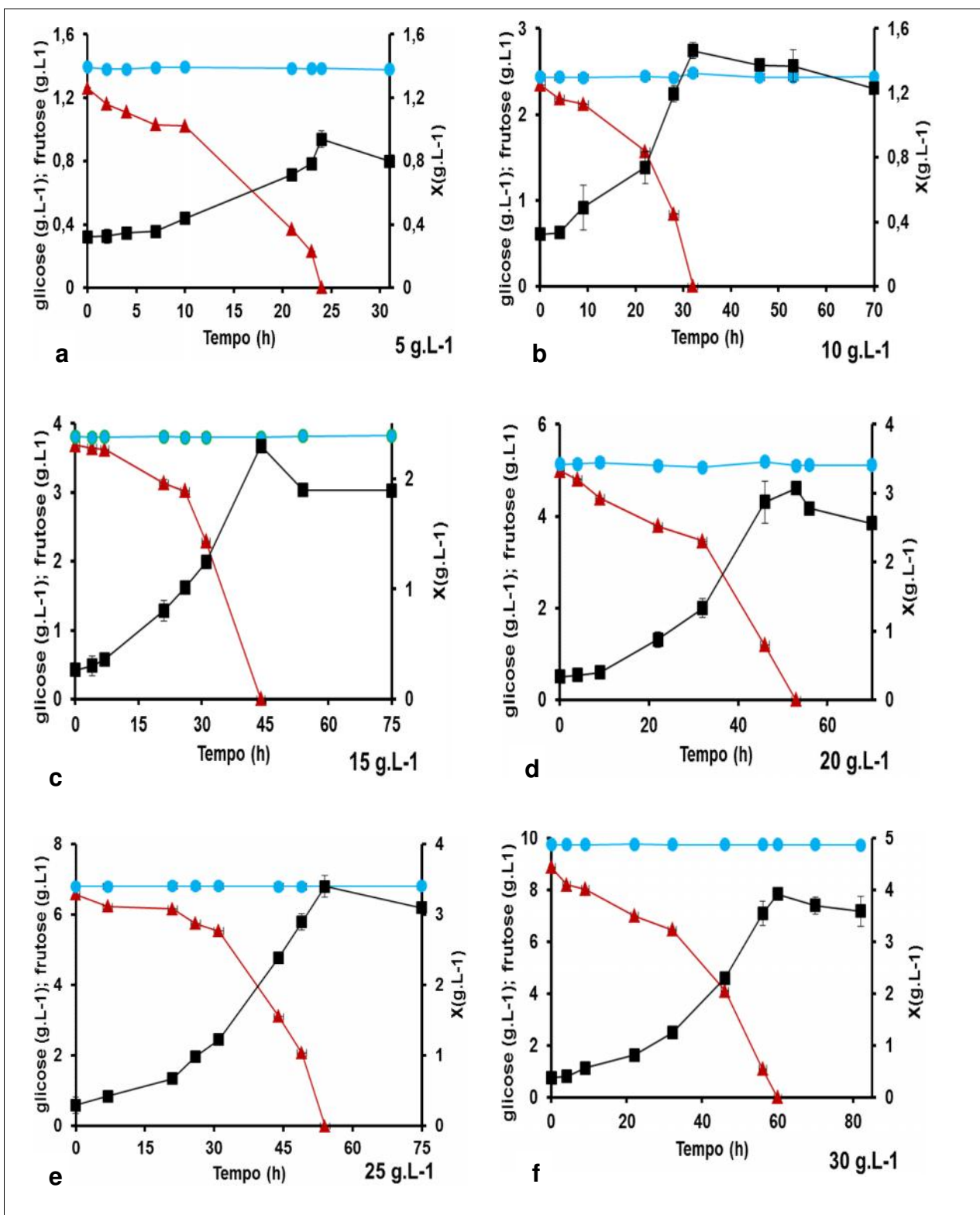


Figura 18: Perfis de concentração de glicose ('▲'), frutose ('●') e celular ('■') para os experimentos com diferentes concentrações de melão de cana hidrolisado. 5 g.L⁻¹ melão de cana h (a), 10 g.L⁻¹ melão de cana h (b), 15 g.L⁻¹ melão de cana h (c), 20 g.L⁻¹ melão de cana h (d), 25 g.L⁻¹ melão de cana h (e), 30 g.L⁻¹ melão de cana h (f).

Tabela 21: Parâmetros cinéticos obtidos a partir dos experimentos com melaço de cana hidrolisada.

Parâmetro	Melaço hidrolisado (g.L ⁻¹)																	
	5			10			15			20			25			30		
Glicose inicial (g.L ⁻¹)	1,26	±	0,00	2,35	±	0,00	3,69	±	0,00	4,99	±	0,01	6,58	±	0,00	8,87	±	0,01
X _{máx} (g.L ⁻¹)	0,94	±	0,04	1,46	±	0,03	2,30	±	0,01	3,07	±	0,06	3,40	±	0,11	3,92	±	0,01
pH _{máx}	7,78	±	0,06	8,34	±	0,02	8,46	±	0,02	8,45	±	0,01	8,47	±	0,01	8,55	±	0,06
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,051	±	0,001	0,050	±	0,001	0,050	±	0,001	0,047	±	0,000	0,046	±	0,004	0,036	±	0,001
tg(h)	13,46	±	0,27	13,86	±	1,24	13,75	±	0,24	14,75	±	0,11	14,94	±	1,17	18,99	±	0,70
t _{x_max} (h)	24,00	±	0,00	32,00	±	0,00	44,00	±	0,00	53,00	±	0,00	54,00	±	0,00	60,00	±	0,00
t _x (h)	24,00	±	0,00	32,00	±	0,00	44,00	±	0,00	53,00	±	0,00	54,00	±	0,00	60,00	±	0,00
P _x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,03	±	0,00	0,04	±	0,00	0,05	±	0,00	0,05	±	0,00	0,06	±	0,00	0,06	±	0,00
r (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,05	±	0,00	0,07	±	0,00	0,08	±	0,00	0,09	±	0,01	0,12	±	0,00	0,15	±	0,01
X _i (%)	25,24	±	0,54	23,47	±	0,16	24,59	±	0,48	24,96	±	2,20	26,31	±	0,11	29,58	±	1,47
Y _{X/S} (g/g)	0,49	±	0,02	0,49	±	0,02	0,551	±	0,00	0,55	±	0,03	0,47	±	0,01	0,40	±	0,02

Densidade celular máxima (X_{max}, [g.L⁻¹]); velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max} [h⁻¹]) foi calculada pelo gráfico ln(X) x t; tempo de geração: tg=ln(2)/ μ_{max} [h]; tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima (t_{xmax}, [h]); tempo total de residência celular (t_x, [h]); produtividade celular: P_x= X/ t [g.L⁻¹.h⁻¹]; conversão global de substrato (X, [%]); fator de conversão de substrato em células: Y_{X/S}= X/- S [g_{biomassa}/g_{substrato}]; taxa de consumo de substrato (r_s= - S/ t [g.L⁻¹.h⁻¹].

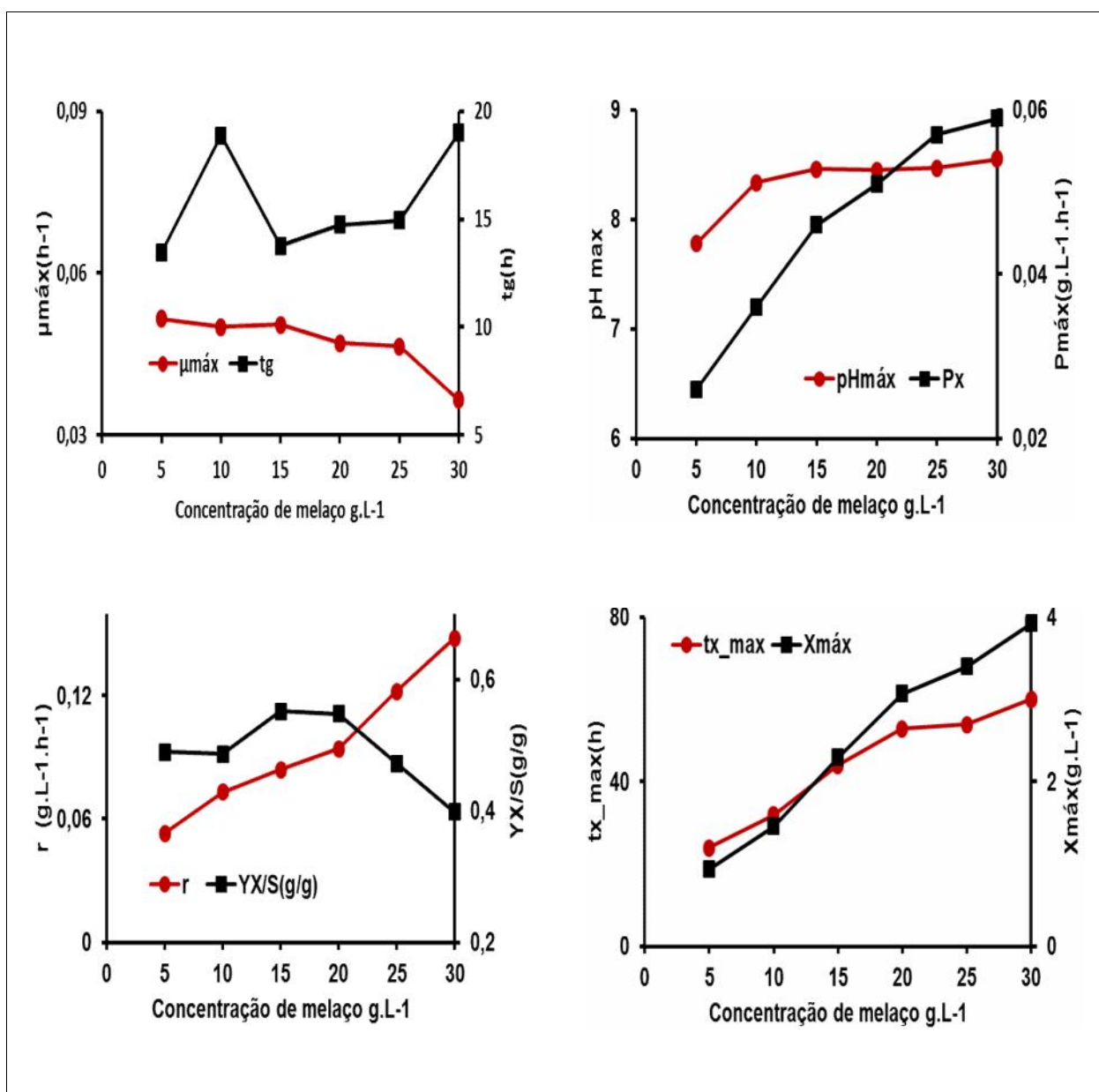


Figura 19: Comparação dos valores máximos dos principais parâmetros cinéticos obtidos nos experimentos com diferentes concentrações de melão de cana hidrolisada. $t_{x_{\max}}$ =tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima (h); $X_{\max}$ =densidade celular máxima (g.L⁻¹); $\mu_{\max}$ =velocidade máxima específica de crescimento (h⁻¹); t_g = tempo de geração; P_x = produtividade celular (g.L⁻¹.h⁻¹); r_s = taxa de consumo de substrato (g.L⁻¹.h⁻¹); $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato em células (g/g).

Os resultados evidenciaram o aumento do pH final do cultivo com o tempo de fermentação associado ao crescimento celular. Analogamente foi possível associar o consumo da glicose com o aumento celular, pois quanto maior a concentração de melão do meio de cultivo maior foi o pH final do cultivo. Os máximos valores de

concentração celular, pH, produtividade e taxa de consumo de glicose foram, respectivamente, 3,92 g.L⁻¹; 8,55, 0,059 g.L⁻¹.h⁻¹, 0,148 g.L⁻¹.h⁻¹, obtidos em 60 horas de cultivo contendo inicialmente 30 g.L⁻¹ de melaço de cana hidrolisado e 8,87 g.L⁻¹ de glicose. A máxima velocidade específica de crescimento e o mínimo tempo de geração foram 0,0515 h⁻¹ e 13,46 h⁻¹, respectivamente, alcançados no experimento com 5 g.L⁻¹ de melaço de cana hidrolisado.

Em todos os testes a glicose foi totalmente consumida. O fator de conversão de glicose em células foi maior na concentração de 15 g.L⁻¹ de melaço de cana hidrolisado (0,551) e menor na concentração de 30 g.L⁻¹ de melaço de cana hidrolisado (0,398).

