IUNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Cultivo descontínuo alimentado de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em reator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO₂ puro ou proveniente de fermentação alcoólica

Raquel Pedrosa Bezerra

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadores:

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de
Carvalho

Prof. Dr. Attilio Converti

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bezerra, Raquel Pedrosa
B574c Cultivo descontínuo alimentado de *Arthrospira* (Spirulina)
platensis em reator tubular utilizando uréia como fonte de
nitrogênio e CO₂ puro ou proveniente de fermentação alcoólica /
Raquel Pedrosa Bezerra. -- São Paulo, 2010.
180p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico- Farmacêutica.

Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de

1. Biotecnologia 2. Bioenergética I. T. II. Carvalho, João
Carlos Monteiro de, orientador.

620.8 CDD

Raquel Pedrosa Bezerra

Cultivo descontínuo alimentado de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em reator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO₂ puro ou proveniente de fermentação alcoólica

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de doutor

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
orientador/presidente

Prof. Dr. Attilio Converti
Co-orientador

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

São Paulo, de de 2011.

À minha família que é a alegria da minha vida e me incentiva a seguir esse caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho pela orientação, dedicação, confiança, amizade, incentivo e paciência que recebi durante os 6 anos de convivência no laboratório.

Ao Prof Dr. Attilio Converti pela orientação, apoio e confiança, principalmente durante minha estadia na Itália.

Ao Prof. Dr. Sunao Sato, chefe do setor de Tecnologia de Fermentações, do Departamento Bioquímico-Farmacêutica da Universidade de São Paulo-Brasil.

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior, Profa. Dr. Ana Lúcia Figueiredo Porto, e Prof. Dr. Adilson de Castro Chaves pela indicação do laboratório e confiança depositada em meu trabalho.

À FAPESP pelo auxílio financeiro que permitiu a execução desse trabalho.

À CAPES pela oportunidade de realizar o doutorado sanduiche na Itália, contribuindo para meu desenvolvimento pessoal e científico.

Aos meus pais, Irene V. P. Bezerra e Adesson P. Bezerra, a minha irmã, ao meu cunhado, e ao meu namorado, Paulo Claudino Vêras, pelo incentivo, apoio, confiança e felicidade durante todo esse tempo.

Aos meus amigos pernambucanos, Fernanda Borba, Eduardo Correia, Anne Priscila Crócia e Anabel Helena que mesmo distante sempre me incentivaram e a minha amiga Célia Bolognesi pelos conselhos e palavras de conforto nos momentos difíceis.

A todos os amigos, Livia Seno, Cínthia Hoch, Ana Morocho, Mayla Rodrigues, pelo apoio e carinho que me proporcionou durante a pós-graduação, e em especial a Marcelo Chuei Matsudo.

As secretárias da pós-graduação do Deptº. de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico (FCF-USP) pela dedicação, apoio e por estarem sempre disponível para ajudar e aos secretários da pós-graduação, Elaine Midori Ychico e Jorge Alves de Lima.

Aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas, pela atenção e disponibilidade de ajuda sempre que precisei.

RESUMO

A cianobactéria fotossintetizante *Arthrospira platensis* é conhecida por apresentar em sua biomassa altos teores protéicos (50-70%), presença do ácido graxo essencial γ -linolênico e diversas outras substâncias importantes para a alimentação humana e animal. Esses micro-organismos são capazes de converter o CO_2 em biomassa de grande potencial na área de alimentos. Durante a fermentação alcoólica, a produção de CO_2 é da mesma ordem de grandeza da produção de etanol e, considerando a crescente demanda interna e externa por esse combustível, seria importante que houvesse um processo que fixasse esse CO_2 , transformando-o em um produto que poderia ser útil para a nossa população. Adicionalmente, o uso de uma fonte de nitrogênio de baixo custo (uréia) em reatores tubulares contribuiria para a redução do custo de produção da *A. platensis*. O objetivo desse trabalho foi avaliar os parâmetros cinéticos e bioenergéticos, bem como a composição centesimal da *A. platensis* cultivadas em biorreator tubular, alimentados com CO_2 proveniente de fermentação alcoólica ou com utilização de CO_2 puro, para o controle do pH, sob diferentes intensidades luminosas (I) e fontes de nitrogênio (N) adicionadas por meio de processo descontínuo alimentado. Os resultados mostraram que maiores valores de I proporcionaram maiores valores de concentração celular máxima (X_m) e produtividade em células (P_x), mas não influenciaram nos valores do fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$). As diferentes fontes de CO_2 não influenciaram nos valores de X_m , P_x , $Y_{X/N}$. O uso da uréia aumentou os valores de $Y_{X/N}$ em relação aos cultivos com NO_3^- . Na composição centesimal, pode-se observar que I influenciou nos teores de clorofila, proteínas e lipídios, mas não influenciou nos teores de cinzas e carboidratos na biomassa final. Em relação aos parâmetros bioenergéticos dos cultivos com CO_2 puro, observou-se que os maiores valores de dissipação de energia de Gibbs foram obtidos em tempos mais curtos a $120\text{-}240 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, independentemente do N selecionado, enquanto que o número de moles de fótons absorvidos pelas células para produzir um C-mol de biomassa foi maior nas culturas com NO_3^- , independentemente do I. As frações da energia direcionada para a síntese de ATP e fixada pela célula foram superiores em culturas com uréia quando comparadas com as culturas com NO_3^- , que se revelou uma fonte de nitrogênio capaz de sustentar o crescimento energeticamente da *A. platensis*.

Palavras chaves: *Arthrospira platensis*, processo descontínuo alimentado, uréia, intensidade luminosa, dióxido de carbono, fermentação alcoólica, bioenergética.

ABSTRACT

Photosynthetic cyanobacterium *A. platensis* contains in its biomass high protein content (50-70%), γ -linolenic acid and many other substances important for health human. These microorganisms are capable of converting CO₂ into biomass of great potential in the food industry. During the alcoholic fermentation, the production of CO₂ has the same magnitude of the production of ethanol. Considering the increasingly global demand for this fuel, a process to fix this CO₂ is of utmost importance. Furthermore, the use of low cost nitrogen source (urea) in tubular reactors would contribute to reducing the production cost of *A. platensis*. Therefore, the purpose of this work was to evaluate the kinetic and bioenergetics parameters, as well as the chemical composition of biomass obtained in *A. platensis* cultures in tubular bioreactor using CO₂ from alcoholic fermentation or pure CO₂ to control the pH under different light intensity (I) and nitrogen sources (N). The results showed that higher I induced higher maximum cell concentration (X_m) and cell productivity (P_x) values, but it did not exert any influence on the nitrogen-cell conversion factor (Y_{X/N}). Urea increased the Y_{X/N} values compared to use of NO₃⁻. In the centesimal composition of biomass, it can be observed that I influenced the chlorophyll, protein, and lipid contents, but not influenced the carbohydrate and ash contents. For bioenergetics parameters, it was observed that the highest Gibbs energy dissipation values for cell growth and maintenance were obtained in shorter time at 120-240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in both nitrogen sources, while the moles of photons absorbed by the system to produce one C-mol biomass was higher in cultures with NO₃⁻. The highest values of the molar production of O₂ and consumption of H⁺ were obtained at the highest I values, using NO₃⁻. The estimated percentages of the energy absorbed by the cell showed that, compared with nitrate, the use of urea as nitrogen source allowed the system to address higher fractions to ATP production and light fixation by the photosynthetic apparatus, as well as a lower fraction released as heat. Thanks to this better bioenergetic situation, urea appears to be a quite promising low-cost, alternative nitrogen source for *A. platensis* cultures in photobioreactors.

Key words: *Arthrospira platensis*, fed batch, urea, light intensity, carbon dioxide, alcoholic fermentation, bioenergetic..

RIASSUNTO

Il cianobatterio fotosintetico *Arthrospira platensis* ha un alto contenuto di proteine (50-70%), presenza di acidi grassi essenziali come l'acido γ -linolenico e altre sostanze importanti per l'alimentazione umana ed animale. Questi microrganismi convertono CO_2 in biomassa di grande potenzialità nell'industria alimentare. Durante la fermentazione alcolica, la produzione di CO_2 è dello stesso ordine di grandezza della produzione di etanolo, e in considerazione alla crescente necessità interna ed europea per questo combustibile, sarebbe importante lo sviluppo di un processo che fissasse questo CO_2 , trasformandolo in un prodotto che potrebbe essere utile per la nostra popolazione. Inoltre, l'uso di una fonte di azoto a basso costo (urea) in reattori tubolari contribuirebbe a ridurre il costo di produzione di *A. platensis*. L'obiettivo di questo studio è di valutare i parametri cinetici, bioenergetici e la composizione della biomassa ottenuta in colture di *A. platensis* in bioreattori tubolare, alimentato con CO_2 puro di cilindro o con CO_2 della fermentazione alcolica per il controllo del pH in diverse intensità di luce (I) e fonti di azoto (N) usando il processo discontinuo alimentato. I risultati hanno dimostrato che valori più alti di I fornire i più alti valori di concentrazione massima delle cellule (X_m) e la produttività delle cellule (P_x), ma non influenza i valori del fattore di conversione di azoto nelle cellule ($Y_{X/N}$). L'uso di urea come fonte di azoto aumentato i valori di $Y_{X/N}$, rispetto alle colture con NO_3^- . La composizione chimica di biomassa, può osservare che I ha influenzato la percentuale di clorofilla, proteine e lipidi, ma non ha influenzato la percentuale di carboidrati e cenere nella biomassa finale. In relazioni ai parametri bioenergetici dei coltivati usando CO_2 di cilindri, abbiamo osservato che i più alti valori di dissipazione di energia di Gibbs per la crescita cellulare e la manutenzione sono stati ottenuti in tempo più brevi nel 120-240 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, per entrambe le fonti di N, mentre il numero di moli di fotoni assorbiti dalle cellule per produrre una biomassa C-mol era maggiore nelle colture con NO_3^- , a prescindere dalla I. I valori più alti della produzione molare di O_2 e il consumo di H^+ sono stati ottenuti con valori più alti di I, coltivati con NO_3^- . Le frazioni di energia per la sintesi di ATP e fissato per la cellula erano più alti nelle colture con urea che nelle colture con NO_3^- , che si è rivelata una fonte di azoto in grado di sostenere la crescita di *A. platensis*.

Parole chiave: *Arthrospira platensis*, processo discontinuo alimentato, urea, intensità luminosa, anidride carbonica, fermentazione alcolica, bioenergetica.