Durante todo o período dos experimentos não foi evidenciado o consumo de frutose pela *Chlorella vulgaris*, sendo que, após o consumo total da glicose, o micro-organismo atingiu a fase estacionária seguida de morte celular.

Estudos para a *Chlorella protothecoides* mostraram que o uso de melaço de cana hidrolisado substitui completamente os nutrientes do meio de cultura convencional, diminuindo o custo de produção final do biodiesel em até 50% (Yan, Dong, Lu, Yue *et al.*, 2011).

Chlorella zofingiensis cresceu satisfatoriamente em melaço de cana para uma concentração de 20 g.L⁻¹ de açúcares redutores, alcançando uma velocidade específica de crescimento de 0,0337 h⁻¹ e concentração celular de 6,2 g.L⁻¹ em 120 horas de cultivo (Liu, Huang *et al.*, 2012).

Cultivo mixotrófico de *Chlorella vulgaris* mostrou inibição com concentrações maiores a 10% de melaço de cana, já empregando-se 1% de melaço de cana no meio de cultivo a microalga alcançou, em 120 horas de cultivo, concentração celular de 1 g.L⁻¹ e concentração de lipídeos de 0,75 g.L⁻¹ (Cheirsilp, Suwannarat *et al.*, 2011).

Estudos com *Chlorella vulgaris*, mostraram um aumento na velocidade crescimento com o aumento da concentração de melaço de cana, sendo de 0,017 h⁻¹ empregando-se 10 g.L⁻¹ de melaço de cana até 0,021 h⁻¹ com 20 g.L⁻¹ de melaço de

cana. Concentrações maiores evidenciaram efeito inibitório pelo substrato (Leesing, 2011).

5.8.1 Comparação dos cultivos com glicose, sacarose hidrolisada e melaço de cana hidrolisado.

A Tabela 22 e a Figura 20 apresentam a comparação dos resultados obtidos utilizando glicose (Vidotti, 2012), sacarose hidrolisada e melaço de cana hidrolisado como fonte de carbono para o cultivo da *C. vulgaris*. Os experimentos utilizados na comparação foram: i) Glicose com concentração inicial de 2,0; 5,0 e 10,0 g.L⁻¹; ii) Sacarose hidrolisada contendo uma mistura de glicose e frutose com aproximadamente 2,0; 5,0 e 10,0g.L⁻¹ de glicose; iii) Melaço de cana hidrolisada contendo uma mistura de glicose e frutose com aproximadamente 2,0; 5,0 e 10,0 g.L⁻¹ de glicose.

Tabela 22: Comparação dos cultivos com glicose, sacarose hidrolisada e melaço de cana hidrolisado.

Fonte de Carbono	M _{inicial} (g.L ⁻¹)	S _{inicial} (g.L ⁻¹)	G _{inicial} (g.L ⁻¹)	t _{consumo} (h)	X _{max} (g.L ⁻¹)	X _{max} /X ₀	Y _{X/S} (g.g)	μ _{máx} (h ⁻¹)
Melaço de cana hidrolisado	10	-	2,35	32	1,46	4,51	0,49	0,050
	20	-	4,99	53	3,07	9,03	0,55	0,047
	30	-	8,87	60	3,92	10,18	0,40	0,036
Sacarose Hidrolisada	-	5	2,21	47	1,36	5,09	0,49	0,035
	-	10	4,21	72	2,33	7,77	0,48	0,030
	-	20	9,23	122	5,28	16,66	0,54	0,026
Glicose (Vidotti, 2012)	-	-	2,14	54	1,29	4,66	0,47	0,028
	-	-	4,60	72	3,11	11,85	0,63	0,039
	-	-	9,67	84	5,04	16,84	0,49	0,039

Concentração inicial de melaço de cana hidrolisado (M_{inicial}, [g.L⁻¹]); Concentração inicial de sacarose hidrolisada (S_{inicial}, [g.L⁻¹]); Concentração inicial de glicose (G_{inicial}, [g.L⁻¹]); tempo de residência celular para consumo do substrato (t_{consumo}, [h]); densidade celular máxima (X_{max}, [g.L⁻¹]); razão da densidade celular máxima e inicial (X_{max}/X₀); fator de conversão de substrato em células: Y_{X/S}= X/- S [g_{biomassa}/g_{substrato}]; velocidade máxima específica de crescimento (μ_{máx} [h⁻¹]) foi calculada pelo gráfico ln(X) x t.

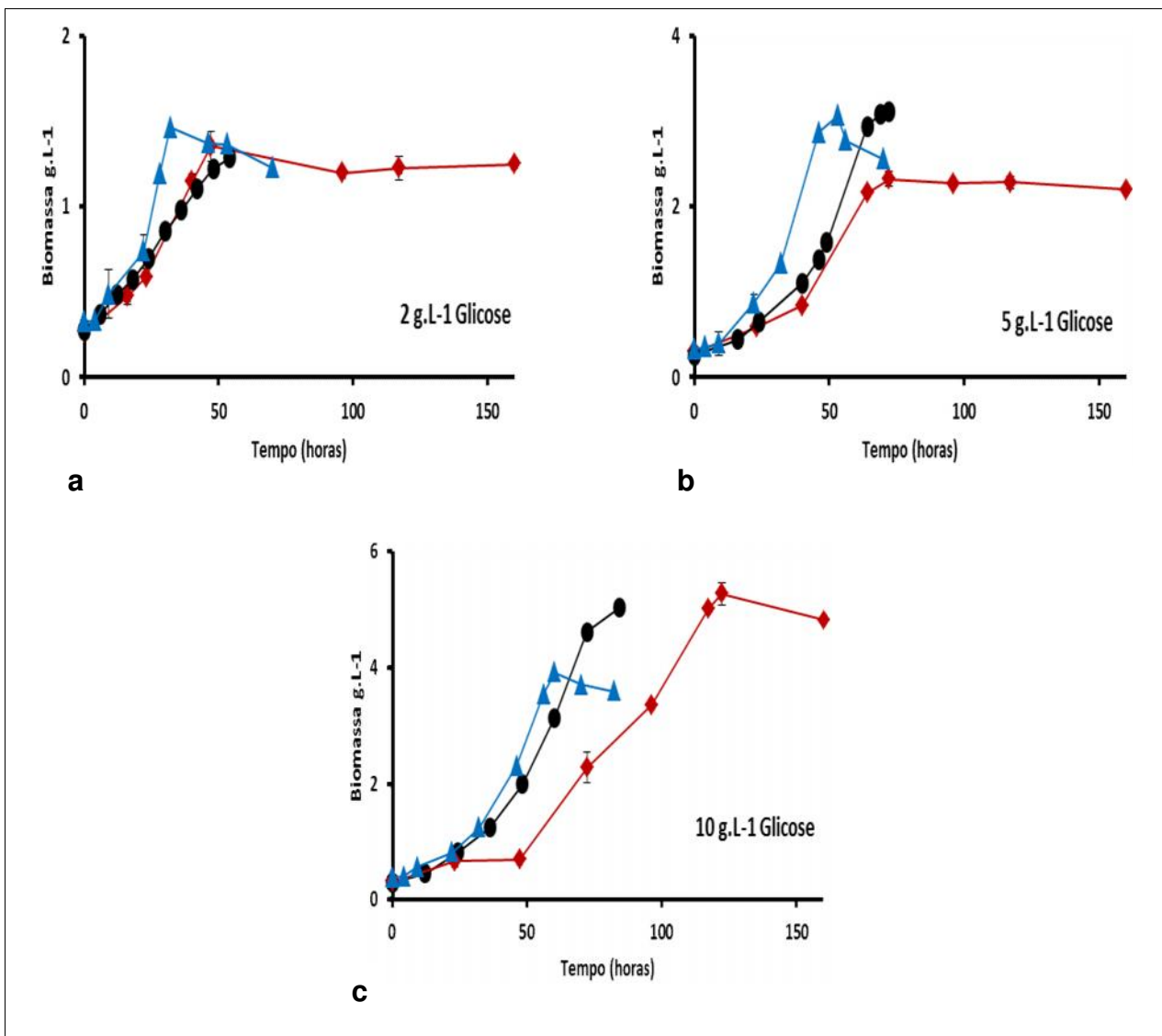


Figura 20: Perfis de concentração celular dos experimentos com glicose (‘●’), sacarose hidrolisada (‘◆’) e melaço de cana hidrolisado (‘▲’). 2 g.L⁻¹ glicose (a), 5 g.L⁻¹ glicose (b), 10 g.L⁻¹ glicose (c).

É possível notar que o melaço de cana hidrolisado aumentou substancialmente a velocidade máxima de crescimento e diminuiu o tempo de consumo do substrato. Comparando-se os valores de concentração celular obtidos com a glicose e o melaço de cana hidrolisado observa-se que as concentrações celulares são próximas para as concentrações de 10 e 20 g.L⁻¹ de melaço de cana hidrolisado, diminuindo no caso de 30 g.L⁻¹ de melaço de cana hidrolisado.

Segundo (Liu, Huang *et al.*, 2012) melaço de cana não só contém nutrientes essenciais para os micro-organismos, mas também contém íons metálicos e coloides em suspensão que podem aumentar o crescimento das microalgas.

5.9 Batelada alimentada com sacarose hidrolisada

A partir dos melhores resultados de concentração celular e produtividade obtidos em incubadora rotatória para a *C. vulgaris*, em sacarose hidrolisada, foi realizada uma batelada alimentada empregando uma concentração de 20 g.L⁻¹ de sacarose hidrolisada, objetivando aumentar a produtividade do cultivo.

Os resultados da batelada alimentada foram similares aos obtidos em incubadora rotatória, onde as velocidades específicas de crescimento para os experimentos realizados foram de 0,025 ± 0,000 h⁻¹. Foram realizadas duas alimentações após o esgotamento da glicose no meio de cultivo, sendo a primeira alimentação após 120,8 horas de cultivo e a segunda alimentação após 161,97 horas.

Os resultados também evidenciaram a diminuição da velocidade específica de crescimento após as alimentações, corroborando o efeito inibitório da frutose no crescimento da microalga. A velocidade diminuiu de 0,025 h⁻¹ até 0,014 h⁻¹, após 192,6 horas de cultivo. Resultados apresentados por Yeh, Chen *et al.* (2012a), mostraram que a *Chlorella vulgaris* ESP-31 conseguiu crescer em frutose, mas o crescimento foi baixo comparado com substratos como a glicose. Outros autores têm reportado baixos crescimentos celulares e baixas velocidades específicas de crescimento quando é empregada frutose como fonte de carbono orgânico para a *C. vulgaris* (Sun, Wang *et al.*, 2008; Liu, Huang *et al.*, 2010).

A maior concentração celular, pH e tempo de geração foram obtidos na batelada inicial, atingindo valores de 6,26 g.L⁻¹, 8,47 e 27,62 h respectivamente. O maior fator de conversão de substrato em células foi 0,56, reportado na primeira alimentação. Entretanto, na segunda alimentação foram obtidos os maiores valores de

produtividade celular e taxa de consumo de substrato ($0,226 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ e $0,473 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$) associado à alta concentração celular final obtida na fermentação ($18,37 \text{ g.L}^{-1}$).

A Figura 21 apresenta o crescimento celular da microalga *C. vulgaris* e o consumo do substrato. Durante a fermentação foram realizadas duas alimentações de meio de cultivo BBM concentrado 7,5 vezes, atingindo a concentração inicial de sacarose hidrolisada em aproximadamente 20 g.L^{-1} para cada um das alimentações. A Figura 22 apresenta o crescimento da microalga e a variação da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo durante a fermentação, após cada alimentação a concentração de oxigênio diminuiu de forma considerável, estabilizando em seguida.

A Tabela 23 apresenta um resumo dos parâmetros cinéticos obtidos na batelada alimentada para a *C. vulgaris* e também os parâmetros cinéticos obtidos em incubadora rotatória para a concentração de 20 g.L^{-1} de sacarose hidrolisada. Pode-se observar que os valores dos parâmetros cinéticos foram próximos em ambos os experimentos (incubadora e fermentador).

A Figura 23 apresenta uma fotografia do final da fermentação empregando sacarose hidrolisada como fonte de carbono para o crescimento da microalga *C. vulgaris*.