Lista de gráficos

Gráfico 1. Curva de calibração para determinação da concentração celular de <i>A. platensis</i>	73
Gráfico 2. Curva de calibração para determinação da concentração de amônia	
Gráfico 3. Curva de calibração para determinação de clorofila a	77
Gráfico 4. Logarítmico da concentração celular em função do tempo.....	88
Gráfico 5. Concentração celular no regime permanente (X_P ; ♦), etanol (▲) e açúcar redutor total (ART; ■) para $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$	88
Gráfico 6. Concentração celular no regime permanente (X_P ; ♦), Etanol (▲) e açúcar redutor total (ART; ■) para $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$	89
Gráfico 7. Concentração celular no regime permanente (X_P ; ♦), Etanol (▲) e açúcar redutor total (ART; ■) para $D = 0,025 \text{ h}^{-1}$	89
Gráfico 8. Concentração celular referente ao experimento 1	93
Gráfico 9. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 2 ($60 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).....	94
Gráfico 10. Concentração celular referente ao experimento 2	95
Gráfico 11. Concentração celular referente ao experimento 3	96
Gráfico 12. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao experimento 4 ($120 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).....	97
Gráfico 13. Concentração celular referente ao experimento 4	98
Gráfico 14. Concentração celular referente ao experimento 5.	99
Gráfico 15. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao experimento 6 ($120 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).....	100
Gráfico 16. Concentração celular referente ao experimento 6	101
Gráfico 17. Concentração celular referente ao experimento 7.	102
Gráfico 18. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao experimento 8 ($120 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).....	103
Gráfico 19. Concentração celular referente ao experimento 8	104
Gráfico 20. Concentração celular referente ao experimento 9	105
Gráfico 21. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 10 ($240\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).....	106
Gráfico 22. concentração celular referente ao experimento 10.....	107

Gráfico 23. Concentração celular referente ao experimento 11.....	108
Gráfico 24. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 12 (240 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	109
Gráfico 25. Concentração celular referente ao experimento 12.....	110
Gráfico 26. Energia de Gibbs de dissipação durante o cultivo de <i>A. platensis</i> , intensidade luminosa (μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$): ($\square, \blacksquare$) 60, ($\triangle, \blacktriangle$) 120, ($\diamond, \blacklozenge$) 240; Fonte de nitrogênio: nitrato (símbolo aberto), uréia (símbolo fechado).	144
Gráfico 27. Influência da velocidade específica de crescimento da <i>A. platensis</i> sobre o número de moles de fótons absorvido para produzir 1 C-mol de biomassa em diferentes condições de cultivo: ($\circ$) Composição elementar da biomassa descrita por Cornet <i>et al.</i> (1992), PPFD = 60 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Composição elementar da biomassa determinada experimentalmente, PPFD (μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$): ($\square, \blacksquare$) 60, ($\triangle, \blacktriangle$) 120, ($\diamond, \blacklozenge$) 240. Fonte de nitrogênio: nitrato (símbolos abertos), uréia (símbolos fechados).....	147
Gráfico 28. Produção molar de O_2 (símbolo fechado) e consumo de H^+ (símbolo aberto) em função do tempo em diferentes condições de cultivo: Intensidades luminosas (μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$): ($\square, \blacksquare$) 60, ($\triangle, \blacktriangle$) 120, ($\diamond, \blacklozenge$) 240. Fonte de nitrogênio: nitrato (linha rachurada), uréia (linha contínua).....	149
Gráfico 29. Energia total de Gibbs absorvida pelo aparato fotossintético (símbolo fechado) (ΔG_a) e energia transformada em ATP (símbolo aberto) (ΔG_{ATP}) durante o cultivo da <i>A. platensis</i> , intensidade luminosa (μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$): ($\square, \blacksquare$) 60, ($\blacktriangle, \triangle$) 120, ($\diamond, \blacklozenge$) 240. Fonte de nitrogênio: nitrato (linha tracejada), uréia (linha contínua).....	150
Gráfico 30. Energia fixada pelo aparato fotossintético (símbolo fechado) (ΔH) e energia liberada como calor (símbolo aberto) (Q) durante o cultivo de <i>A. platensis</i> , intensidade luminosa (μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$): ($\square, \blacksquare$) 60, ($\blacktriangle, \triangle$) 120, ($\diamond, \blacklozenge$) 240. Fonte de nitrogênio: nitrato (linha rachurada), uréia (linha contínua).	151
Gráfico 31. Porcentagem na distribuição da energia luminosa absorvida durante o cultivo de <i>A. platensis</i> usando nitrato (símbolo fechado) e uréia (símbolo aberto) como fonte de nitrogênio. Energia fixada pelos fotossistemas ($\diamond, \blacklozenge$), energia transformada em ATP ($\square, \blacksquare$), energia liberada como calor ($\blacktriangle, \triangle$).	152
Gráfico 32. Concentração celular nas duas diferentes configurações dos fotobiorreatores tubulares: ($\blacklozenge$) horizontal e ($\diamond$) espiralado.....	153

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Spirulina platensis</i> (UTEX 1926).	22
Figura 2. Principais rotas de assimilação de nitrogênio em cianobactérias cultivadas em pH acima de 9,2.	35
Figura 3. Complexos fotossintéticos em membranas tilacóides.	42
Figura 4. Representação esquemática do fotossistema.....	43
Figura 5. Representação esquemática da fase fotoquímica.....	44
Figura 6. Representação esquemática da molécula da clorofila a	48
Figura 7. Fotobiorreator tubular horizontal utilizado no cultivo de <i>A. platensis</i>	67
Figura 8. Fotobiorreator tubular espiralado utilizado no cultivo de <i>A. platensis</i>	68

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Produtores representativos de <i>Spirulina</i>	23
Tabela 2 - Planejamento experimental	84
Tabela 3 - Valores da concentração celular, médias e desvio padrão, em massa seca, obtidas a partir do melaço não clarificado e do melaço clarificado	86
Tabela 4 - Variação da concentração de leveduras em função do tempo	87
Tabela 5 - Valores de X_P , ART, Etanol e Rendimento do processo, no regime permanente, para os diferentes valores de D, com ART inicial de 170 g.L ⁻¹	91
Tabela 6 - Valores médios de Concentração celular (X) e concentração de carbonato total referentes ao experimento 1.	93
Tabela 7 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no experimento 2 de acordo com a equação $y = -4,4554x^3 + 54,865x^2 + 143,17x + 400$ (60 μmol de fótons m ⁻² s ⁻¹)	94
Tabela 8 - Valores médios de Concentração celular (X), concentração de carbonato total, amônia total e uréia residual referentes ao experimento 2	95
Tabela 9 - Valores médios de Concentração celular (X) e concentração de carbonato total referentes ao experimento 3.	96
Tabela 10 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no experimento 4 de acordo com a equação $y = -2,0689x^3 + 11,591x^2 + 332,92x + 400$ (60 μmol de fótons m ⁻² s ⁻¹)	97
Tabela 11 - Valores médios de Concentração celular (X), concentração de carbonato total, amônia total e uréia residual referentes ao experimento 4	98
Tabela 12 - Valores médios de Concentração celular (X) e concentração de carbonato total referentes ao experimento 5.	99
Tabela 13 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no experimento 6 de acordo com a equação $y = -13,286x^3 + 144,86x^2 + 62,226x + 400$ (120 μmol de fótons m ⁻² s ⁻¹).....	100
Tabela 14 - Valores médios de Concentração celular (X), concentração de carbonato total, amônia total e uréia residual referentes ao experimento 6.	101
Tabela 15 - Valores médios de Concentração celular (X) e concentração de carbonato total referentes ao experimento 7.	102

Tabela 16 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no experimento 8 de acordo com a $y = -5,8128x^3 + 38,625x^2 + 386,06x + 400$ (120 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	103
Tabela 17 - Valores médios de Concentração celular (X), concentração de carbonato total, amônia total e uréia residual referentes ao experimento 8	104
Tabela 18 - Valores médios de Concentração celular (X) e concentração de carbonato total referentes ao experimento 9.	105
Tabela 19 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no experimento 10 de acordo com a equação $y = -12,057x^3 + 100,82x^2 + 318,99x + 400$ (240 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	106
Tabela 20 - Valores médios de concentração celular (X), concentração de carbonato total, amônia total e uréia residual referentes ao experimento 10.	107
Tabela 21 - Valores médios de Concentração celular (X) e concentração de carbonato total referentes ao experimento 11.	108
Tabela 22 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no experimento 12 de acordo com a equação $y = -8,2763x^3 + 62,437x^2 + 372,65x + 400$ (240 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	109
Tabela 23 - Valores médios de Concentração celular (X), concentração de carbonato total, amônia total e uréia residual referentes ao experimento 12.	110
Tabela 24 - Valores da concentração celular máxima (X _m), produtividade em células (P _x) e fator de conversão de nitrogênio em células (Y _{X/N}) com diferentes fontes de CO ₂ , fontes de nitrogênio e intensidades luminosas	119
Tabela 25 - Análise de variância para a concentração celular máxima.....	120
Tabela 26 - Médias da concentração celular máxima para a variável independente fonte de nitrogênio.....	120
Tabela 27 - Médias da concentração celular máxima para a variável independente intensidade luminosa.....	121
Tabela 28 - Análise de variância para a produtividade em células.....	122
Tabela 29 - Médias da produtividade em células para a variável independente fonte de nitrogênio.....	123
Tabela 30 - Médias da produtividade em células para a variável independente intensidade luminosa.....	123
Tabela 31 - Análise de variância para fator de conversão de nitrogênio em células	126

Tabela 32 - Médias do fator de conversão de nitrogênio em células para a variável independente fonte de nitrogênio	127
Tabela 33 - Médias do fator de conversão de nitrogênio em células para a variável independente intensidade luminosa	128
Tabela 34 - Concentração de clorofila na biomassa final obtida nos experimentos com o pH controlado com CO ₂ de cilindro.	129
Tabela 35 - Análise de variância para a concentração de clorofila na biomassa final.	130
Tabela 36 - Porcentagem de proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas na biomassa seca final.....	134
Tabela 37 - Análise de variância para o teor de proteína na biomassa final	136
Tabela 38 - Médias do teor de proteína na biomassa final para a variável independente intensidade luminosa	136
Tabela 39 - Análise de variância para o teor de lipídio na biomassa seca final.....	138
Tabela 40 - Médias do teor de lipídio na biomassa final para a variável independente fonte de nitrogênio	138
Tabela 41 - Médias do teor de lipídio na biomassa final para a variável independente intensidade luminosa	138
Tabela 42 - Análise de variância para o teor de carboidratos na biomassa seca final	141
Tabela 43 - Análise de variância para o teor de cinzas na biomassa seca final	142
Tabela 44 - Coeficientes estequiométricos estimados através dos balanços de materiais de carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre, carga e grau de redução da biomassa cultivada em fotobiorreator tubular horizontal, utilizando nitrato ou uréia como fontes de nitrogênio.....	145

Lista de abreviaturas e siglas

ART	Açúcares redutores totais;
VOCs	Compostos voláteis orgânicos;
C	Carbono;
N	Nitrogênio;
S	Enxofre;
O	Oxigênio;
H	Hidrogênio;
I	Intensidade Luminosa;
E_f	Concentração de etanol (g L^{-1});
fc	Fração em massa do carbono na biomassa seca (g g^{-1});
fi	Fração em massa do átomo <i>i</i> na biomassa seca (g g^{-1});
N_t	quantidade total de nitrogênio adicionado (mg);
P_{etanol}	Produtividade em etanol (g L h^{-1});
P_X	Produtividade em células ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$);
T_c	Tempo de cultivo (dias);
V	Volume do meio (L);
X_i	Concentração celular inicial (mg L^{-1});
X_m	Concentração celular máxima obtida (mg L^{-1});
X_P	Médias dos valores de concentrações celulares ao longo do regime permanente;
$Y_{X/N}$	Fator de conversão de nitrogênio em células (mg mg^{-1});
Cl	Clorofila a ;
GS	glutamina sintetase;
GOGAT	glutamate sintase
FSII	Fotossistema II
FSI	Fotossistema I

Lista de símbolos

$Y_{GX}^{\max}$	Rendimento máximo teórico de biomassa sobre a energia de Gibbs;
μ	Velocidade específica de crescimento;
$1/Y_{GX}$	Energia de Gibbs para o crescimento e manutenção celular;
c	Velocidade da luz ($2,99 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$);
D	Vazão específica de alimentação (h^{-1});
h	Constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J}$);
m_G	Energia de Gibbs dissipada para a manutenção celular;
MM_c	Massa molar do átomo do carbono (g C-mol^{-1});
MM_i	Massa molar do átomo i (g C-mol^{-1});
N_A	número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$ fótons de Einstein $^{-1}$)
n_{Ph}	número de fótons
Q	Energia de Gibbs liberada como calor;
q_{H^+}	Consumo molar de H^+ ;
q_{O_2}	Produção molar de O_2 ;
ΔG_a	Energia total de Gibbs absorvida pela fotossíntese;
ΔG_{ATP}	Energia de Gibbs transformada em ATP;
Δg_{Ph}	Energia de Gibbs contida em 1 Einstein de fóton;
ΔH	Energia fixada pelos fotosistemas;
η	Rendimento do processo em etanol (%);
λ	Comprimento de onda.

Sumário

1. Introdução.....	20
2 Revisão bibliográfica	22
2.1 Características da <i>A. platensis</i>	22
2.2 Fotobiorreatores.....	26
2.3 Processos de cultivo em fotobiorreatores.....	31
2.4 Nutrientes para o crescimento da <i>A. platensis</i>	33
2.4.1 Fontes de Nitrogênio.....	33
2.4.2 Intensidade luminosa.....	41
2.4.2.1 Pigmentos	46
2.4.3 Fontes de carbono	50
2.4.3.1 Fonte de carbono orgânico (Crescimento heterotrófico).....	50
2.4.3.2 Fonte de carbono inorgânico (Crescimento autotrófico).....	51
2.4.3.3 Fonte de carbono inorgânico e orgânico simultaneamente (Crescimento mixotróficos)	54
3 Objetivos.....	61
4 Materiais e métodos	62
4.1 Fermentação alcoólica contínua.....	62
4.1.1. Testes preliminares para emprego da fermentação alcoólica contínua	62
4.1.1.1 Teste para avaliar a influência do tratamento do melaço na determinação da concentração celular.....	62
4.1.1.1.1 Melaço não tratado.....	62
4.1.1.1.2 Melaço tratado	62
4.1.1.1.3 Preparação do melaço.....	63
4.1.1.2. Teste para avaliar a homogeneidade do reator	63
4.1.1.3. Teste para determinar a vazão específica de alimentação	63
4.1.2. Micro-organismo e condições de manutenção.....	63
4.1.3. Preparo do inóculo.....	64
4.1.4. Dispositivo para a cultura.....	64
4.1.5. Descrição das condições de fermentação contínua.....	64
4.2 Cultivo de <i>A. platensis</i>	65
4.2.1 Micro-organismo e manutenção.....	65

4.2.2 Meio de cultivo.....	65
4.2.2.1 Meio padrão para cultivo de <i>A. platensis</i>	65
4.2.2.2 Meio modificado.....	66
4.2.3 Preparo do inóculo.....	66
4.2.4 Dispositivo da cultura.....	67
4.2.4.1 Fotobiorreator tubular horizontal.....	67
4.2.4.2. Fotobiorreator tubular espiralado.....	68
4.2.5 Descrição de um experimento típico de cultivo da <i>A. platensis</i>	68
4.3 Técnicas Analíticas.....	69
4.3.1. Acompanhamento da fermentação alcoólica.....	70
4.3.1.1. Determinação da concentração celular.....	70
4.3.1.2 Determinação do pH.....	70
4.3.1.3 Determinação de ART.....	70
4.3.1.4 Determinação da concentração de etanol.....	71
4.3.1.5 Determinação dos componentes voláteis presentes no gás efluente da fermentação alcoólica contínua.....	72
4.3.2 Acompanhamento do cultivo de <i>A. platensis</i>	72
4.3.2.1 Determinação da concentração celular	72
4.3.2.1.1 Densidade ótica.....	72
4.3.2.1.2 Construção da curva de calibração.....	73
4.3.2.2 Determinação da concentração de carbonato total.....	73
4.3.2.3 Determinação da concentração de amônia total.....	74
4.3.2.4 Determinação da concentração de uréia.....	75
4.3.2.5 Determinação do pH.....	76
4.3.2.6 Determinação de nitrato.....	76
4.3.2.7 Determinação da concentração de etanol.....	76
4.3.3 Avaliação da biomassa de <i>A. platensis</i> obtida no final do cultivo.....	76
4.3.3.1. Determinação de Clorofila a	76
4.3.3.1.1 Curva de calibração para a determinação de Clorofila a	77
4.3.3.2 Determinação da composição centesimal	77
4.3.3.2.1 Proteínas totais.....	78
4.3.3.2.2. Lipídios totais.....	78
4.3.3.2.3. Cinzas.....	78
4.3.3.2.4. Carboidratos totais	79

4.3.4. Avaliação da composição elementar.....	79
4.3.4.1 Determinação de CNHS.....	79
4.3.4.2 Determinação de oxigênio	79
4.4 Cálculos	79
4.4.1 Produtividade em etanol no regime permanente.....	79
4.4.2 Rendimento do etanol no regime permanente.....	80
4.4.3 Produtividade em células nos cultivos de <i>A. platensis</i>	80
4.4.4 Fator de conversão de nitrogênio em células nos cultivos de <i>A. platensis</i>	80
4.4.5 Coeficientes atômicos para 1 C-mol de biomassa.....	81
4.4.6 Grau de redução da biomassa.....	82
4.5 Teoria dos parâmetros bioenergéticos	82
5. Planejamento experimental.....	84
6. Resultados e discussões.....	85
6.1 Testes preliminares para a realização da fermentação alcoólica.....	85
6.1.1 Avaliação da influência da clarificação do melaço na determinação da concentração celular.	86
6.1.2 Teste de homogeneidade do reator.....	87
6.1.3 Avaliação de diferentes vazões específicas de alimentação (D)	88
6.1.4 Avaliação dos voláteis orgânicos no gás de arraste.....	92
6.2. Avaliação do crescimento da <i>A. platensis</i>	93
6.3 Avaliação dos parâmetros: concentração celular máxima (X_m), Produtividade em células (P_x) e Fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{x/N}$).....	119
6.3.1 Concentração celular máxima.....	119
6.3.2 Produtividade volumétrica de células	122
6.3.3 Fator de conversão de nitrogênio em células	125
6.4 Avaliação da concentração de clorofila a	129
6.5 Avaliação da composição centesimal.....	134
6.6. Avaliação dos parâmetros bioenergéticos	143
6.7 Comparação entre os fotobiorreatores	153
7. Conclusões	154

1 Introdução

O interesse na produção comercial da *Spirulina* sp. é devido a algumas propriedades particulares como alta digestibilidade, menor concentração de ácidos nucléicos, teores de proteínas elevados (50-70% da massa seca), e importância quantitativa de aminoácidos essenciais. Na sua biomassa, encontram-se também pigmentos como a clorofila, ficocianina e β -caroteno, ácidos graxos essenciais como γ -linolênico, o qual possui efeito terapêutico em humanos (BELAY; OTA, 1994), vitaminas e antioxidantes (PULZ; SCHEIBENBOGEN, 1998).

Tradicionalmente a *Spirulina* (*Arthrospira*) é cultivada autotroficamente na presença de altos níveis de carbonatos e bicarbonatos como fontes de carbono por serem de baixo custo e proporcionarem pH elevado no meio. No entanto, *Spirulina* ssp. também podem crescer em condições mixotróficas, podendo apresentar uma produtividade maior quando comparadas a cultivos fotoautotróficos ou heterotróficos (OGBONNA *et al.*, 2000).

Em condições mixotróficas e/ou fotoautotróficas, a intensidade luminosa é um fator importante no crescimento celular da *A. platensis*. Baixas intensidades luminosas podem limitar o crescimento celular. Por outro lado, altas intensidades luminosas podem inibir o crescimento celular devido ao fenômeno de fotoinibição. Por isso, esse é um fator que deve ser controlado em cultivos de micro-organismos fotossintetizantes.

O pH do meio de cultivo é um outro fator no cultivo de micro-organismos. O pH determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio de cultura e influencia diretamente ou indiretamente no metabolismo dos micro-organismos fotossintetizantes. Durante o cultivo autotrófico da *Spirulina* sp. ocorre um rápido aumento do pH no meio de cultura, o que pode atuar como um autoinibidor do crescimento celular (RICHMOND, 2000), e portanto, o CO₂ pode ser utilizado para a manutenção do pH ótimo.

A biofixação do CO₂ pelas microalgas estão entre os métodos biológicos mais produtivos no tratamento de emissões de resíduos industriais, e o rendimento da biomassa por hectare é maior quando comparadas a plantações na agricultura (LAW; BERNING, 1991; AKIMOTO *et al.*, 1994). O uso direto dos resíduos voláteis reduz os custos de pré-tratamento, mas a alta concentração de CO₂ pode inibir o crescimento de cianobactérias e microalgas. No entanto, alguns autores têm

recentemente relatado o isolamento de cianobactérias e microalgas tolerantes a altas concentrações de CO₂ e capazes de fixar esse gás, tais como *Chlorella*, *Spirulina* e *Scenedesmus* (CHANG *et al.*, 2003; WATANABE; HALL, 1995a; HANAGATA *et al.*, 1992), *Cyanidium cladium* (AKIMOTO *et al.*, 1994).

Além do CO₂, a fonte de nitrogênio também é um fator determinante no cultivo, uma vez que este nutriente é utilizado, principalmente, para constituir proteínas e ácidos nucleicos, fundamentais para a manutenção e crescimento celular (WATANABE; HALL, 1996). O meio de cultura convencional para a obtenção da *S. platensis* utiliza sais de nitrato como fonte de nitrogênio, como, por exemplo, nitrato de potássio e nitrato de sódio. Uréia (DANESI *et al.*, 2002; SOLETTTO *et al.*, 2005) e sais de amônio (CARVALHO *et al.*, 2004; SOLETTTO *et al.*, 2005), têm sido pesquisadas como fontes alternativas de nitrogênio para o cultivo de *S. platensis*.

No caso de fontes de nitrogênio amoniacais, o emprego dos reatores tubulares pode ser considerado como uma vantagem, por favorecer baixa perda de amônia por volatilização, reduzindo a necessidade de adição de fonte de nitrogênio, como conseqüente redução do custo de produção. Assim, pode-se concluir que os esforços em melhoria de condições de cultivo de *A. platensis* não sejam apenas utilizando reatores abertos, mas também reatores fechados, dentre os quais os tubulares.

O dióxido de carbono e os compostos voláteis orgânicos (CVOs) de fermentação alcoólica podem ser utilizados como fontes de carbono no cultivo de *A. platensis*. Durante a fermentação alcoólica industrial, toneladas de CO₂, etanol e, em menor quantidade, alguns CVOs são liberados para a atmosfera como resíduos. No entanto, esses compostos podem ser reaproveitados como uma fonte de nutriente, juntamente como uma fonte de nitrogênio de baixo custo (uréia) para o desenvolvimento da *A. platensis*, que por sua vez permite a produção de componentes com alto valor agregado e com menor custo de produção industrial.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Características da *A. platensis*

Arthrospira platensis é uma cianobactéria filamentosa fotossintetizante pertencente da ordem *Oscillatoriales*, família *Cyanophyceae*, gênero *Arthrospira*, espécie *platensis*. São caracterizadas por tricomas cilíndricos multicelulares com formas espiraladas (Figura 1). Estes possuem comprimentos de aproximadamente 500 μm e diâmetro variando de 6-12 μm , mas dependendo das condições de cultivo podem adquirir morfologias diferentes. Os filamentos não possuem ramificações nem heterocistos (TOMASELLI, 1997).

Figura 1. *Spirulina platensis* (UTEX 1926).

Fonte: Universidade do Texas, 2006.

Arthrospira pode controlar sua flutuabilidade com vesículas gasosas para receber a incidência luminosa ótima para a fotossíntese. Essas células podem também excretar polissacarídeos extracelulares para formar agregados flutuantes, um fato que facilita sua recuperação em lagos naturais e culturas *outdoors* (MATA, 2007). Além disso, devido a sua morfologia, taxa de crescimento celular relativamente alta e a característica das células se agregarem, o custo operacional para a recuperação da biomassa é reduzido, tornando-a economicamente viável para a produção industrial (MATA, 2007).

A *Arthrospira* sp. é comercializada, de forma inadequada, com o nome de *Spirulina* (GARRITY *et al.*, 2001). Atualmente, a *Arthrospira* sp. é produzida em diferentes países e sua produção mundial pode exceder 3000 toneladas (SHIMAMATSU, 2004). Na Tabela 1 estão descritos algumas indústrias produtoras de *Spirulina* (*Arthrospira*) sp. e seu respectivo país.

Tabela 1 - Produtores representativos de *Spirulina*.

Indústria	País/território
Spirulina Mexicana (Sosa Texcoco) SA	México ^a
Siam Algae Co., Ltd.	Thailand
Earthrise Farms	U.S.A.
Cyanotech Corporation	U.S.A.
Nan Pao Resins Chemical Co., Ltd.	Taiwan
Far East Microalgae Co., Ltd.	Taiwan
Parry Agro Industries Ltd. (Parry Nutraceuticals)	Índia
Yunnan Spirin Co., Ltd.	Mainland China

Fonte: Shimamatsu, 2004

^a Essa indústria faliu por volta do ano de 1990 (LEE, 1997)

A biomassa da *Spirulina* sp. é comercializada, principalmente, como alimentos para seres humanos e animais devido a sua composição química. A segurança como alimento tem sido estabelecida por séculos através do consumo pelos seres humanos e pelos numerosos estudos toxicológicos (CHAMORRO *et al.*, 2002).