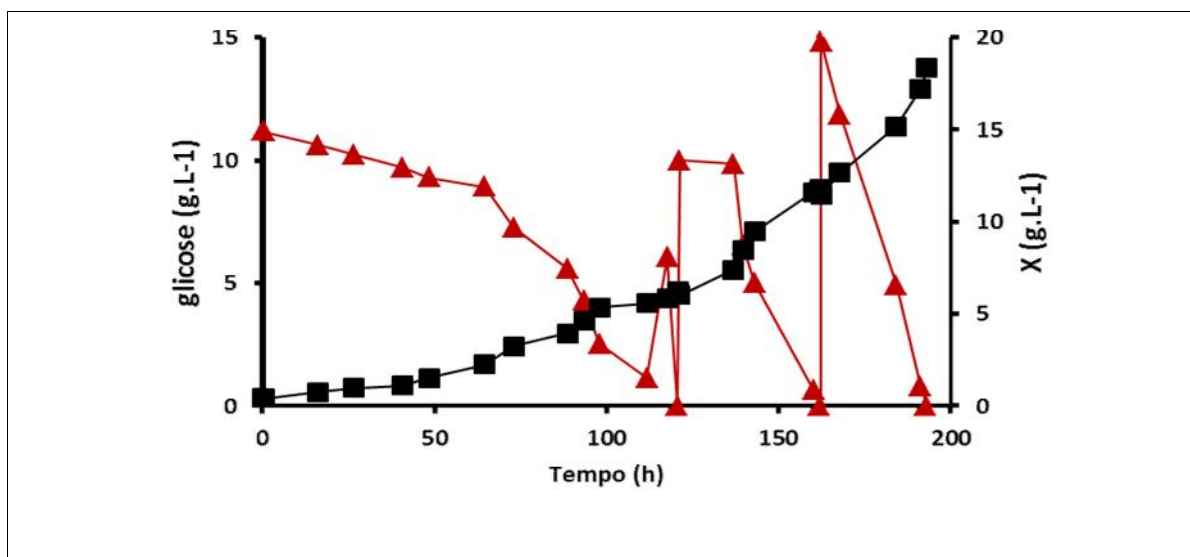


Figura 21: Perfis de concentração celular da batelada alimentada da *C. vulgaris* em sacarose hidrolisada. Crescimento celular (‘■’) e glicose(‘▲’).

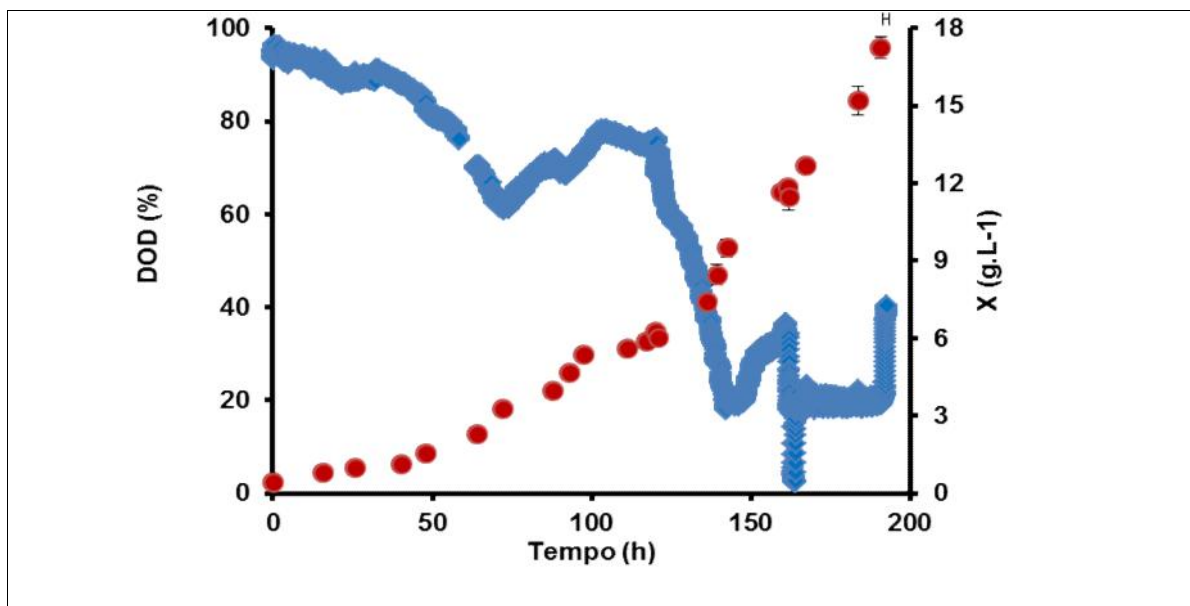


Figura 22: Perfis de crescimento celular e DOD na batelada alimentada da microalga *C. vulgaris* em sacarose hidrolisada. Crescimento celular ('●') e concentração de oxigênio dissolvido DOD ('◆').



Figura 23: Fermentação empregando sacarose hidrolisada como fonte de carbono para a *C. vulgaris*.

Tabela 23: Parâmetros cinéticos obtidos durante a batelada alimentada e incubadora rotatória para o cultivo de *C. vulgaris* em sacarose hidrolisada.

Parâmetro	Incubadora			Batelada			Alimentação 1			Alimentação 2		
Glicose inicial (g.L ⁻¹)	9,23	±	0,39	11,15	±	0,33	10,38	±	0,37	14,60	±	0,46
X _{máx} (g.L ⁻¹)	5,28	±	0,04	6,26	±	0,13	5,80	±	0,02	6,91	±	0,20
pH _{máx}	8,79	±	0,03	8,47	±	0,04	8,21	±	0,06	8,42	±	0,03
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,026	±	0,001	0,025	±	0,000	0,017	±	0,008	0,014	±	0,000
tg(h)	26,87	±	0,96	27,62	±	0,11	41,01	±	0,03	48,31	±	0,51
t _{x_max} (h)	121,92	±	0,00	120,20	±	0,00	40,90	±	0,00	30,63	±	0,00
t _x (d)	121,92	±	0,00	120,20	±	0,00	40,90	±	0,00	30,63	±	0,00
P _x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,04	±	0,00	0,05	±	0,00	0,14	±	0,00	0,23	±	0,01
r(g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,07	±	0,00	0,09	±	0,00	0,25	±	0,00	0,47	±	0,01
X(%)	41,17	±	0,00	50,01	±	0,07	50,01	±	0,10	50,00	±	0,03
Y _{x/s} (g/g)	0,57	±	0,01	0,52	±	0,00	0,56	±	0,02	0,47	±	0,00
% Lipídeos (determinado no final da batelada alimentada)										23,77	±	0,70

Densidade celular máxima (X_{máx}, [g.L⁻¹]); velocidade máxima específica de crescimento (μ_{máx} [h⁻¹]) foi calculada pelo gráfico ln(X) x t; tempo de geração: tg=ln(2)/μ_{máx} [h]; tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima (t_{x_max}, [h]); tempo total de residência celular (t_x, [h]); produtividade celular: P_x= X/ t [g.L⁻¹.h⁻¹]; conversão global de substrato (X, [%]); fator de conversão de substrato em células: Y_{x/s}= X/ S [g_{biomassa}/g_{substrato}]; taxa de consumo de substrato (r_s= S/ t [g.L⁻¹.h⁻¹]).

5.9.1 Comparação dos cultivos com glicose e sacarose hidrolisada.

A Tabela 24 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos em fermentador com glicose (Vidotti, A.D.D, 2012), e sacarose hidrolisada, bem como os resultados obtidos em incubadora rotatória para a glicose (Vidotti, A.D.D, 2012), e sacarose hidrolisada como fonte de carbono orgânico no crescimento da microalga *C. vulgaris*.

Tabela 24: Comparação dos cultivos com glicose e com sacarose hidrolisada

Fonte de Carbono e tipo de cultivo	G_{inicial} (g.L ⁻¹)	t_{consumo} (h)	X_{max} (g.L ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)
Sacarose Hidrolisada, Fermentador	11,15	120,20	6,26	0,52	0,025
Glicose, Fermentador (Vidotti, A.D.D, 2012)	10,00	157,00	4,00	0,46	0,039
Sacarose Hidrolisada incubadora	9,23	121,90	5,28	0,57	0,026
Glicose, Incubadora (Vidotti, A.D.D, 2012)	9,67	84,00	5,04	0,49	0,039

Concentração inicial de glicose (G_{inicial} , [g.L⁻¹]); tempo de residência celular para consumo do substrato (t_{consumo} , [h]); densidade celular máxima (X_{max} , [g.L⁻¹]); fator de conversão de substrato em células: $Y_{X/S} = X/S$ [g_{biomassa}/g_{substrato}]; velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max} [h⁻¹]) foi calculada pelo gráfico $\ln(X) \times t$.

Pode-se observar que as velocidades específicas de crescimento das fermentações com sacarose hidrolisada em incubadora e fermentador, foram próximas. Também é observado que a máxima concentração celular e fator de conversão de substrato em células foram maiores para a sacarose hidrolisada e, além disso, foi obtido um menor tempo de consumo, com 36 horas de diferença.

Resultados apresentados por Xu, Miao *et al.* (2006), para a *Chlorella protothecoides* em fermentador de 5 litros, empregando glicose como fonte de carbono, atingiu concentração celular de 15,50 g.L⁻¹ em 184 horas de cultivo, resultados similares aos obtidos com sacarose hidrolisada (18,37 g.L⁻¹ em 191,50 horas). É possível,

portanto, empregar sacarose hidrolisada como fonte alternativa nos cultivos da *Chlorella*, obtendo-se resultados similares ou até melhores que os da glicose.

5.10 Batelada alimentada com melaço de cana hidrolisado

A partir dos melhores resultados de concentração celular e produtividade obtidos em incubadora rotatória para a *C. vulgaris*, com melaço de cana hidrolisado, foi realizada uma batelada alimentada empregando uma concentração de 15 g.L⁻¹ de melaço de cana, objetivando aumentar a produtividade do cultivo.

Os resultados da batelada alimentada foram melhores que os obtidos em incubadora rotatória, com velocidades específicas de crescimento de $0,052 \pm 0,000 \text{ h}^{-1}$. Foram realizadas duas alimentações após o esgotamento da glicose no meio de cultivo, sendo a primeira após 43 horas de cultivo e a segunda o após 52,30 horas.

Os resultados evidenciaram o aumento da velocidade específica de crescimento após as alimentações, efeito contrário ao ocorrido com a fermentação empregando sacarose hidrolisada. A velocidade aumentou de $0,051 \text{ h}^{-1}$ até $0,064 \text{ h}^{-1}$, após 58 horas de cultivo. Resultados similares foram apresentados por Yan, D., Lu, Y. *et al.* (2011) e, mostraram que a *Chlorella protothecoides* conseguiu crescer em melaço de cana hidrolisado, obtendo-se melhores resultados do que quando utilizado a glicose; a concentração celular e tempo de geração foram superiores para o melaço de cana hidrolisado. Liu, Huang *et al.* (2012) também apresentaram que *Chlorella zofingiensis* cresceu satisfatoriamente em melaço de cana, alcançando uma velocidade específica de crescimento de $0,034 \text{ h}^{-1}$ e uma concentração celular de 6,20 g.L⁻¹ em 120 horas de cultivo.

Outros estudos para diferentes espécies de microalgas, como *Spirulina platensis*, *Nostoc* sp. e *Dunaliella salina*, têm reportado resultados satisfatórios empregando melaço de cana como fonte alternativa de carbono orgânico, concluindo que uso de melaço de cana melhora o crescimento da microalga (Rodrigues F; Pinotti, 2002; Andrade e Costa, 2007; Almeida, 2010).

A maior velocidade específica de crescimento e menor tempo de geração foram obtidos na segunda alimentação, atingindo valores de $0,064 \text{ h}^{-1}$, e $10,76 \text{ h}$ respectivamente, em 6,25 horas de cultivo. Entretanto, a maior concentração celular e pH foram obtidos na batelada inicial, atingindo valores de $3,07 \text{ g.L}^{-1}$ e $8,02$ respectivamente em 42,95 horas de cultivo. A produtividade celular e taxa de consumo de substrato aumentou após as alimentações realizadas, para o caso da produtividade celular de $0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ até $0,38 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e para a taxa de consumo de substrato de $0,13 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ até $0,57 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

No entanto, o fator de conversão de substrato em células foi maior na segunda alimentação (0,80), e diminuiu na segunda alimentação apresentando um valor de 0,66.

A Figura 24 apresenta o crescimento celular da microalga *C. vulgaris* e o consumo do substrato. Durante a fermentação foram realizadas duas alimentações de meio de cultivo BBM, concentrado 10 vezes, atingindo-se a concentração inicial de melaço de cana hidrolisado em aproximadamente 15 g.L^{-1} para cada uma das alimentações. A Figura 25 apresenta o crescimento da microalga e a variação da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo durante a fermentação, após cada alimentação a concentração de oxigênio diminuiu de forma considerável, estabilizando em seguida.