Na China, em 1997, existiam cerca de 80 produtores de *Spirulina*, com produção anual variando de 3 a 500 toneladas. A maioria dos produtores se localizava no sul, devido à vantagem de possuir verões longos e clima temperado (LEE, 1997). O maior produtor mundial de *Arthrospira* é Hainan Simai Enterprising que está localizado na província de Hainan, na China. Essa companhia tem uma produção anual de 200 toneladas (SPOLAORE *et al.*, 2006). No Japão, de acordo com *Health Industry News* a quantidade total de *Spirulina* comercializada foi de 400 toneladas, em 1996. Em Taiwan, 5 indústrias produzem um total de 480 toneladas. Na Tailândia, os dois maiores produtores de *Spirulina* (*Siam Algae Co., Ltd* e *Neotech Food Co., Ltd*) produzem 150 toneladas e 20 toneladas por ano, respectivamente. Nos Estados Unidos, a *Cyanotech* e a *Earthrise Farms* são os dois maiores produtores de *Spirulina*, com produção de 380 toneladas e 500 toneladas, respectivamente. Além dessas indústrias citadas acima, existem outras produtoras de *Spirulina* com uma produção anual menor em diversos países como Chile, Cuba, Filipinas, Índia (LEE, 1997).

O potencial dessas cianobactérias como um alimento básico na dieta humana tem sido investigado há muitos anos em diversos países. No Japão, a biomassa

algal (por exemplo, *Chlorella* e *Spirulina*) é produzida comercialmente, sendo utilizada primeiramente como alimentos nutracêuticos ou funcionais (OGBONNA; TANAKA, 1997; BOROWITZKA, 1986). Na China, *Spirulina* and *Chlorella* são os dois maiores gêneros cultivado na forma de biomassa ou extrato para a indústria alimentícia. A biomassa é usada para produzir uma variedade de produtos nutracêuticos ou funcionais como tabletes, cápsulas, pó ou para extração de ingredientes bioativos como β -caroteno e ficocianina. A biomassa é suplementada em pães, biscoitos, doces, sorvetes e o extrato são suplementados em bebidas como refrigerantes e chá, principalmente para realçar seu valor nutritivo (LIANG *et al.*, 2004).

Uma ampla variedade de pigmentos como clorofila *a* (Cl *a*), luteína, β -caroteno, ficocianina (PC) e aloficocianina (APC) são compostos bioativos na biomassa de *S. platensis* e tem sido usado como corantes naturais em alimentos, em cosméticos, e como produtos farmacêuticos no consumo humano e animal (CHEN *et al.*, 2006). O efeito nocivo de corantes sintéticos e a tendência da sociedade utilizar produtos naturais na alimentação e cosméticos têm conduzido à exploração das microalgas como corantes naturais. Esses pigmentos têm um grande valor comercial como corantes naturais em indústrias nutracêuticas, cosméticas e farmacêuticas (PRASANNA *et al.*, 2007).

Recentemente, a importância de se estudar esses micro-organismos é devido as suas propriedades terapêuticas (BELAY *et al.*, 1993) e presença de compostos antioxidantes (ESTRADA *et al.*, 2001; MIRANDA *et al.*, 1998). Essas propriedades têm sido provadas experimentalmente, *in vivo* e *in vitro*, que são efetivas para o tratamento de algumas alergias, anemia, doenças virais e cardiovasculares, hiperglicemia, hiperlipidemia, processos inflamatórios entre outros (CHAMORRO *et al.*, 2002; BELAY *et al.*, 2002).

Essa cianobactéria possui alto teor protéico, com importância quantitativa dos aminoácidos essenciais, e outros elementos nutricionais, proporcionando seu alto valor nutricional (MORIST *et al.*, 2001). Baixos teores de ácidos nucléicos, altos conteúdos de vitaminas, polissacarídeos, e ácidos graxos essenciais, como ômega-3 e ômega-6 são parâmetros importantes para avaliar a qualidade da biomassa algal (OGBONNA; TANAKA, 1997; BOROWITZKA, 1986). Os polissacarídeos que constituem a parede celular têm uma digestibilidade de 86%, o que torna a biomassa facilmente absorvida pelo corpo humano (LI, 1997).

Há relatos também do emprego da *Arthrospira* em cosméticos, um extrato rico em proteínas feitos a partir da *Arthrospira* repara sinais de envelhecimento da pele mais cedo, exerce um efeito de firmeza e previne a formação de estrias (Protulines®, Exsymol S.A.M., Monaco) (SPOLAORE *et al.*, 2006)

Além da presença dos compostos citados anteriormente, a biomassa de *Spirulina* também pode ser utilizada no tratamento de águas residuais, renovação da água através da desintoxificação biológica e remoção de metais pesados. Por ser um micro-organismo fotossintetizante, tem a capacidade não apenas de produzir oxigênio, mas também de remover nutrientes como nitrogênio e fósforo reduzindo a eutrofização dos efluentes. Essa biomassa pode ser recuperada e utilizada para extrair compostos de interesse industrial, como por exemplo pigmentos, e o restante da biomassa pode ainda ser utilizado como combustível ou para produção de metano (CIFERRI; TIBONI, 1985).

O cultivo de microalgas e cianobactérias fornecem excelente perspectivas para a produção de energia renovável, podendo contribuir substancialmente para uma redução de emissões do CO₂. Essas emissões são resultados do processo de queima dos combustíveis fósseis e de práticas agrícolas impróprias (as queimadas, por exemplo) produzindo elevados rendimentos da biomassa, e possibilitando a produção de compostos com alto valor agregado e biocombustível (CHISTI, 2007; RICHMOND, 1990).

As microalgas têm sido propostas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, devido ao alto teor de lipídios que algumas espécies podem alcançar. O teor de óleo de 20 a 50% de sua biomassa seca é comum entre as espécies, como *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp., *Schizochytrium* sp. Algumas microalgas podem exceder a 80% (MIAO, 2006; CHISTI, 2007; BANERJEE *et al.*, 2002). O percentual de lipídios na biomassa de microalgas é função das condições de cultivo, tais como salinidade do meio, concentração de nitrogênio, natureza da fonte de carbono; assim, é possível, com certa facilidade e com tempo de resposta relativamente curto, aumentar o teor de óleo nas microalgas, de forma a alcançar valores bastante expressivos (CHISTI, 2007).

As principais vantagens para a utilização de microalgas como biocombustíveis são: alta eficiência de conversão de fótons (como evidenciada pelo aumento do rendimento da biomassa por hectare); podem ser coletados em lotes durante quase todo o ano; pode utilizar sais e água residuária, reduzindo extremamente o uso de

água doce, produz biocombustível altamente biodegradável e não tóxico, podem ser usado o CO₂ liberado pela queima de combustíveis fósseis, esse CO₂ é frequentemente disponível a baixo custo ou, até mesmo sem custo (CHISTI, 2007, SAWAYAMA *et al.*, 1995; SCHENK *et al.*, 2008, YUN *et al.*, 1997). As limitações atuais existentes são principalmente no processo de colheita e na fonte do CO₂ para a maior eficiência de produção (SCHENK *et al.*, 2008).

2.2 Fotobiorreatores

A escolha do biorreator para o cultivo da microalga é um importante fator que influência na produtividade global (WATANABE; HALL, 1996). Há uma grande variedade de biorreatores utilizados para o cultivo de microalga, dentre os quais, alguns são utilizados atualmente para produção industrial (LEE, 2001).

Segundo Borowitzka (1999), as microalgas podem ser cultivadas em diversos sistemas de cultivo, com volume variando desde poucos litros até bilhões de litros. Em geral, os sistemas de produção são pouco sofisticados, uma vez que muitas empresas desenvolvem cultivos a céu aberto em tanques com fundo de terra e com baixo ou nenhum controle dos parâmetros ambientais. Nos últimos 50 anos, alguns cultivos, desenvolvidos em fotobiorreatores, podem ter os seus parâmetros ambientais controlados e, isto implica numa elevada produtividade, a qual viabiliza a produção comercial de compostos de elevado valor agregado (KOMMAREDDY; ANDERSON, 2005; TREDICI, 2004).

Convencionalmente, os cultivos de microalgas comerciais são realizados em reatores abertos por causa de baixa eficiência dos fotobiorreatores fechados em larga escala (OGBONNA; TANAKA, 1997). Portanto, é difícil de obter alta produtividade em reatores “*outdoors*” abertos por causa da dificuldade de controlar fatores ambientais como temperatura e intensidade luminosa, há uma grande evaporação de água no meio e, além disso, requer uma grande área superficial facilitando a contaminação por outros micro-organismos. Esse método não deve ser empregado para produção de componentes químicos finos e farmacêuticos, uma vez que o custo de recuperação desse produto e purificação podem ser extremamente altos, principalmente devido a baixa concentração celular e a contaminação com impurezas. Várias alternativas têm sido propostas para contornar esse problema, como o emprego de fotobiorreatores fechados e processos heterotróficos (CHEN, 1997).

Os fotobiorreatores abertos possuem certas desvantagens sobre os fotobiorreatores fechados, dentre elas destacam-se: menor eficiência fotossintética e menor qualidade do produto da microalga (RICHMOND *et al.*, 1990; VONSHAK; RICHOMOND, 1988). A menor eficiência fotossintética é principalmente devido ao efeito de sombreamento quando a densidade celular alcança um determinado valor; a baixa eficiência de utilização de CO₂ gasoso devido à limitação do suplemento de CO₂ para a microalga, uma vez que, quando o CO₂ não está dissolvido no meio de cultura, este se volatiliza; contaminação do cultivo por bactérias, algas, protozoários e fungos também influenciam no crescimento da microalga e na qualidade do produto. Os fotobiorreatores fechados têm a vantagem de aumentar a eficiência de utilização de CO₂, controlando o pH da cultura e diminuir o nível de contaminantes (WATANABE; HALL, 1996). Também, dependendo da configuração do reator, pode aumentar a área iluminada, reduzindo o efeito de sombreamento (WATANABE *et al.*, 1995).

Fotobiorreatores fechados são usados para cultivos de micro-organismos fotoautotróficos visando à produção de ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos, vitaminas e polissacarídeos (MOLINA GRIMA *et al.*, 1995; TAKANO *et al.*, 1995; MERCHUK *et al.*, 1996; MATSUNAGA *et al.*, 1996). Para muitas dessas aplicações, é essencial o uso desses tipos de fotobiorreatores, nos quais as monoculturas podem ser mantidas por longos períodos, preferencialmente se o cultivo for “*outdoor*”, utilizando luz solar como a única fonte de energia (JANSSEN *et al.*, 2003).

Diversas configurações de fotobiorreatores fechados têm sido usadas ou propostas para o cultivo de *Spirulina* sp., como o tubular horizontal (CONVERTI *et al.*, 2006a), tubular helicoidal (BIOCOIL) (WATANABE *et al.*, 1995; NERANTZIS *et al.*, 2002), espiralado vertical (TREDICI; ZITTELLI, 1998) e laminar inclinado (HU *et al.*, 1996). Quase todas as configurações dos fotobiorreatores usam um recipiente de *degassing* para desoxigenar o sistema, pois, um aumento no nível de oxigênio no meio reduz a produtividade (NERANTZIS *et al.*, 2002).

Um fator importante para a configuração desses fotobiorreatores é o fornecimento de luz eficientemente pela maximização da relação superfície-volume iluminada. Por isso, os tubos são frequentemente estreitos e os “*panels*” são finos. No entanto, alguns fotobiorreatores bem sucedidos em escala laboratorial podem não funcionar bem quando se aumenta a escala por causa da redução da relação

superfície-volume, ocasionando uma pobre distribuição luminosa dentro do reator (OGBONNA; TANAKA, 1997).

Tredici e Zittelli (1998) observaram que cultivos de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* em fotobiorreator tubular obtiveram maiores valores de produtividade volumétrica, eficiência fotossintética e velocidade específica de crescimento quando comparadas com os cultivos em fotobiorreator plano. Isso foi devido à diferença entre o fluxo de fótons nos cultivos com formas diferentes dos fotobiorreatores. Uma vez que, os outros principais parâmetros que conduzem o crescimento da *S. platensis* não variaram entre os dois cultivos.

Entre os diferentes tipos de fotobiorreatores, aqueles do tipo *air lift* são particularmente interessantes por apresentarem uma maior transferência de massa líquido-gás com menor gasto de energia, podem ter o escoamento do líquido facilmente controlado, a circulação de líquidos ocorre sem a remoção de partes do reator e isto previne a contaminação no cultivo. Estes tipos de reatores são especialmente recomendados para as culturas de cianobactérias por causa da sensibilidade destas ao estresse de cisalhamento mecânico (CHOI *et al.*, 1995; SIEGEL; ROBINSON *et al.*, 1992; CHISTI, 1989; MERCHUK *et al.*, 1996; WATANABE *et al.*, 1995).

O sistema *air lift* também permite a remoção de oxigênio produzido pela fotossíntese (CAMACHO RUBIO *et al.*, 1998). A remoção contínua do gás oxigênio em cultivos fotossintéticos é essencial por que uma excessiva quantidade de oxigênio dissolvido inibe a fotossíntese (MOLINA *et al.*, 2001).

O crescimento e a produtividade das células fotossintéticas são afetados por diversos fatores, incluindo composição do meio de cultura, temperatura, pH, concentração de O₂ e CO₂ no reator e fornecimento de luz, sendo este o mais importante durante o cultivo autotrófico de células fotossintéticas (OGBONNA; TANAKA, 1997).

Micro-organismos não são expostos a uma densidade de fluxo de fótons constante em fotobiorreatores devido ao sombreamento mútuo das células e ao movimento do líquido durante a agitação. Frequentemente, tem sido sugerido que a circulação entre as zonas clara e escura poderia conduzir a uma eficiência fotossintética maior que aquela determinada sob iluminação contínua da densidade de fluxo de fótons (JANSSEN *et al.*, 2003).

O fornecimento da luz em fotobiorreatores é uma variável importante em culturas fotoautótrofas. A alta razão superfície-volume é um pré-requisito importante para o suprimento suficiente de luz nos fotobiorreatores. Até mesmo sob baixa intensidade luminosa, os organismos fotossintetizantes utilizam a luz exposta na superfície dos fotobiorreatores. A energia de excitação é parcialmente utilizada pelo aparato fotossintético e a energia residual é perdida na forma térmica ou fluorescência (GRUSZECKI *et al.*, 1994). Um excesso da energia de excitação pode prejudicar o aparato fotossintético no processo chamado de fotoinibição (MELIS, 1999).

Dependendo do diâmetro interno dos tubos (1,2 a 12,3 cm), os fotobiorreatores tubulares fechados podem alcançar valores de concentração celular maiores que 20 g L⁻¹ e produtividades volumétricas de biomassa de 0,25 - 3,64 g L⁻¹d⁻¹ em cultivo que possuem o ciclo claro/escuro. A alta turbulência encontrada em reatores tubulares garante uma ótima disponibilidade luminosa para as células e melhor transferência de massa dos gases (LEE, 2001).

Outro fator importante é o escoamento turbulento da cultura. A velocidade do escoamento do líquido deve ser suficiente para garantir o escoamento turbulento para evitar que as células fiquem estagnadas no interior escuro dos tubos. Portanto, uma turbulência excessiva pode danificar as células e há um limite superior para a velocidade da cultura. A turbulência é conhecida por aumentar a produtividade da biomassa quando comparada as condições de escoamento laminar. A turbulência move as células do interior escuro de um tubo para uma zona periférica iluminada, evitando que as células não recebam luz por longos períodos. Adicionalmente, o movimento das células da zona clara para a zona escura pode aumentar a produtividade desde que a duração de permanência na zona escura seja curta. Intervalos no escuro na ordem de 1 segundo podem melhorar a conversão da energia solar em biomassa (LAWS *et al.*, 1987; TERRY, 1986). Tais intervalos permitem reações catalíticas da fotossíntese no escuro, permitindo o restabelecimento do aparato fotossintético para sua eficiência no próximo período luminoso (ACIÉN FERNÁNDEZ *et al.*, 2001). Jansen *et al.* (2002) relataram que a turbulência movimenta as células da zona escura no centro do fotobiorreator para a zona fótica na parte mais externa do cilindro, podendo conduzir a maior eficiência do reator.

O fluxo laminar pode ser prejudicial às altas densidades celulares. No entanto, é importante por proporcionar uma distribuição uniforme da luz a todas as células na cultura, reduzir o crescimento da parede do fotobiorreator e diminuir a tensão do oxigênio na cultura (RICHMOND, 2000). Carlozzi e Torzillo (1996) obtiveram maior produtividade da *Arthrospira platensis* quando a velocidade da cultura densa (10 g L^{-1}) foi alterada de $0,18 \text{ m s}^{-1}$ para $0,75 \text{ m s}^{-1}$. Isto torna evidente a necessidade de se manter uma velocidade de escoamento que permita um maior número de células captarem luminosidade suficiente e que ao mesmo tempo não aumente a demanda dos custos de produção.

Converti *et al.* (2006) observaram que, cultivos de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular, a velocidade da cultura de $0,16 \text{ m s}^{-1}$ é suficiente para garantir uma boa mistura da cultura evitando danos às células. Similarmente, Tredici (1999) descreve que, cultivos em escala industrial de *Arthrospira* sp., em fotobiorreator com tubos plásticos alongados sobre a terra com 35 cm de largura e 9 cm de altura, a densidade populacional ótima foi de 1 g L^{-1} e a velocidade do fluxo não pode ser menor que 50 cm s^{-1} . Baixa velocidade de circulação 6 a 10 cm s^{-1} prejudicou o cultivo devido a produção O_2 que inibiu o crescimento, baixas taxas de saída e a cultura deteriorou-se rapidamente devido ao seu crescimento na parede do tubo (*biofouling*).

Como o crescimento dos micro-organismo fotossintetizantes nos fotobiorreatores é fotossintético, o suplemento de luz e CO_2 são provavelmente os limitantes para o crescimento da microalga. Além desses fatores, a concentração de nitrogênio também é um fator determinante no cultivo, uma vez que este nutriente é utilizado, principalmente, para constituir proteínas e ácidos nucleicos, fundamentais para a manutenção e crescimento celular (WATANABE; HALL, 1996).

No caso de fontes de nitrogênio amôniaicas, o emprego dos reatores tubulares pode ser considerado como uma vantagem, por favorecer baixa perda de amônia por volatilização, reduzindo a necessidade de adição de fonte de nitrogênio, como conseqüente redução do custo de produção. Assim, pode-se concluir que os esforços em melhoria de condições de cultivo de *A. platensis* não sejam apenas utilizando reatores abertos, mas também reatores fechados, dentre os quais os tubulares.

2.3 Processos de cultivo em fotobiorreatores

S. platensis habita naturalmente em lagos africanos e mexicanos (RICHMOND, 1990), mas podem crescer artificialmente em meios sintéticos empregando diferentes tipos de processos de cultivo. Estes têm sido desenvolvidos com a finalidade de aumentar a produtividade do material desejado. Segundo Sassano (1999), a forma de adição do substrato nas dornas pode interferir na qualidade da biomassa produzida.

No processo contínuo é realizado por meio de uma alimentação contínua do substrato limitante (ou meio de cultura) ao reator a uma determinada vazão constante e por uma retirada contínua de meio cultivado, de forma a se ter o volume de reação constante, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário (*steady-state*). Esse estado consiste na situação nas quais todas as condições no interior do reator permanecem constantes ao longo do tempo (FACCIOTTI, 2001). Esse processo tem sido estudado por diferentes autores, comprovando sua aplicabilidade para no cultivo de *Spirulina platensis*. Hirata *et al.*, (1998) obtiveram concentrações de *S. platensis* sob condições fotoautotróficas em regime permanente nas diferentes intensidades luminosas analisadas, 25 a 400 W m⁻². Nerantzis *et al.* (2002) empregou o sistema contínuo no fotobiorreator tubular helicoidal (HELPBR) no cultivo de *S. platensis* e provou sua flexibilidade ao aumento de escala bem como sua alta produtividade volumétrica em relação a outros fotobiorreatores fechados.

Outro tipo de processo que tem sido utilizado no cultivo de *S. platensis* em fotobiorreatores é o semicontínuo. Esse processo consiste na alimentação contínua do substrato limitante, mas a remoção do produto é por bateladas (alimentação contínua com descarga após a obtenção da concentração celular máxima desejada) (BORZANI, 2001). Travieso *et al.* (2001) utilizando fotobiorreator tubular helicoidal, concluíram que é possível empregar satisfatoriamente o sistema semicontínuo no cultivo de *S. platensis*, obtendo uma produtividade da biomassa maior que em processos descontínuo. Isso por que, em processo descontínuo, a produtividade em células tende a diminuir quando os nutrientes são totalmente consumidos. De acordo com Reichert *et al.* (2006), a concentração celular pode atingir valores de duas a quatro vezes maiores no cultivo semicontínuo de *S. platensis* em relação ao cultivo descontínuo, utilizando fotobiorreator fechado.

No processo descontínuo, todo o substrato é adicionado no início do cultivo e os produtos permanecem até o final do cultivo (CARVALHO; SATO, 2001). No processo descontínuo alimentado, que é uma variação do processo descontínuo, a alimentação pode ser de forma intermitente ou contínua. O modo de operação da alimentação em bioprocessos permite prevenir o acúmulo ou a falta do substrato no cultivo. Em processo microbiano, uma apropriada taxa de alimentação exponencialmente crescente resulta na manutenção da concentração do substrato limitante residual, controlando a taxa de formação do produto (CARVALHO; SATO, 2001). Esse processo permite que o nutriente seja adicionado em determinados intervalos de tempo durante todo o processo; com isso, é possível adicionar nutrientes potencialmente tóxicos, quando presentes em altas concentrações, como, por exemplo, o íon amônio, sem prejudicar o crescimento microbiano e prevenindo seu acúmulo (CARVALHO *et al.*, 2004). Olguín *et al.* (2001) observaram que no cultivo descontínuo, usando uma concentração inicial de amônia de 1 mM, incubada a 32 °C, ocorre uma grande perda desse íon para a atmosfera além de ser consumida pelo micro-organismo tornando-se deficiente depois de poucos dias, especificamente 12 dias. Soletto *et al.* (2005), observaram que o melhor crescimento cinético da *S. platensis* foi empregando o processo descontínuo alimentado quando comparada com o processo descontínuo, utilizando a uréia com fonte de nitrogênio. Comportamento semelhante foi observado por Zhang *et al.*, (1998) em cultivos mixotróficos de *S. platensis* utilizando NaNO_3 como fonte de nitrogênio.

Costa *et al.* (2004) observaram o emprego da água do lago Mangureira suplementado com uréia pelo processo descontínuo alimentado no cultivo de *S. platensis* foi possível reduzir o custo de produção possibilitando o cultivo em larga escala.

Em casos particulares, como por exemplo a necessidade de utilização de nutriente viscoso no cultivo, este processo geralmente reduz a viscosidade do meio, e o efeito dos componentes tóxicos é também limitado pela diluição (WARD, 1989). Entre outras vantagens desse processo pode-se encontrar: desvio do metabolismo celular para via de interesse de formação do produto, evita repressão catabólica, evita formação de produtos tóxicos no metabolismo microbiano e controla a velocidade de crescimento microbiano. O melhor procedimento operacional para esse sistema é iniciar com pequena quantidade de biomassa e substrato, e adicionar

mais substrato quando a maior parte do substrato inicial ter sido consumida pelo micro-organismo (GREGERSEN; JORGENSEN, 1999).

O processo descontínuo alimentado deve ser usado para melhorar a densidade celular no crescimento da *S. platensis*, desde que a concentração do substrato limitante possa ser adicionada até alcançar a produção máxima de biomassa, sem resultar na inibição do crescimento.