A Tabela 25 apresenta um resumo comparativo dos parâmetros cinéticos obtidos na batelada alimentada e incubadora rotatória para a *C. vulgaris*, com concentração de 15 g.L^{-1} de melaço de cana hidrolisado. Pode-se observar que os valores dos parâmetros cinéticos foram mais elevados no fermentador.

A Figura 26 apresenta uma fotografia do final da fermentação empregando melaço de cana hidrolisado como fonte de carbono para o crescimento da microalga *C. vulgaris*.

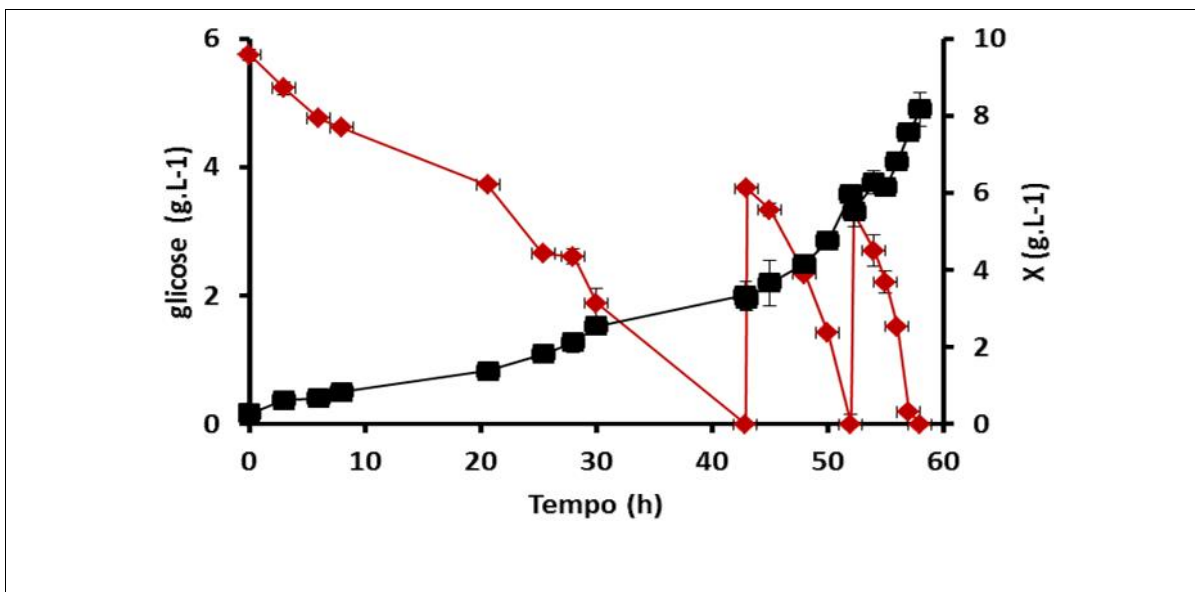


Figura 24: Perfis de concentração celular da batelada alimentada da *C. vulgaris* em melão de cana hidrolisada. Crescimento celular ('■') e glicose('▲').

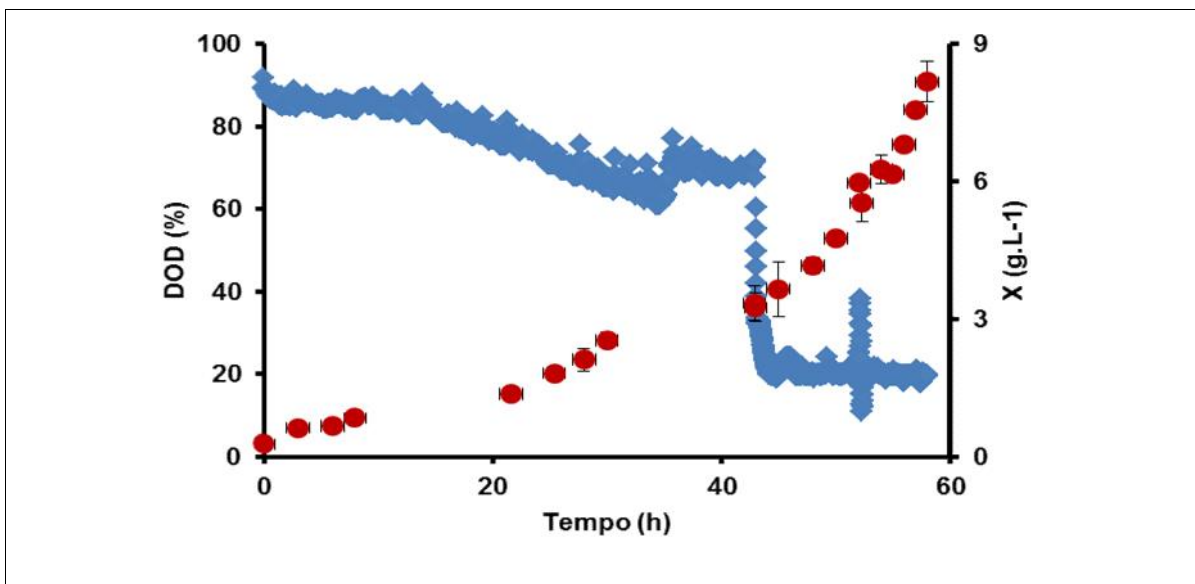


Figura 25: Perfis de crescimento celular e DOD na batelada alimentada da microalga *C. vulgaris* em melão de cana hidrolisado. Crescimento celular ('●') e concentração de oxigênio dissolvido DOD ('◆').



Figura 26: Fermentação empregando melaço de cana hidrolisado como fonte de carbono para a *C. vulgaris*. Início da fermentação (a), final da fermentação (b).

Tabela 25: Parâmetros cinéticos obtidos durante a batelada alimentada e incubadora rotatória para o cultivo de *C. vulgaris* em melaço de cana hidrolisado.

Parâmetro	Incubadora			Batelada			Alimentação 1			Alimentação 2		
Glicose inicial (g.L ⁻¹)	3,69	±	0,00	5,75	±	0,54	3,67	±	0,29	3,56	±	0,27
X _{máx} (g.L ⁻¹)	2,30	±	0,01	3,07	±	0,28	2,94	±	0,09	2,35	±	0,08
pH _{máx}	8,46	±	0,02	8,02	±	0,00	7,87	±	0,05	7,86	±	0,03
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,050	±	0,001	0,051	±	0,000	0,063	±	0,000	0,064	±	0,001
tg(h)	13,75	±	0,23	13,53	±	0,17	10,93	±	0,03	10,76	±	0,02
t _{x_max} (h)	44,00	±	0,00	42,90	±	0,00	9,50	±	0,50	6,20	±	0,00
t _x (d)	44,00	±	0,00	42,90	±	0,00	9,50	±	0,50	6,20	±	0,00
P _x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,05	±	0,00	0,07	±	0,01	0,31	±	0,01	0,38	±	0,02
r (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,08	±	0,00	0,13	±	0,01	0,38	±	0,01	0,57	±	0,00
X(%)	24,58	±	0,48	34,72	±	0,01	24,51	±	1,95	21,96	±	0,00
Y _{x/s} (g/g)	0,55	±	0,00	0,53	±	0,00	0,80	±	0,04	0,66	±	0,03
% Lipídeos (determinado no final da batelada alimentada)										10,78%	±	0,66

Densidade celular máxima (X_{máx}, [g.L⁻¹]); velocidade máxima específica de crescimento (μ_{máx} [h⁻¹]) foi calculada pelo gráfico ln(X) x t; tempo de geração: tg=ln(2)/ μ_{máx} [h]; tempo de residência celular para a obtenção da densidade celular máxima (t_{xmáx}, [h]); tempo total de residência celular (t_x, [h]); produtividade celular: P_x= X/ t [g.L⁻¹.h⁻¹]; conversão global de substrato (X, [%]); fator de conversão de substrato em células: Y_{x/s}= X/- S [gbiomassa/gsubstrato]; taxa de consumo de substrato (r_s= - S/ t [g.L⁻¹.h⁻¹]).

5.10.1 Comparação dos cultivos com glicose, sacarose hidrolisada e melaço de cana hidrolisada.

A Tabela 26 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos em fermentador, em regime de batelada alimentada com glicose (10 g.L^{-1}) (Vidotti, 2012), sacarose hidrolisada contendo aproximadamente 10 g.L^{-1} de glicose e melaço de cana hidrolisado contendo aproximadamente 4 g.L^{-1} de glicose, bem como os resultados obtidos em incubadora rotatória para a glicose (10 g.L^{-1}) (Vidotti, 2012), sacarose hidrolisada (10 g.L^{-1} de glicose) e melaço de cana hidrolisado (4 g.L^{-1} de glicose) como fonte de carbono orgânico no crescimento da microalga *C. vulgaris*.

Pode-se observar que a velocidade específica de crescimento é muito maior para o melaço de cana hidrolisado tanto fermentador ($0,064 \text{ h}^{-1}$) como na incubadora ($0,050 \text{ h}^{-1}$). Além disso, observa-se também o aumento da velocidade específica de crescimento após cada alimentação, ($0,051 \text{ h}^{-1}$ até $0,064 \text{ h}^{-1}$), este aumento somente foi evidenciado para o melaço de cana, pois para os outros substratos a velocidade diminui após cada alimentação. Também é observado que os maiores valores de produtividade celular fator de conversão de substrato em células e menor tempo de consumo foram para o melaço de cana hidrolisado e, do mesmo modo, foi obtido um menor tempo de consumo.

Tabela 26: Comparação dos cultivos com glicose e com sacarose hidrolisada

Fonte de Carbono e tipo de cultivo	G_{inicial} (g.L ⁻¹)	t_{consumo} (h)	X_{max} (g.L ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	P (g.L ¹ .h ⁻¹)	Lipídeos %
Melaço de cana, fermentador	5,75	42,95	3,07	0,53	0,051	0,072	10,72
Melaço de cana, fermentador, 1 alimentação	3,67	9,56	2,94	0,80	0,063	0,308	
Melaço de cana, fermentador, 2 alimentação	3,56	6,25	2,35	0,66	0,064	0,378	
Sacarose Hidrolisada, Fermentador	11,15	120,20	6,26	0,52	0,025	0,050	23,77
Sacarose Hidrolisada, Fermentador, 1 alimentação	10,40	40,90	5,80	0,56	0,017	0,142	
Sacarose Hidrolisada, Fermentador, 2 alimentação	14,60	30,60	6,91	0,47	0,014	0,226	
Glicose, Fermentador (Vidotti, A.D, 2012)	10,00	157,00	4,00	0,46	0,039	0,061	19,00
Melaço de cana, incubadora	3,69	44,00	2,30	0,55	0,050	0,046	-
Sacarose Hidrolisada incubadora	9,23	121,9	5,28	0,57	0,026	0,041	-
Glicose, Incubadora (Vidotti, A.D, 2012)	9,67	84,00	5,04	0,49	0,039	0,056	-

Concentração inicial de glicose (G_{inicial} , [g.L⁻¹]); tempo de residência celular para consumo do substrato (t_{consumo} , [h]); densidade celular máxima (X_{max} , [g.L⁻¹]); fator de conversão de substrato em células: $Y_{X/S} = X / S$ [g_{biomassa}/g_{substrato}]; velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max} [h⁻¹]) foi calculada pelo gráfico $\ln(X) \times t$; produtividade celular: $P_x = X / t$ [g.L⁻¹.h⁻¹].

Resultados apresentados por Yan, D., Lu, Y. *et al.* (2011), mostraram uma comparação no crescimento da *Chlorella protothecoides*, em glicose e em melaço de cana hidrolisado, sendo obtidas as maiores concentrações celulares e menores tempos de geração para o melaço de cana hidrolisado, apresentado também uma diminuição no custo de produção de quase 50%, já que o melaço de cana é um substrato mais barato.

Portanto, os resultados obtidos para a *C. vulgaris* empregando melaço de cana hidrolisado, são bastante promissores, diminuindo custos de produção e aumentando produtividades no processo (0,041 g.L⁻¹.h⁻¹ até 0,226 g.L⁻¹.h⁻¹). No entanto a concentração de lipídeos empregando melaço de cana é muito baixo (10,72 %) comparado aos resultados obtidos com a sacarose hidrolisada (23,77 %). Resultados apresentados por Leasing (2011), mostraram que *Chlorella* sp. empregando uma concentração de melaço de cana de 30 g.L⁻¹, atingiu uma porcentagem de lipídeos de 20,65% e concentrações maiores a 30 g.L⁻¹ diminuíram a porcentagem de lipídeos na célula.

5.11 Criopreservação de microalgas

Discutiu-se os resultados obtidos dos tempos de armazenamento de 15, 30, 60, 90, 180 e 270 para os criopreservantes, glicerol, metanol e DMSO (dimetilsulfoxido), nas diferentes concentrações utilizadas.

Foi realizada uma cinética para a microalga *Chlorella vulgaris* que serviu como referência para comparação com as cinéticas de crescimento após armazenagem no ultrafreezer (cinética zero). As Tabelas 27, 28 e 29 apresentam as velocidades específicas de crescimento da microalga após o tempo de armazenamento no ultrafreezer para os períodos avaliados e os n-repiques realizados até atingir a velocidade inicial de crescimento.

A Figura 27 apresenta a cinética de crescimento zero para a microalga *Chlorella vulgaris* nas condições testadas. A microalga alcançou uma velocidade

específica de crescimento de $0,269 \text{ d}^{-1}$, atingindo concentração celular de $1,61 \times 10^6$ células/ml em 5 dias de cultivo.

As Figuras 28, 29, 30, 31 e 32 apresentam as cinéticas de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* após os tempos de prateleira avaliados para todos os criopreservantes estudados.

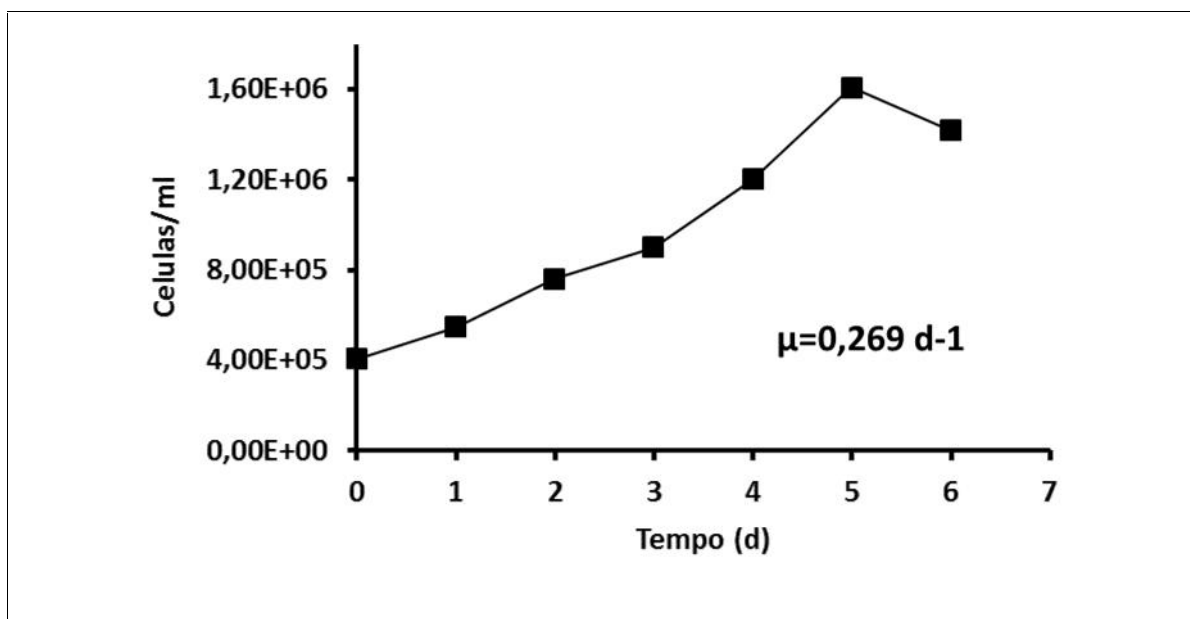


Figura 27: Cinética de crescimento para a microalga *Chlorella vulgaris* antes de ser armazenada no ultrafreezer. (cinética zero).

Tabela 27: Velocidades específicas de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* após armazenagem em ultrafreezer nos tempos avaliados.

Cinética zero = 0.269 d ⁻¹												
Tempo de armazenagem		15 dias (d ⁻¹)						30 dias (d ⁻¹)				
Nº de repiques		1	2	3				1	2	3		
Glicerol 5%		0,076 ± 0,001	0,154 ± 0,003	0,268 ± 0,004				0,161 ± 0,002	0,260 ± 0,002			
Glicerol 10%		0,154 ± 0,010	0,269 ± 0,012					0,185 ± 0,009	0,260 ± 0,005			
Metanol 5%		0,201 ± 0,012	0,206 ± 0,003	0,264 ± 0,005				0,129 ± 0,006	0,204 ± 0,002	0,265 ± 0,000		
Metanol 10%		0,123 ± 0,001	0,212 ± 0,002	0,264 ± 0,000				0,129 ± 0,006	0,210 ± 0,001	0,263 ± 0,006		
DMSO 5%		0,260 ± 0,001						0,134 ± 0,033	0,266 ± 0,010			
DMSO 10%		0,269 ± 0,001						0,266 ± 0,001				

velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\max}$ [d⁻¹]) foi calculada pelo gráfico ln(X) x t.

Tabela 28: Velocidades específicas de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* após armazenagem em ultrafreezer nos tempos avaliados.

Cinética zero =0.269 d ⁻¹																								
Tempo de armazenage m	60 dias (d ⁻¹)											90 dias (d ⁻¹)												
Nº de repiques	1			2			3			4			1			2			3			4		
Glicerol 5%	0,172	±	0,004	0,230	±	0,002	0,236	±	0,003	0,267	±	0,000	0,126	±	0,001	0,153	±	0,000	0,235	±	0,0018	0,270	±	0,036
Glicerol 10%	0,044	±	0,005	0,232	±	0,001	0,263	±	0,004				0,233	±	0,003	0,268	±	0,003						
Metanol 5%	0,097	±	0,002	0,151	±	0,001	0,204	±	0,003	0,265	±	0,000	0,000	±	0,000	0,000	±	0,000	0,000	±	0,000			
Metanol 10%	0,028	±	0,000	0,171	±	0,003	0,240	±	0,001	0,270	±	0,001	0,000	±	0,000	0,000	±	0,000	0,000	±	0,000			
DMSO 5%	0,119	±	0,001	0,160	±	0,001	0,266	±	0,001				0,043	±	0,000	0,144	±	0,001	0,216	±	0,005	0,267	±	0,004
DMSO 10%	0,188	±	0,008	0,268	±	0,001							0,099	±	0,006	0,180	±	0,004	0,266	±	0,005			
velocidade máxima específica de crescimento (μ _{max} [d ⁻¹]))) foi calculada pelo gráfico ln(X) x t.																								

velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\max}$ [d⁻¹]) foi calculada pelo gráfico ln(X) x t.

Tabela 29: Velocidades específicas de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* após armazenagem em ultrafreezer nos tempos avaliados.

Cinética zero =0.269 d ⁻¹														
Tempo de armazenagem		180 dias (d ⁻¹)								270 dias (d ⁻¹)				
Nº de repiques		1	2	3	4					1	2			
Glicerol 5%		0,094 ± 0,001	0,147 ± 0,012	0,228 ± 0,003	0,269 ± 0,007					0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000			
Glicerol 10%		0,235 ± 0,005	0,268 ± 0,009							0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000			
Metanol 5%		0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000						0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000			
Metanol 10%		0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000						0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000			
DMSO 5%		0,043 ± 0,002	0,144 ± 0,005	0,216 ± 0,008	0,267 ± 0,002					0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000			
DMSO 10%		0,180 ± 0,009	0,266 ± 0,009							0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000			

velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\max}$ [d⁻¹]) foi calculada pelo gráfico ln(X) x t.

Os resultados mostram que após 270 dias de armazenamento no ultrafreezer nenhum criopreservante consegue preservar a microalga nas condições de armazenamento estabelecidas, no entanto foi evidenciado que para um armazenamento de até 180 dias pode-se utilizar, para a *C. vulgaris*, glicerol ou DMSO na concentração de 10% como criopreservante. Eles apresentaram os melhores resultados para 180 dias de armazenagem, necessitando de apenas 2 repiques para que a velocidade específica de crescimento voltasse à velocidade inicial de crescimento, reportada na cinética zero. Resultados similares foram reportados por Fenwick e Day (1992) para a *Tetraselmis suecica*, onde foram estudadas diferentes concentrações de metanol, glicerol e DMSO; os resultados mostraram que o glicerol e DMSO numa concentração de 10% (m/v) foram os criopreservantes menos tóxicos para a microalga (Fenwick e Day, 1992).

Outros estudos com glicerol, metanol e DMSO como criopreservantes da *Euglena gracilis* mostraram que o melhor crioprotetor foi o glicerol, (Morris, 1981), e estudos para a *Chlorella* mostraram que o metanol, glicerol e DMSO foram tóxicos para as células em concentrações maiores a 2,5% (m/v) após 60 dias de armazenagem (Morris, 1976; Zdenek, 2003).

Foi reportado que a *Chlorella emersonii* não conseguiu ser criopreservada a -196 °C; sendo a porcentagem de recuperação das células igual a zero; a sobrevivência celular foi afetada no processo de congelamento, descongelamento e de adição de compostos protetores (Morris, 1981).

A sobrevivência de algas em processos de criopreservação depende do grau de ocorrência de danos nas células durante os processos de congelamento e descongelamento, isso se encontra fortemente ligado com a taxa de congelamento, tipo de cultivo, criopreservante e tempo de armazenamento (Fenwick e Day, 1992). Os efeitos tóxicos gerados pelos crioprotetores podem ser de dois tipos: osmóticos e bioquímicos; os osmóticos como é o caso do glicerol, incluem a desidratação da célula e posterior absorção de aditivos com menor permeabilidade produzindo a morte da célula (Morris, 1981).

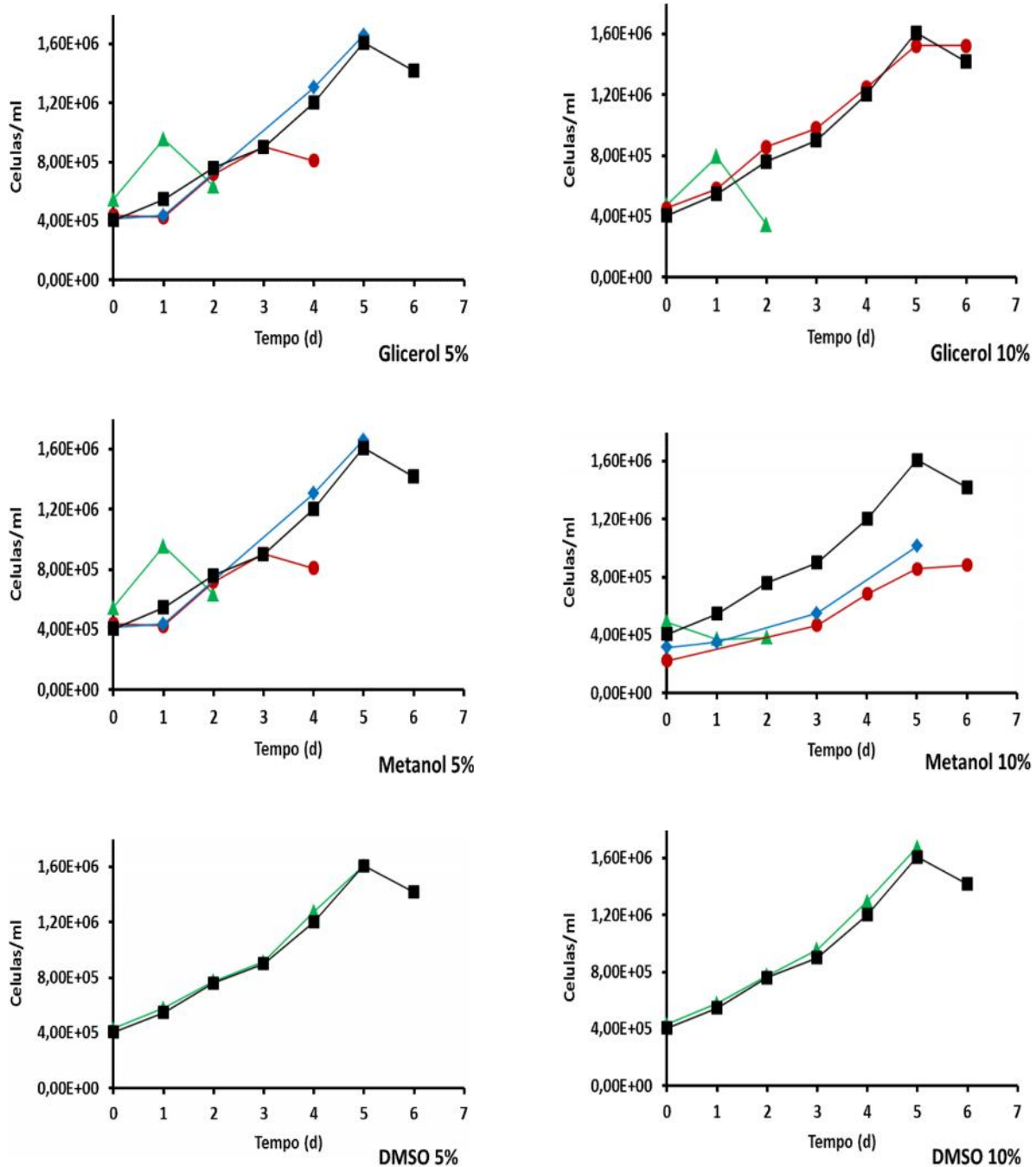


Figura 28: Perfis de crescimento da *Chlorella vulgaris* após de 15 dias de armazenagem no ultrafreezer empregando diferentes criopreservantes. Cinética zero (■), primeiro repique (▲), segundo repique (●), terceiro repique (◆).