2.4 Nutrientes para o crescimento da *A. platensis*

2.4.1 Fontes de Nitrogênio

O elemento nitrogênio constitui aproximadamente de 5 a 10% do peso seco das cianobactérias (FLORES; HERRERO, 1994). Diferentes fontes de nitrogênio orgânica e inorgânica podem ser assimiladas por micro-organismos fotossintetizantes. Dentre as orgânicas encontramos aminoácidos, purinas, ornitina, e as inorgânicas encontramos sais de amônio e sais de nitrato (BERMAN; CHAVA, 1999).

As cianobactérias utilizam principalmente fontes de nitrogênio inorgânico como nitrato, nitrito, amônia e nitrogênio atmosférico, para suprir sua necessidade. No entanto, amônia é a única fonte inorgânica de nitrogênio que é diretamente incorporada em compostos orgânicos, e então um intermediário obrigatório na utilização do outras fontes de nitrogênio. Essa molécula é também conhecida como uma desacopladora na fotossíntese, causando sob certas circunstâncias o colapso do ΔpH requerida pela síntese de ATP. A amônia regula enzimas importantes no metabolismo de nitrogênio tais como, nitrato redutase, glutamina sintetase e nitrogenases (BOUSSIBA, 1997).

Exceto para o N_2 , as cianobactérias possuem um sistema de transporte específico para as diferentes formas de nitrogênio, mas a maioria deles pode entrar na célula por difusão dependendo de sua concentração ou/e do pH do meio de cultura. Nitrato e nitrito são reduzidos pela nitrato redutase e nitrito redutase, respectivamente; ambas as enzimas usam ferredoxina como doador de elétrons (FLORES; HERRERO, 1994). Uréia é convertida a amônia pela urease e o dinitrogênio é reduzido à amônia pelo complexo nitrogenase (HERRERO *et al*, 2001). Outras formas de nitrogênio como certos aminoácidos requerem sistemas de

transporte específico e posteriormente serão metabolizados para produzir amônio (HERRERO *et al*, 2001, MURO-PASTOR; FLORENCO, 2003)

Nesses organismos, a hierarquia de preferência da assimilação tem sido mostrada para esses compostos. Quando amônio e nitrato estão presentes simultaneamente no meio externo, o sistema para assimilação de nitrato é expresso somente ao nível basal. A inibição da assimilação do nitrato exercida pela amônia opera em dois níveis diferentes, pelo menos. Durante pouco tempo, a adição da amônia interrompe a assimilação ativa do nitrato pelas células. Se as células continuarem expostas ao amônio, até mesmo quando o nitrato está simultaneamente presente, a longo prazo, o sistema regulatório atua na repressão das proteínas envolvendo a assimilação do nitrato (HERRERO; FLORES, 1997). A atividade da nitrato redutase em *Spirulina platensis* (strain ARM 729) é reduzida mediante a retirada de nitrato do meio, e é totalmente restaurada após duas horas da adição de nitrato, indicando a indução pelo substrato. A concentração ótima de nitrato de sódio necessária para a atividade máxima da enzima nitrato redutase é de 30 mM. Os produtos da assimilação do nitrato, nitrito e amônio, inibiram significativamente a atividade da nitrato redutase quando em altas concentrações. A acumulação do nitrito é tóxica para a célula, mas seu nível pode ser controlado tanto pela inibição da atividade da nitrato redutase e/ou transporte do nitrato, ou pelo aumento da atividade da nitrito redutase (JHA *et al.*, 2007).

Em cultivos de micro-organismo em larga escala, a fonte de nitrogênio preferencial é a amônia devido ao seu baixo custo e também porque ela pode prevenir a contaminação com zooplâncton (BOUSSIBA, 1997). A preponderância de NH_3 sobre NH_4^+ em valores de pH acima de 9,2, o pKa para amônia a 20-30 °C, favoreceu a permeabilidade desta pela membrana plasmática, forma não ionizada, que após difundir pela membrana plasmática, a amônia é aprisionada dentro da célula na forma de íon amônio, carregado positivamente (BOUSSIBA, 1997). O grau de inibição parece ser muito reduzido em cepas que crescem restritamente em condições alcalinas, 5 mM de amônia inibiu 90% a evolução de O_2 dependente de luz em micro-organismo neutrofílico *Anabaena* sp., e somente, 30% foi observada em micro-organismo alcalofílico *Spirulina platensis* no mesmo pH (pH 10,0). Em concentração de 10 mM, *Spirulina platensis* obteve ainda 50% da capacidade fotossintética e *Anabaena* sp. não obteve crescimento. Essa resistência da *Spirulina* à amônia, em pH 10, é conferida por um pH intratilacoidal relativamente alto, no

valor de 6,5 em relação ao pH intratilacoidal da *Anabaena* sp., valor de pH de 5,3. Esta diferença no valor do pH intratilacoidal sugere que menor é a Δ pH através da membrana que é a razão para a resistência relativa da *Spirulina platensis* a amônia em pH 10,0 (BELKIN; BOUSSIBA, 1991a).

A adição de 2-3 mM de amônia em cultivos de *Spirulina* mantida geralmente a pH (9,5 - 10,0) causa a deterioração do contaminante *Chlorella* no cultivo de *Spirulina*. A toxicidade da amônia nas células da *Chlorella* é causada pela grande entrada dessa molécula devido ao menor pH interno, reduzindo a variação do pH na membrana tilacoidal requerida para a síntese de ATP. Logo, o uso de amônia com fonte de nitrogênio no cultivo de *Spirulina* pode prevenir a proliferação de outros micro-organismos (BOUSSIBA, 1997).

Uréia e aminoácidos também podem ser assimilados pelas cianobactérias. A uréia e fontes de nitrogênio orgânico são primeiramente metabolizadas para amônia, e a partir de então os átomos de nitrogênio serão utilizados, como observado na Figura 2 (FLORES; HERRERO, 1994).

Figura 2. Principais rotas de assimilação de nitrogênio em cianobactérias cultivadas em pH acima de 9,2.

A maioria dos organismos fotossintetizantes, a assimilação da amônia ocorre pela ação seqüencial da glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT).

Essas reações, conhecidas como ciclo GS-GOGAT, constituem uma ligação entre o metabolismo de nitrogênio e de carbono, e é o metabolismo mais importante para assimilação da amônia gerada tanto exogenamente como endogenamente (BOUSSIBA, 1997).

As enzimas do ciclo da glutamina sintetase e glutamato sintase são importantes pela introdução da amônia em formas orgânicas. O glutamato, produzido por esta via, além de ser o principal doador de nitrogênio para a síntese de outros metabólitos contendo nitrogênio, é também um precursor de alguns aminoácidos e da 5-aminolevulinato, um precursor da biossíntese da porfirina, ficobilina e clorofila (FLORES; HERRERO, 1994).

A parede celular das cianobactérias é como as das bactérias gram-negativas, que contém uma camada de peptidoglicano na parte externa da membrana citoplasmática. Nesta membrana contém tipos de proteínas especiais denominadas de porinas, a qual permite a passagem de pequenas moléculas incluindo aminoácidos e íons inorgânicos. Isto é, essas substâncias apresentam um sistema de transporte especializado (FLORES; HERRERO, 1994). A membrana citoplasmática representa a principal barreira de permeabilidade das cianobactérias. Portanto o nitrato provavelmente possui livre acesso ao periplasma das cianobactérias (HERRERO; FLORES, 1997).

Algumas cianobactérias, como *Anabaena*, *Nostoc*, *Fischerella*, são capazes de fixar N_2 atmosférico, em condições aeróbias, através das nitrogenases (FLORES; HERRERO, 1994). No entanto, as células de *S. platensis* não podem fixar nitrogênio atmosférico porque não possuem heterocisto (MATA, 2007; VACHHANI; VONSHAK, 1997) e é dentro dos heterocistos onde se encontram as nitrogenases em cianobactérias (LARA; GUERRERO, 2007).

O nitrato é provavelmente a fonte mais abundante de nitrogênio para a nutrição de cianobactérias. A assimilação do nitrato envolve a incorporação do nitrato e redução do nitrato intracelular para amônio, na qual é a forma de nitrogênio incorporada em compostos orgânicos. Nitrito, na qual pode também ser utilizado na necessidade do nitrogênio, é assimilado pelas células e então reduzido a amônio (FLORES; HERRERO, 1994).

A assimilação do nitrato pelas cianobactérias envolve um sistema de transporte que é carregado por uma proteína e, esta possui uma alta afinidade pelo nitrato. Esta alta afinidade permite que as cianobactérias utilizem nitratos mesmo em baixas

concentrações como é encontrado no meio ambiente natural. O acúmulo intracelular de nitrato permitirá o funcionamento da enzima nitrato redutase (FLORES; HERRERO, 1994). Portanto, a limitação do transporte de nitrato pela inativação de alguns genes do transporte de nitrato não impede o crescimento dependente de nitrato quando este é suplementado a alta concentração (20 mM). A entrada do nitrato nas células, nessas condições, parece ser por difusão passiva, desde que a concentração de nitrato seja maior que 1 mM, a assimilação de nitrato aumenta linearmente com o aumento da sua concentração (OMATA *et al.*, 1989).

O nitrato intracelular é reduzido a nitrito em reação utilizando 2 elétrons catalizados pela nitrato redutase, o nitrito é convertido a amônio pela nitrito redutase na reação utilizando 6 elétrons. Ambas as enzimas, encontradas nas membranas tilacoidais, utilizam ferredoxina reduzida como doador de elétrons. A presença de nitrato ou nitrito geralmente tem um efeito positivo nos níveis das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase (FLORES; HERRERO, 1994). Estas enzimas encontram-se principalmente no citoplasma das cianobactérias (GUERRERO; LARA, 1987). A assimilação do nitrato envolve a redução citoplasmática para nitrito (NO_2^-), catalizada pela enzima nitrato redutase (NR), usando NAD(P)H como doador de elétrons. O nitrito é rapidamente reduzido a amônio (NH_4^+) pela enzima nitrito redutase (NiR) que usa a ferredoxina como doador de elétrons, e o amônio é então incorporado a moléculas de nitrogênio como aminoácidos, purinas, pirimidinas e aminas (LEA; LEEGOOD, 1993).

Quando somente o CO_2 é o aceptor de elétrons disponível e o escoamento de elétrons pelos fotossistemas não é limitado pela luz, o que determina a fotossíntese é a fixação de CO_2 pelo ciclo das pentoses. Quando se adiciona nitrato nessas mesmas condições, este usa os elétrons diretamente da ferredoxina reduzida, liberando o escoamento dos elétrons não cíclico de sua limitação e estimulando a produção de O_2 . Esse efeito não foi observado quando se adiciona amônio. Na intensidade luminosa saturante, o nitrato estimula o fluxo de elétrons não cíclico para gerar um poder redutor utilizado para sua assimilação. No entanto, a intensidade de luz limitante, o nitrato reprime a fixação de CO_2 para utilizar o poder redutor, gerado fotossinteticamente, na sua redução a amônia (ROMERO; LARA, 1987).

A nitrato redutase e nitrito redutase presentes na membrana tilacoidal permitem a fotoredução do nitrato ou nitrito em uma reação dependente do fotossistema I na qual é estimulada pela ferredoxina. Nos tilacóides do *Synechococcus*, a fotoredução

do nitrato a amônio utiliza água como fonte de elétrons foi observado na reação envolvendo ambos fotossistema I e fotossistema II. Em condições heterotróficas, a redução do nitrato ocorre pela ferredoxina reduzida produzida a partir do NADPH e ferredoxina-NADP oxiredutase. NADPH é provavelmente gerado pela glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase (HERRERO; FLORES, 1997).