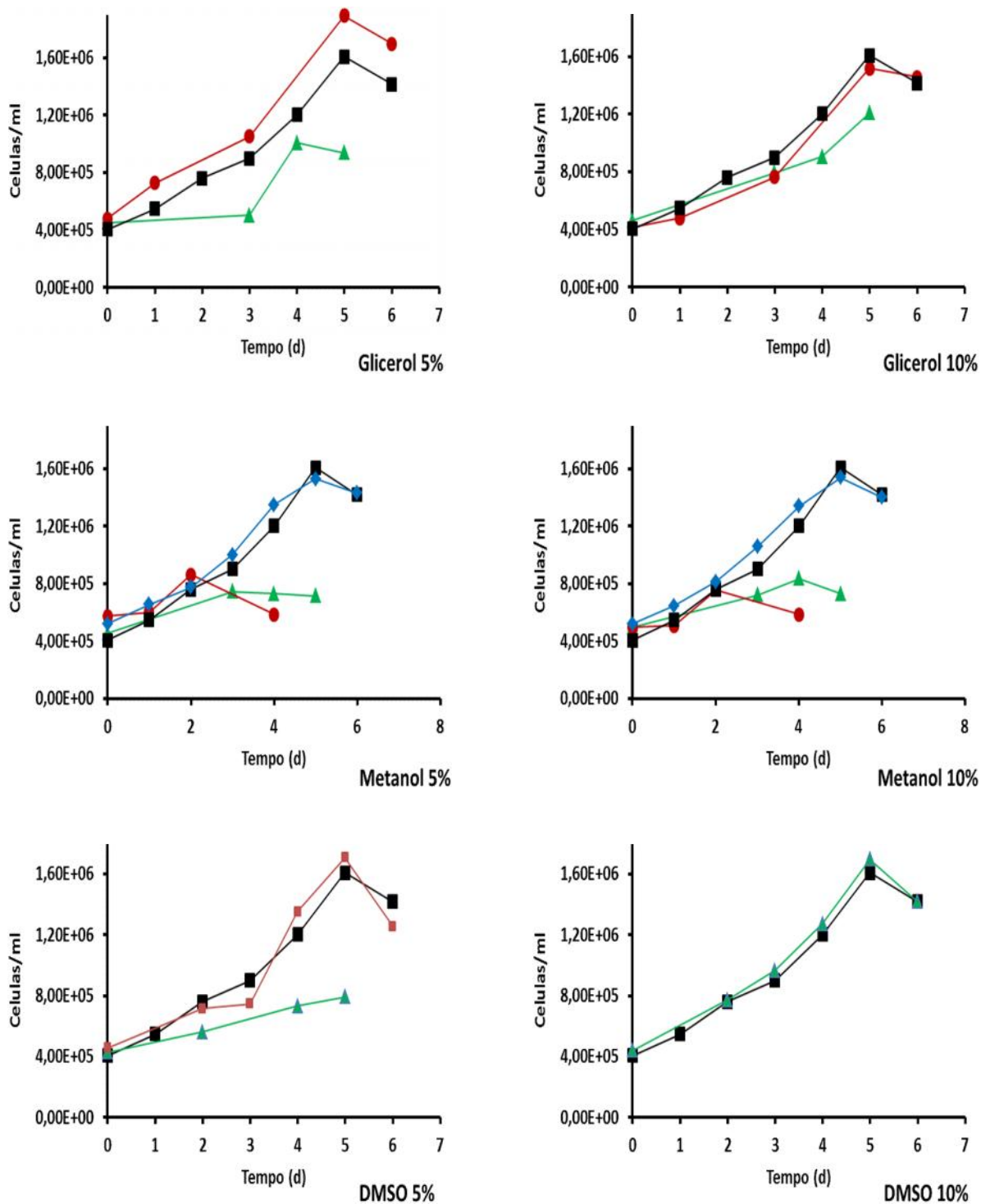


Figura 29: Perfis de crescimento da *Chlorella vulgaris* após de 30 dias de armazenagem no ultrafreezer empregando diferentes criopreservantes. Cinética zero (■), primeiro repique (▲), segundo repique (●), terceiro repique (◆).

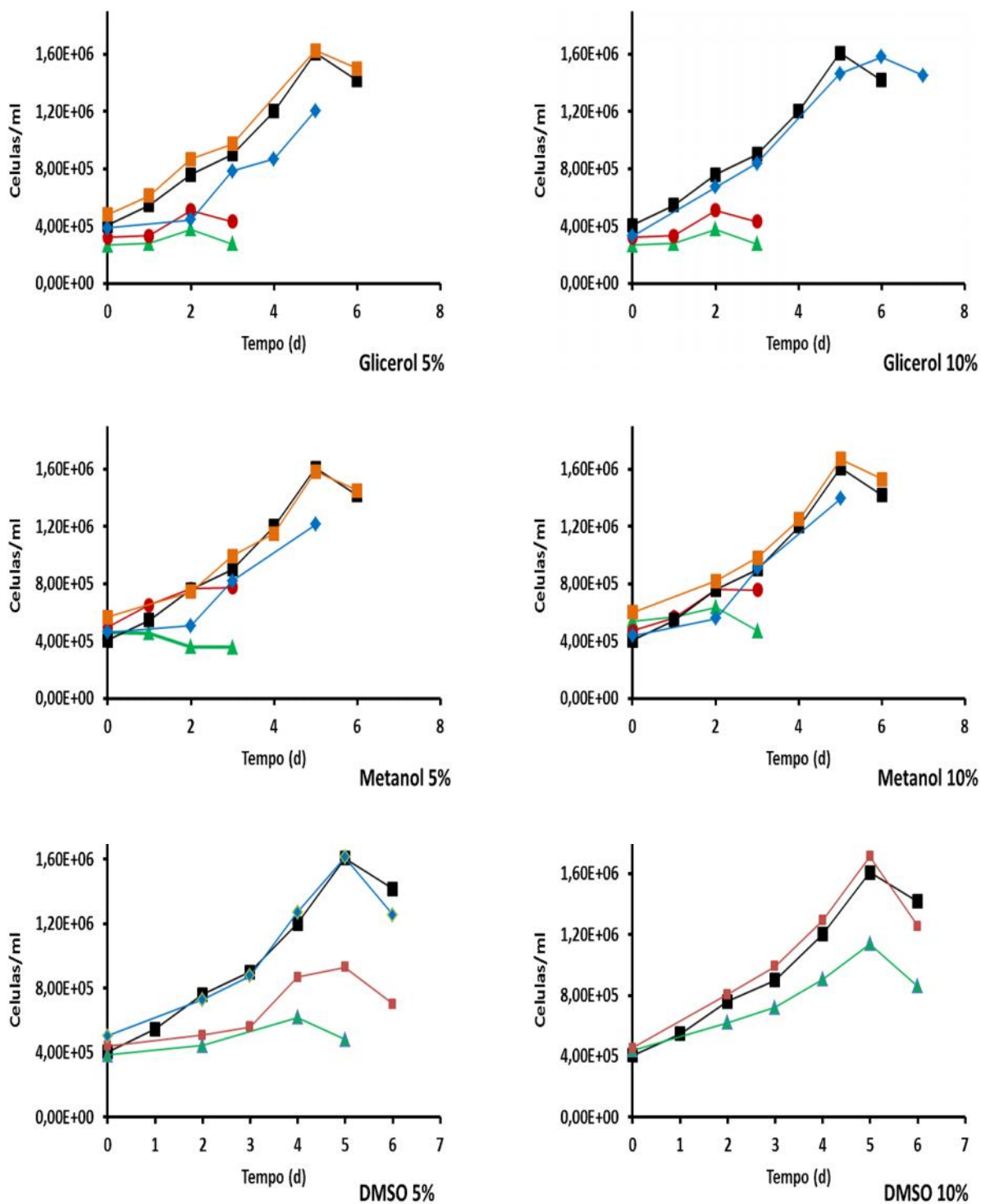


Figura 30: Perfis de crescimento da *Chlorella vulgaris* após de 60 dias de armazenagem no ultrafreezer empregando diferentes criopreservantes. Cinética zero (■), primeiro repique (▲), segundo repique (●), terceiro repique (◆), quarto repique (■).

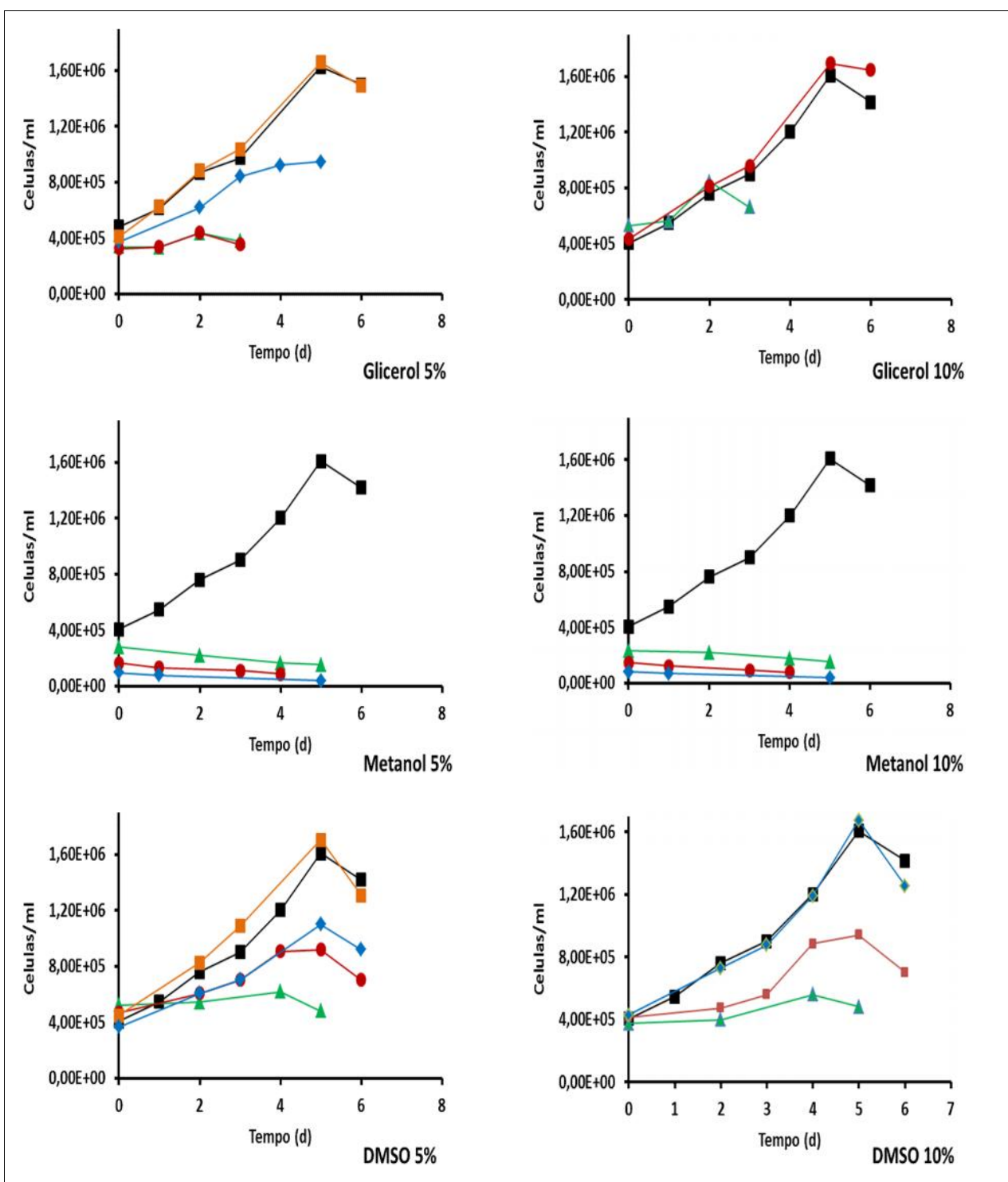


Figura 31: Perfis de crescimento da *Chlorella vulgaris* após de 90 dias de armazenagem no ultrafreezer empregando diferentes criopreservantes. Cinética zero (■), primeiro repique (▲), segundo repique (●), terceiro repique (◆), quarto repique (◼).

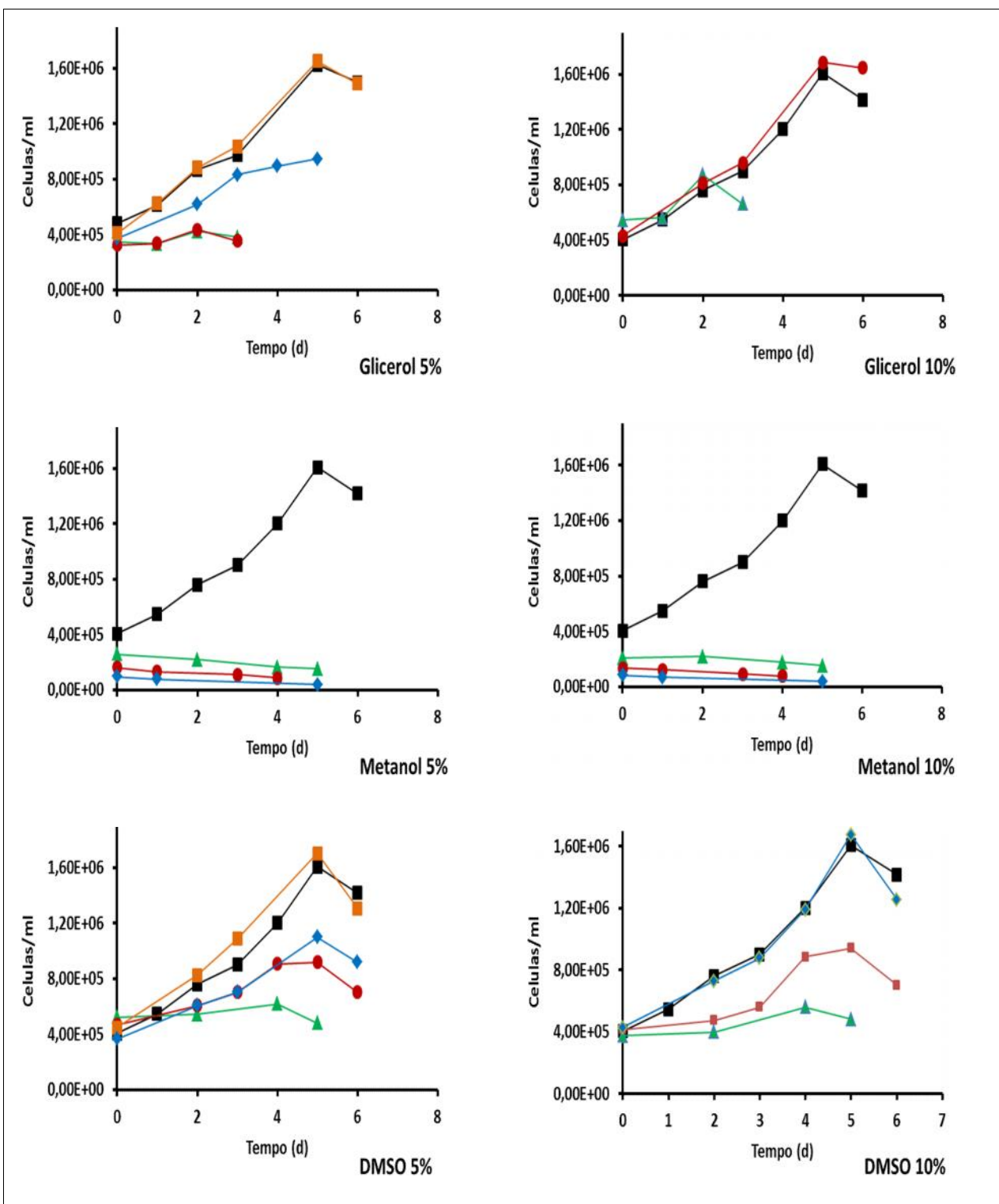


Figura 32: Perfis de crescimento da *Chlorella vulgaris* após de 180 dias de armazenagem no ultrafreezer empregando diferentes criopreservantes. Cinética zero (■), primeiro repique (▲), segundo repique (●), terceiro repique (◆), quarto repique (◻).

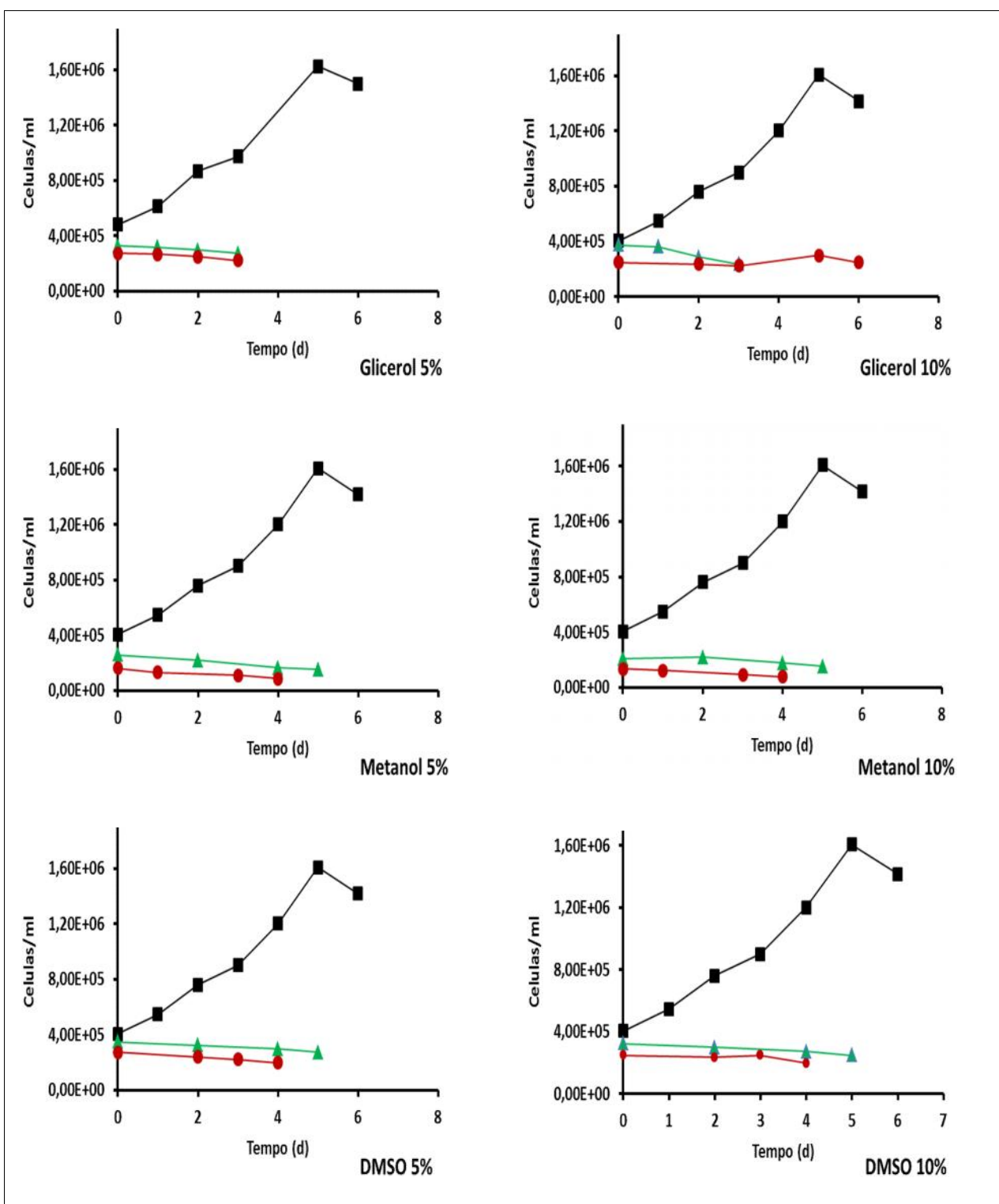


Figura 33: Perfis de crescimento da *Chlorella vulgaris* após de 270 dias de armazenagem no ultrafreezer empregando diferentes criopreservantes. Cinética zero (■), primeiro repique (▲), segundo repique (●).

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Constatou-se que a microalga *Chlorella vulgaris* CPCC90 não metaboliza o glicerol, a sacarose e a frutose.

A utilização da sacarose hidrolisada promoveu máximos valores de concentração celular, pH e produtividade ($5,3 \text{ g.L}^{-1}$; 8,80 e $0,040 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente) na concentração de 20 g.L^{-1} em 122 horas de cultivo. O valor máximo de velocidade específica de crescimento e o menor de tempo de geração foram obtidos no experimento contendo inicialmente 2 g.L^{-1} de sacarose hidrolisada ($0,031 \text{ h}^{-1}$ e 22 h^{-1} , respectivamente).

A constante de inibição (K_i) para o meio de cultivo contendo frutose foi de $4,36 \text{ g.L}^{-1}$ de frutose, ou seja, acima desse valor a frutose afeta negativamente o crescimento da microalga.

Em regime de batelada alimentada, empregando-se 20 g.L^{-1} de sacarose hidrolisada as velocidades específicas de crescimento foram próximas as reportadas em incubadora rotatória ($0,0251 \pm 0,0004 \text{ h}^{-1}$), atingindo uma concentração celular de $18,37 \text{ g.L}^{-1}$ em 192,6 horas de cultivo e uma porcentagem de lipídeos de 23,77%.

O uso do melaço de cana hidrolisado promoveu os máximos valores de concentração celular, pH e produtividade ($3,92 \text{ g.L}^{-1}$; 8,55 e $0,059 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente) obtidos em 60 horas de cultivo contendo inicialmente 30 g.L^{-1} de melaço de cana hidrolisado. A máxima velocidade específica de crescimento e o mínimo tempo de geração foram $0,0515 \text{ h}^{-1}$ e $13,46 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, tendo sido alcançados no experimento com 5 g.L^{-1} de melaço de cana hidrolisado. O fator de conversão de substrato em células foi maior para a concentração de 15 g.L^{-1} de melaço de cana hidrolisado ($0,551 \text{ g/g}$) com uma velocidade específica de crescimento de $0,0504 \text{ h}^{-1}$. Acima da concentração de 25 g.L^{-1} de melaço de cana hidrolisado a velocidade específica de crescimento diminuiu significativamente, passando de $0,0464$

h^{-1} a $0,0365 \text{ h}^{-1}$. Em regime de batelada alimentada foi evidenciado o aumento da velocidade específica de crescimento após as duas alimentações realizadas de $0,0512 \text{ h}^{-1}$ até $0,0644 \text{ h}^{-1}$. No entanto, a porcentagem de lipídeos foi menor que a obtida com sacarose hidrolisada (10,72 %), o que indica que o melaço de cana promove o crescimento da microalga e, possivelmente, a produção de proteína ou carboidrato na célula.

Em termos de armazenagem no ultrafreezer da microalga *C. vulgaris* foi evidenciado que a microalga não consegue ser preservada por períodos maiores de 270 dias. No entanto, para tempos menores, como 180 dias, pode-se utilizar o glicerol 10% ou DMSO 10%, os dois crioprotetores conseguem criopreservar a microalga, necessitando apenas dois repiques para que a microalga volte a velocidade normal de crescimento, reportada na cinética zero (cinética de crescimento da microalga sem ser armazenada no ultrafreezer).

Trabalhos futuros

Realizar cultivo em regime contínuo para a *Chlorella vulgaris* empregando melaço de cana como fonte de carbono orgânico, visando otimizar os resultados obtidos neste trabalho.

Avaliar a possibilidade de utilização do melaço de cana como meio de cultura sem adição de sais no meio.

Caracterização dos ácidos graxos obtidos através dos diferentes substratos empregados no cultivo da *Chlorella vulgaris*.