A assimilação de amônio nas cianobactérias pode ser pela difusão de sua forma gasosa (amônia) ou pela ação de permeases específicas, e é diretamente incorporado no metabolismo GS-GOGAT (GS: glutamina sintetase; GOGAT: glutamate sintase) (MURO-PASTOR; FLORENCIO, 2003)

A uréia é uma boa fonte de nitrogênio para cianobactérias pertencentes a diferentes grupos taxonômicos. Esta parece ser assimilada intacta pelas células ativas e então metabolizada intracelularmente (FLORES; HERRERO, 1994). Embora o metabolismo assimilatório do nitrogênio tenha sido amplamente investigado (FLORES; HERRERO, 1994), informação sobre a assimilação da uréia é escassa e a maioria relata sobre o uso da urease (RAI; SINGH *et al.*, 1987; RAI, 1989; PALINSKA *et al.*, 2000). A uréia intracelular é degradada pela enzima urease liberando uma molécula de dióxido de carbono e duas moléculas de amônia. Embora algumas leveduras e algas degradem a uréia pela uréia amidoliase dependente de ATP e biotina, a maioria dos micro-organismos usa a uréia amidohidrolase dependente de Ni^{+2} (VALLADARES *et al.*, 2002). Essa enzima possui um Km para uréia geralmente acima de 1 mM (MOBLEY; HAUSINGER, 1989). Valladares *et al.*, (2002) tem demonstrado que algumas cianobactérias como *Synechocystis* sp. PCC 6803 e *Anabaena* sp. PCC 7120 possuem um transportador de uréia, denominado ABC tipo permease (ABC-type permease) essencial para a assimilação da uréia.

A atividade da urease em cianobactérias *Synechococcus* sp. é geralmente maior em células rompidas em relação as células intactas, sugerindo que a urease está localizada intracelularmente no citoplasma (COLLIER *et al.*, 1999). A produção da urease requer Ni^{+2} no meio de crescimento e tem sido purificada a partir da *Spirulina maxima* (CARVAJAL *et al.*, 1982).

Em geral, há dois principais metabolismos para que o amônio seja incorporado em constituintes orgânicos nas células. O primeiro é a incorporação direta do amônio, incorporado do meio, para produção do glutamato pela aminação do 2-

oxoglutarato (α -cetoglutarato) pela glutamato desidrogenase, seguindo pela aminação do glutamato pela glutamina sintetase.

No segundo, duas moléculas de glutamato são produzidas na reação de transaminação. A amônia é incorporada ao glutamato originando a glutamina, na qual transfere seu grupo amino para 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato) pela glutamato sintase ou glutamato-2-oxoglutarato aminotransferase, este é o ciclo de reações catalisadas pelo glutamato sintase e glutamina sintetase, sendo esta a via mais comum de assimilação de amônio em cianobactérias, independente da fonte de nitrogênio utilizada (FLORES; HERRERO, 1994).

É evidente que na assimilação de algumas formas de nitrogênio inorgânico pelas enzimas GS/GOGAT, um requerimento obrigatório do esqueleto de carbono, principalmente cetoácidos, conduzirá um desvio do fluxo de carbono da biossíntese de carboidrato para a biossíntese de aminoácidos (LARA; GUERRERO, 1997), proporcionando um aumento no fluxo de carbono através da via glicolítica e dos ácidos tricarboxílicos para a formação do oxalacetato e do α -cetoglutarato, bem como estimula o *turnover* de aminoácidos, em células de *Anacystis nidulans*, uma

vez que um aumento da incorporação do carbono em aminoácidos induzido pela assimilação de nitrogênio não foi acompanhado por um aumento no *pool* de aminoácidos. Esse desvio é mais evidente sob altas intensidades luminosas (CORONIL *et al.*, 1993).

Nas células de *Phormidium laminosum* adaptada ao crescimento com nitrato ou amônia como fonte de nitrogênio possuem de 65 a 90% de glutamato em relação a quantidade de aminoácidos totais (porção molar), dependendo da fase de crescimento. Essa proporção pode variar se a fonte de nitrogênio no cultivo for alterada. Quando o íon amônio foi adicionado no cultivo com nitrato, o conteúdo de glutamato diminui, enquanto que a maioria dos outros aminoácidos aumentou. O nível intracelular da maioria dos aminoácidos (especialmente aspartato e alanina) aumenta, indicando que a síntese de aminoácido foi maior que sua incorporação em proteínas e outros compostos (OCHOA de ALDA *et al.*, 1996).

O meio de cultura convencional para a obtenção da *S. platensis* utiliza sais de nitrato como fonte de nitrogênio, como, por exemplo, nitrato de potássio e nitrato de sódio. Fontes alternativas de nitrogênio, como uréia (DANESI *et al.*, 2002; SOLETTTO *et al.*, 2005); e sais de amônio (CARVALHO *et al.*, 2004; SOLETTTO *et al.*, 2005), estão sendo pesquisadas com a finalidade de diminuir os custos na produção industrial. Ambos, o tipo e a quantidade da fonte de nitrogênio no meio de cultura influenciam no crescimento e composição da biomassa (STANCA; POPOVICI, 1996).

Considerando a substituição de KNO_3 por uréia, verifica-se que é altamente vantajosa, pois o custo desta é muito menor que a de KNO_3 , e, além disso, a uréia é facilmente assimilada por *S. platensis*, provavelmente devido à sua hidrólise no meio de cultivo, com formação de amônia, seja devido à ação da urease (CARVAJAL *et al.*, 1982), seja devido à alcalinidade do meio de cultivo (DANESI *et al.*, 2002; RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004).

Soletto *et al.*, (2005) comparando o crescimento da *S. platensis* no processo descontínuo, observaram que o uso de uréia como fonte de nitrogênio proporcionou uma maior concentração celular quando comparado com o sulfato de amônio. Nesse mesmo trabalho, observaram que o melhor crescimento cinético da *S. platensis* foi utilizando o processo descontínuo alimentado com uréia quando comparada com o nitrato de sódio. Portanto, o uso de uréia como uma fonte de nitrogênio mais econômica pode ser uma alternativa interessante no cultivo de *S. platensis*.

Bezerra *et al.* (2008) observaram que o emprego do processo descontínuo alimentado utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio pode ser uma alternativa viável para o cultivo de *S. platensis*, não influenciando nos teores protéicos e lipídicos da biomassa final.

2.4.2 Intensidade luminosa

A intensidade luminosa é um importante fator que interfere no crescimento dos micro-organismos fotossintetizantes. A luz absorvida por pigmentos direciona o transporte de elétrons fotossintético, na qual resulta na redução do NADP^+ e formação de ATP (YANG *et al.*, 2000).

A soma da luz absorvida pelas células no fotobiorreator depende de muitos fatores incluindo posição específica da célula num determinado instante, densidade da cultura e pigmentação das células (RUBIO *et al.*, 2003).

Um dos modos de obtenção de energia para o metabolismo da *S. platensis* é a fotossíntese e, para a sua realização é necessário água, dióxido de carbono e luz. No processo fotossintético ocorre o fenômeno de captação de luz e outro conhecido como oxido-redução (NELSON; YOCUM, 2006).

A absorção da luz, na faixa de 400-700 nm, por pigmentos fotossintéticos absorve a energia de um fóton de dado comprimento de onda e, então, utiliza essa energia para iniciar uma cadeia de eventos da fase fotoquímica da fotossíntese. Esses pigmentos, tais como, clorofila, carotenóides e bilinas, estão organizados em complexos fotossintéticos e têm a função de antenas captadoras de luz. Centenas de pigmentos antenas funcionam juntos para direcionar o processo para as etapas seguintes, ou dissipam o excesso de energia para diferentes rotas (ADIR *et al.*, 2003).

A faixa do espectro de absorção, que é utilizada pelos organismos fotossintetizantes como fonte de energia para as suas atividades metabólicas, é comumente chamada de Radiação Fotossinteticamente Ativa (PAR, do inglês Photosynthetically Active Radiation). A Densidade de Fluxo de Fótons (PPFD, do inglês Photosynthetic Photon Flux Density), cuja unidade é $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, expressa a irradiância nesta faixa do espectro.

A fotossíntese oxigênica é catalizada por quatro complexos proteínas-membranas formadas pelo fotossistema II (FSII), citocromo b/f, fotossistema I (FSI) e

ATP sintetase. Esses complexos estão arranjados nas membranas tilacóidais, que nas cianobactérias, distribuem-se de forma concêntrica ou irregular no citossol (NELSON; YOCUM, 2006).

Os fotossistemas são os complexos responsáveis pela conversão da energia luminosa em energia química. Nos organismos que realizam fotossíntese oxigênica, existem dois fotossistemas agindo em série: o fotossistema I (FSI) e o fotossistema II (FSII). O fotossistema II (FSII) é definido como água-plastoquinona oxidoreductase, pois catalisa a transferência de elétrons entre a água e a plastoquinona; o complexo citocromo *b₆f* é definido como plastoquinona–plastocianina oxidoreductase; fotossistema I (FSI) como uma plastocianina–ferredoxina oxidoreductase e a ATPase, ou ATP sintetase, que funciona como uma força próton motriz que direciona a síntese de ATP (NELSON ; YOCUM, 2006) (Figura 3).

Figura 3. Complexos fotossintéticos em membranas de tilacóides.

Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/fotossintese/historico-da-fotossintese.php>

Os FSI e FSII contêm clorofilas e outros pigmentos que absorve a energia luminosa e as direcionam para o centro de reação (RC) (Figura 4). O centro de reação fotossintético do FSI possui proteínas com o centro contendo agregados de Ferro-enxofre (Fe-S) como último aceitor de elétrons e, o FSII possui quinona como último aceitor de elétrons (HEATHCOTE *et al.*, 2003). A energia capturada pelo centro de reação induz a excitação de um par especial de clorofila, na qual inicia a translocação de um elétron através da membrana. Água, doadora de elétrons para esse processo, é oxidada fotoquimicamente a O_2 , liberando 4 H^+ e 4 elétrons pelo centro fotooxidativo do FSII (P680). Este é responsável pela conversão da energia luminosa em energia de oxido-redução (McEVOY *et al.*, 2005).

Figura 4. Representação esquemática do fotossistema.
Adaptação Fonte: <http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/cm1504/lightreact.htm>

Os elétrons extraídos da água são lançados para quinona (PQ) formando quinona reduzida (PQH₂) (BARBER, 2006). A quinona reduzida, também conhecida como quinol, pode se dissociar do centro de reação e difundir até o complexo citocromo *b₆f*. O complexo citocromo *b₆f* transfere elétrons da quinona reduzida (PQH₂) até a plastocianina, que é uma proteína periférica móvel que contém cobre e que tem como principal função transferir elétrons do citocromo *b₆f* até o P₇₀₀, centro de reação do Fotossistema I. Esse processo permite a transferência de prótons da face externa para a face interna da membrana tilacoidal e a criação de gradiente eletroquímico de prótons através da membrana. Energia luminosa absorvida pelo FSI (P700) induz a transferência de elétrons da plastocianina, localizada na face interna da membrana, para a ferredoxina, localizada na face externa (NELSON; BEN-SHEM, 2002). Outra proteína associada ao Fotossistema I é a flavoproteína ferredoxina-NADP oxidoreductase, que reduz o NADP⁺ a NADPH₂, completando a sequência do transporte não-cíclico de elétrons, que começa com a oxidação da molécula de água (NELSON; YOCUM, 2006). A redução da ferredoxina é subsequentemente usada em numerosas reações de síntese e ciclos regulatórios, incluindo assimilação de nitrato, desnaturação de ácido graxo e produção de NADPH (McCARTY *et al.*, 2000; CHITNIS, 2001). Essas reações só ocorrem na presença de luz. Independentemente da presença de luz, a redução do CO₂ a

carboidratos, ciclo de Calvin, ocorre devido a presença de ATP e NADPH (NELSON; YOCUM 2006).

A diferença de carga entre FSI e o FSII, juntamente com a transferência de elétrons através do complexo citocromo *b₆f*, induz a formação de um potencial eletroquímico através da membrana, na qual potencializa a síntese de ATP por um complexo de quatro proteínas denominadas de ATPase (McCARTY *et al.*, 2000).

Figura 5. Representação esquemática da fase fotoquímica.