Realizar estudos com outras microalgas com alto potencial lipídico empregando resíduos agroindustriais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELIOVICH, A. A., S; BECKER, W; BEN-AMOTZ, A; BENEMANN, J; YONGHONG, **B**; BLACKBURN, S; BOUSSIBA, S; CYSEWSKI, G; ACIEN, F; MOLINA, E; GROBBELAAR, J; DANXIANG, H; HAREL, M; ZHENG YU, H; IWAMOTO, H; JONES, I; KAPLAN, D; KOBLIČEK, M; LORENZ, T; MASOJÍDEK, J; ROBLES, A; MULLER, A; PLACE, A; HU, Q; HE, Q; RICHMOND, A; RODOLFI, L; RODOLFI, P; SHEN, H; SKULBERG, O; SOEDER, C; TOMASELLI, L; TORZILLO, G; TREDICI, M; VERMAAS, W; VONSHAK, A; LEE, L; ZARITSKY, A; ZITTELLI, G; ZMORA, O. **Handbook of Microalgal culture. Biotechnology and Applied Phycology**. 2004.

ABOU-SHANAB, R. A. I. et al. Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3079-3085, 2011.

ALMEIDA, J. J., O. CULTIVO MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Dunaliella salina*, UTILIZANDO O MELAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE ALTERNATIVA DE CARBONO. I **Congresso Baiano de Engenharia Sanitária e Ambiental - I COBESA**, 2010.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3402-3410, 2011.

ANDERSEN, R. A. <**Algal Culturing techniques.pdf**>. 2005.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, n. 1–4, p. 130-134, 2007.

BLIGH, E. G. A. D., W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BRASIL. **Resolução ANP n. 7, de 19 de março de 2008**. . Diário Oficial da União. Brasília, DF. 2008.

CANAKCI M, S. H. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. **Journal Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, p. 431-441, 2008.

CHEIRSILP, B.; SUWANNARAT, W.; NIYOMDECHA, R. Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. **N Biotechnol**, v. 28, n. 4, p. 362-8, Jul 2011.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends Biotechnol**, v. 14, n. 11, p. 421-426, 1996.

CHEN, F. J., M.R. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. **Journal Applied Phycology**, v. 3, p. 203-209, 1991.

CHI, Z. et al. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1537-1545, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnol Adv**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

_____. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.

CHISTI, Y.; YAN, J. Energy from algae: Current status and future trends: Algal biofuels – A status report. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3277-3279, 2011.

DORAN PAULINE, M. **Bioprocess Engineering Principles**. San Diego: Academic Press INC, 1995.

ETHIER, S. et al. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 1, p. 88-93, 2011.

FAJARDO, E. S., S. **Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 24-25 (Microbiología Industrial). Facultad de Ciencias Básicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 1, p. 101-5, Jan 2011.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 1, p. 101-105, 2011.

FENWICK, C.; DAY, J. Cryopreservation of *Tetraselmis suecica* cultured under different nutrients regimes. **J Appl Phycol**, v. 4, n. 2, p. 105-109, 1992.

GAO, C. et al. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. **Applied Energy**, v. 87, n. 3, p. 756-761, 2010.

GODBOLE, J. Ethanol from cane molasses, Fuel Ethanol Workshop, Honolulu, Hawaii, November 14, 2002. 2002.

GORDILLO, F. J. L. G., M.; FIGUEROA, F.L.; NIELL, F.X. Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. **Journal Applied Phycology**, v. 10, p. 135-144, 1998.

GRESSEL, J. Transgenics are imperative for biofuel crops. **Plant Science**, v. 174, n. 3, p. 246-263, 2008.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 162, n. 7, p. 1978-95, Nov 2010.

HUANG, C. et al. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. **Bioresour Technol**, v. 100, n. 19, p. 4535-4538, 2009.

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 38-46, 2010.

HUANG, L. et al. Effects of three main sugars in cane molasses on the production of butyric acid with *Clostridium tyrobutyricum*. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 12, p. 2312-2315, Dec 2011.

JANE M, M. **Problem Solving in Biochemistry. A Practical Approach**. New York: 1998.

JOHNSON, D. T., TACONI, K.A., . The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environ.** , v. 26, p. 338–348, 2007.

KESSLER, E. Physiological and Biochemical Contributions to the Taxonomy of the Genus *Prototheca*

III. Utilization of Organic Carbon and Nitrogen Compounds. **Arch Microbiol**, v. 123, p. 103-106, 1982.

LAM, M. K.; LEE, K. T. Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Applied Energy**, v. 94, n. 0, p. 303-308, 2012.

LEE, H. S.; PARK, H. J.; KIM, M. K. Effect of *Chlorella vulgaris* on lipid metabolism in Wistar rats fed high fat diet. **Nutr Res Pract**, v. 2, n. 4, p. 204-10, Winter 2008.

LEE, J. Y. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresour Technol**, v. 101 Suppl 1, p. S75-7, Jan 2010.

LEESING, R. K., S. **Heterotrophic growth of *Chlorella* sp. KKU-S2 for lipid production using molasses as a carbon substrate.** International conference on food engineering and biotechnology. singapur 2011.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnol Lett**, v. 31, n. 7, p. 1043-9, Jul 2009.

LIU, J. et al. Production potential of *Chlorella zofingienesis* as a feedstock for biodiesel. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 22, p. 8658-63, Nov 2010.

LIU, J. et al. Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingienensis*. **Bioresour Technol**, v. 107, n. 0, p. 393-398, 2012.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações.** São Carlos, SP: Rima Editora, 2007.

LOZANO, J. G., CASCALES; GARCÍA-BORRÓN, MARTÍNEZ; JH, MARTÍNEZ; PEÑALIEL, GARCIA. **Bioquímica y Biología Molecular: para ciencias de la salud**. 2000.

MENG, X.; CHEN, G.; WANG, Y. Biodiesel production from waste cooking oil via alkali catalyst and its engine test. **Fuel Processing Technology**, v. 89, n. 9, p. 851-857, 2008.

MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresour Technol**, v. 97, n. 6, p. 841-6, Apr 2006.

MITRA, D.; VAN LEEUWEN, J.; LAMSAL, B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, v. 1, n. 1, p. 40-48, 2012.

MORGAN, C. A. H., N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of micro-organisms by drying – A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 183-193, 2006a.

_____. Preservation of micro-organisms by drying – A review. **J Microbiol Methods**, v. 66, p. 183-193, 2006b.

MOROWVAT, M. H.; RASOUL-AMINI, S.; GHASEMI, Y. *Chlamydomonas* as a “new” organism for biodiesel production. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 6, p. 2059-2062, 2010.

MORRIS, G. J. The criopreservation of *Chlorella*. 1. Interactions of rate of cooling protective additive and warming rate. **Microbiology**, v. 107, p. 57-62, 1976.

_____. **Criopreservation. An introduction to cryopreservation in culture collection**. Institute of Terrestrial Ecology: 1981.

NARAYAN M, M. G., VATCHRAVELU K, BHAGYALAKSHMI N, MAHADEVASWAMY M., of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *Spirulina platensis*. **Int J Food Sci Nutr**, v. 56, p. 521–8, 2005.

NELSON, N. A. **J.Biol.Chem**, p. 375, 1944.

NI, B. J. et al. Heterotrophs grown on the soluble microbial products (SMP) released by autotrophs are responsible for the nitrogen loss in nitrifying granular sludge. **Biotechnol Bioeng**, Jun 23 2011.

OETTERER, M. E. A. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. . 2006.

OLGUÍN, E. J. et al. Constructed wetland mesocosms for the treatment of diluted sugarcane molasses stillage from ethanol production using *Pontederia sagittata*. **Water Res**, v. 42, n. 14, p. 3659-3666, 2008.

ORÚS, M. I.; MARCO, E.; MARTÍNEZ, F. Suitability of *Chlorella vulgaris* UAM 101 for heterotrophic biomass production. **Bioresour Technol**, v. 38, n. 2-3, p. 179-184, 1991.

PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011a.

_____. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Res**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011b.

PRONINA, N., ROGOVA, NB, FURNADZHIEVA, S, KLYACHKO-GURVICH, GL. Effect of CO₂ concentration on the fatty acid composition of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii* cia-3, a mutant deficient in CO₂ -concentrating mechanism. **Russian J Plant Physiol**, v. 45, p. 447-455, 1998.

PULZ, O. G., WOLFGANF. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 65, p. 635-648, 2004.

R., B. R. O. S. V. M. M. D. C. S. F. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. v.36, n. n6, p. 1959-1967, 2006.

RATLEDGE, C. **Biotechnology of oils and fats, Microbial lipids**. London: Academic Press: Ratledge, C.; Wilkinson, S.G., editors, 1989.

REVSBECK, N. P. J., B.B.; BLACKBURN, T.H.; COHEN, Y. Microelectrode studies of the photosynthesis and O₂, H₂S and pH profiles in microbial mats. **Limnology and Oceanography**, v. 28, p. 1062-1074, 1983.

RODRIGUES F; PINOTTI, B., J; RIBEIRO, M. CULTIVO SEMI-CONTÍNUO DE *NOSTOC SP* EM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. **XI Encontro Anual de Iniciação Científica XI** 2002.

RODRIGUES, M. V. N. R., R.A.F.; SERRA, G.E.; ANDRIETTA, S.R.; FRANCO, T.T. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 2-15, 2000.

RUPPRECHT, J. From systems biology to fuel—*Chlamydomonas reinhardtii* as a model for a systems biology approach to improve biohydrogen production. **J Biotechnol**, v. 142, n. 1, p. 10-20, 2009.

SATYAWALI, Y.; BALAKRISHNAN, M. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. **J Environ Manage**, v. 86, n. 3, p. 481-497, 2008.

SAWAYAMA, S. et al. CO₂ fixation and oil production through microalga. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6-9, p. 729-731, 1995.

SCHMIDT, R. A.; WIEBE, M. G.; ERIKSEN, N. T. Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyaninproducing red alga *Galdieria sulphuraria*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 90, p. 77-84, 2005.

SHEN, Y. et al. Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 160, n. 6, p. 1674-84, Mar 2010.

SHI, X.; ZHANG, X.; CHEN, F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. **Enzyme Microb Technol**, v. 27, n. 3-5, p. 312-318, Aug 1 2000.

SMITH, V. H. et al. The ecology of algal biodiesel production. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 5, p. 301-309, 2010.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. 107 (Mestre em ciências - Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia molecular, Universidade Federal do Paraná

SONG, D.; FU, J.; SHI, D. Exploitation of Oil-bearing Microalgae for Biodiesel. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 341-348, 2008.

SPRINGER, M. F., H.; PULZ, O. Increase of the content of polyunsaturated fatty acids in *Porphyridium cruentum* by low-temperature stress and acetate supply. **Journal Plant Physiology**, v. 143, p. 534-537, 1994.

STEIN, J. **Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements.** . 1973.

SUN, N. et al. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1288-1292, 2008.

TAN, C. K. J., M.R. Screening of diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production. **Journal Applied Phycology**, v. 8, p. 59-64, 1996.

TANG, S., BOEHME, L., LAM, H., ZHANG, Z.,. *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. **Biochem Eng J**, v. 43, p. 157–162, 2009.

VALDUGA, E. V., A; TREICHEL, H; DI LUCCIO M. Pré-tratamentos de melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1860-1866, 2007.

VAZHAPPILLY, R. C., F. . Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 75, p. 393-397, 1998.

VIDOTTI, A. **Cultivo heterotrófico axênico de *Chlorella vulgaris*: inibição por substrato.** 2012. Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas

WAKE, L. V.; HILLEN, L. W. Study of a “bloom” of the oil-rich alga *Botryococcus braunii* in the Darwin River Reservoir. **Biotechnol Bioeng**, v. 22, n. 8, p. 1637-1656, 1980.

WEN, Z. Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnol Adv**, v. 21, n. 4, p. 273-94, Jul 2003.

XIONG, W. et al. Double CO₂ fixation in photosynthesis-fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2287-2293, 2010.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **J Biotechnol**, v. 126, n. 4, p. 499-507, Dec 1 2006.

YAN, D. et al. Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 11, p. 6487-6493, 2011.

YAN, D. et al. Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 11, p. 6487-93, Jun 2011.

YEH, K.-L.; CHANG, J.-S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresour Technol**, v. 105, n. 0, p. 120-127, 2012.

YEH, K.-L.; CHEN, C.-Y.; CHANG, J.-S. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. **Biochem Eng J**, v. 64, n. 0, p. 1-7, 2012a.

_____. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. **Biochem Eng J**, n. 0, 2012b.

ZDENEK, H. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, n. 3, p. 205-229, 2003.