Adaptado Fonte: <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect10.htm>

O controle metabólico do consumo de energia, isto é, a soma de energia capturada pelo aparato fotossintético e estocada na forma de energia química, a taxa de fixação do carbono e a produção de biomassa, é um processo mediado por enzimas. Isto implica que a taxa máxima do consumo de energia depende da natureza do micro-organismo (RUBIO *et al.*, 2003). A reação de captura de luz é muito mais rápida que as reações subsequentes mediada por enzimas, a taxa máxima da fotossíntese deve ser controlada pela concentração de uma das enzimas do ciclo de Calvin (SUKENIK *et al.*, 1997; RUBIO *et al.*, 2003).

Alguns autores como Hirata *et al.*, (1998) e Chojnacka; Noworyta (2004a) identificaram regiões que correlacionam o crescimento da *Arthrospira ssp.* e a intensidade luminosa. Essas regiões são:

Região limitada por luz: baixa intensidade luminosa, onde ocorre um aumento da concentração celular com um aumento da intensidade luminosa;

Região saturada por luz: alta intensidade luminosa, onde o crescimento celular independe da intensidade luminosa;

Região inibida por luz: a intensidade luminosa é muito alta inibindo o crescimento celular e, até mesmo pode provocar a morte celular.

A intensidade luminosa é fundamental para que ocorra o metabolismo fotossintético, mas, por outro lado, altas intensidades luminosas podem danificar o complexo fotossintético levando a morte celular. Esse processo é denominado de fotoinibição (RUBIO *et al.*, 2003). O excesso de luz pode danificar o centro de reação dos fotossistemas II (SAMUELSSON, 1985; LU; VONSHAK, 1999) e/ou fotossistema I (SONOIKE, 1996).

A fotoinibição é um estado de estresse fisiológico que ocorre em todos os organismos fotossintetizantes envolvendo o oxigênio causado devido a um excesso de iluminação. A danificação ocorre primeiramente no centro de reação do fotossistemas II, reduzindo abruptamente a eficiência do transporte de elétrons fotossintético somente quando a taxa da danificação excede ao do seu reparo, na qual requer o *turnover* da síntese das proteínas do PSII. A inibição pela luz pode envolver a participação de todas as atividades realizadas pelo sistema fotossintético tais como degradação e substituição dos componentes e organização da unidade funcional (ADIR *et al.*, 2003).

A fotoinibição ocorre quando o sistema antena absorve luz em excesso, danificando o sistema fotossintético. O excesso de excitação pode ser obtido por um aumento da intensidade luminosa acima do nível de saturação da taxa fotossintética (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004a). Portanto, isso também pode ocorrer em condições moderadas de intensidade luminosa se as células adaptadas a baixa intensidade luminosa forem transferidas a maiores intensidade luminosas (RUBIO *et al.*, 2003) ou se taxa fotossintética estiver limitada por fatores de estresse como baixas temperaturas (GOMBOS *et al.*, 1994) e/ou excesso de sal no meio (LU; ZHANG, 2000) o que pode induzir a fotoinibição em condições de luz moderada (SAMUELSSON, 1985).

A danificação do fotossistema II consiste na inativação dos sistemas que envolvem oxigênio, carreadores de elétrons, e proteínas D1/D2 (RUBIO *et al.*, 2003). No FSI, a inibição, é iniciada pela inativação do aceptor de elétrons, seguindo com a destruição do centro de reação e degradação do produto do gen *psaB*, que é uma das duas maiores subunidades peptídicas do complexo do centro de reação do FSI. Baixas temperaturas e estresse oxidativos são características requeridas para a fotoinibição do FSI *in vivo* (SONOIKE, 1996).

Adir *et al.* (2003) relataram que a fotoinibição é observada tanto sob altas intensidades luminosas, quando o mecanismo de reparo de proteínas atinge sua

capacidade máxima, ou em baixa intensidade luminosa quando fatores externos adicionais prejudicam seu reparo e a exposição a alta intensidade luminosa prolongada induz a um excesso de efeitos secundários, que contribui para uma redução na capacidade fotossintética.

Fatores como efeito sombreamento em culturas densas de células, a remoção de O₂ e o aumento da concentração de CO₂ podem proteger os micro-organismos contra o efeito fotooxidativo (ELOFF *et al.*, 1976).

Van Eykelenburg (1979) observou que a intensidade luminosa não afeta as características morfológicas, como o tamanho da hélice e o diâmetro, da *S. platensis* e que a concentração dos grânulos de poliglicano diminui com o aumento da intensidade luminosa.

Bezerra *et al.* (2008) observaram que os teores de lipídios e proteínas obtidos nas biomassas finais foram influenciados pela intensidade luminosa, menores intensidades luminosas conduziram a um aumento no conteúdo total de lipídios e de proteínas.

2.4.2.1 Pigmentos

Para a energia luminosa ser utilizável pelos organismos fotossintéticos, ela deve inicialmente ser absorvida por pigmentos específicos, tais como clorofila, carotenóides e ficobilinas. Esses pigmentos encontram-se associados a proteínas nas lamelas fotossintéticas, formadas por tilacóides. Isso permite uma disposição espacial que torna muito eficiente a propagação de energia absorvida (MARZOCCO; TORRES, 1999).

Nas cianobactérias, tais como *A. platensis*, a fotossíntese ocorre principalmente nas membranas tilacoidais onde estão localizados os pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, carotenóides e ficocianina (COGNO *et al.*, 2003). As lamelas tilacoidais são duas linhas paralelas em formato de disco fechado, onde estão localizados a clorofila celular (clorofila *a*) e os carotenóides (VAN; YKELENBURG, 1979).

O aparato fotossintético das cianobactérias consiste principalmente de três tipos de complexos macromoleculares: fotossistema I, fotossistema II e os ficobilissomos. O FSI e o FSII são complexos intrínsecos onde os ficobilissomos estão sobre a superfície externa dos tilacóides na forma de esferas (GANTT, 1981; LIU *et al.*, 2005). Os ficobilissomos auxiliam na absorção da energia luminosa em

um intervalo do espectro maior que as clorofilas absorvem (500-680 nm) permitindo as espécies que possuem essas antenas a utilizar todo o intervalo da luz visível emitido pelo sol (KUMAR; MURHTY, 2007)

Os ficobilissomos estão unidos nas lamelas tilacoídais e funcionam como antenas captadoras de luz, que transferem a energia excitante para o centro de reação dos fotossistemas (VAN EYKELENBURG, 1979). A maior parte da energia luminosa é absorvida por complexos pigmentos-proteínas chamados de ficobilissomos. Os componentes dos ficobilissomos, as ficobiliproteínas, são responsáveis pela pigmentação verde-azulada da maioria das cianobactérias. Os ficobilissomos são agregados de alto peso molecular compostos por ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina (com pico de absorbância de 615 nm, 650 nm e 565 nm, respectivamente). Com o aumento da intensidade luminosa, os ficobilissomos são menos abundantes (VAN EYKELENBURG, 1979).

As ficobiliproteínas, presentes nos grânulos de ficobilissomos, podem constituir mais de 60% de proteína solúvel em cianobactérias (HOUMARD, 1994). Isso é o que caracteriza a *Spirulina* spp. por ser comercializada como um suplemento alimentar rico em proteínas (TANDEAU de MARSAC; HOUMARD, 1993). As ficobiliproteínas purificadas possuem uma variedade de funções, como substituinte de corantes sintéticos em alimentos e produtos cosméticos, sondas para métodos de imunodiagnósticos, citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (STANIER e COHEN-BAZIRE, 1977; SPOLAORE *et al.*, 2006).

As maiores classes da ficobiliproteínas são: ficoeritrina (PE), ficoeritrocianina (PEC), ficocianina (PC), e aloficocianina (APC) (CIFERRI, 1983). A absorção máxima são 540–570, 570–590, 610–620, e 650–655 nm para PE, PEC, PC, e APC, respectivamente (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977; CIFERRI, 1983).

Além das ficobiliproteínas, as cianobactérias contêm as clorofilas e os carotenóides para absorção de energia luminosa. Entre os carotenóides encontram-se o β -caroteno, o mais importante, e as xantofilas que são carotenos oxigenados (MARZZOCO; TORRES, 1999).

As clorofilas são os pigmentos naturais presentes nas plantas, cianobactérias e algas. O nome clorofila foi proposto por Pelletier e Caventou, em 1818, para designar a substância verde que se podia extrair das folhas com o auxílio do álcool. Atualmente os pigmentos clorofilianos são de grande importância comercial, podendo ser utilizados tanto como pigmentos quanto como antioxidantes. Os

pigmentos fotossintéticos presentes e a sua abundância variam de acordo com a espécie. A clorofila *a* (Chl *a*) está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica. As bactérias fotossintetizantes são desprovidas de clorofila *a* e possui em seu lugar a bacterioclorofila como pigmento fotossintético. A Chl *a* é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios (STREIT *et al.*, 2005). As cianobactérias possuem clorofila *a* e ficobilinas, mas não possuem a clorofila *b* (GRIFFITHS, 2006).

As clorofilas são as moléculas fotorreceptoras mais importantes. São moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o Mg (magnésio) (Figura 6). Esse composto é uma estrutura macrocíclica assimétrica totalmente insaturada constituída por quatro anéis de pirrol. Esses anéis numeram-se de 1 a 4 ou de “a” a “d”, de acordo com o sistema de numeração de Fisher (SCHOEFS, 2002). A clorofila *a*, o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH₃) no Carbono 3. A estrutura química da clorofila está representada na Figura 6.

Figura 6. Representação esquemática da molécula da clorofila *a*

Fonte: <http://138.192.68.68/bio/Courses/biochem2/Photosynthesis/Photosynthesis1.html>

Os pigmentos que absorvem luz fazem parte de complexos protéicos que atravessam a membrana tilacoidal denominados de fotossistemas. Esses são unidades funcionais das reações da fotossíntese. Cada fotossistema pode conter várias moléculas de clorofila, carotenóides e ficobilinas, todas capazes de absorver luz, por isso denominada de moléculas-antena. Os carotenóides e as ficobilinas apresentam absorção em região do espectro luminoso em que as clorofilas

absorvem pouco, e isso permite a ampliação do espectro luminoso utilizado na fotossíntese (MARZOCCO; TORRES, 1999).

A composição de pigmentos da *Spirulina* é típica de uma cianobactéria, a única clorofila presente é a clorofila *a*, que tem seu peso variando entre 0,8 e 1,5% do peso seco. As proteínas que possuem maior potencial econômico são as biliproteínas. Nas *Spirulinas*, existem duas biliproteínas, *c-ficonianina* e a *aloficocianina*. A fração protéica pode conter mais de 20% de ficocianina, um pigmento azul solúvel em água (VONSHAK, 1997). Entre os carotenóides, 67-79% é constituído do β -caroteno. As maiores dos carotenóides da *Spirulina* são β -caroteno, β -cryptoxantina e zeaxantina (LORENZ, 1999).

Os carotenóides, carotenos e xantofilas, além de sua função de absorver energia luminosa, são capazes de dissipar a energia de excitação excedente na forma de calor evitando danos ao aparato fotossintético. Enquanto que como transdutores de energia até o centro de reação não são muito eficiente (30% - 40% de eficiência) como dissipadores de energia absorvida em excesso pela clorofila são altamente eficientes (MANRIQUE, 2003).

A zeaxantina é capaz de receber a energia diretamente da clorofila excitada e dissipa-lá posteriormente na forma de calor, sem emissão de radiação. O processo se inverte quando a luz desaparece ou vai se tornando menos intensa progressivamente, finalizando o ciclo. A dissipação da energia é devido a zeaxantina (MANRIQUE, 2003).

Os pigmentos acessórios são fundamentais para a realização da fotossíntese pelos organismos. Algas que possuem apenas a clorofila *a* como *Ochromonas malhamensis* e a *Nannochloris oculata* crescem mais rapidamente em presença de substrato orgânico que em presença apenas da luz como fonte de energia, mesmo sob condições ótimas de luz. Os pigmentos acessórios atuam somente absorvendo energia, contribuindo para a fotossíntese (BRODY; BRODY, 1962).

No entanto, a captação de energia para a função fotossintética não é a única função dos pigmentos fotossintéticos, estes são sistemas fotoprotetores quando a intensidade luminosa é excessiva. Quando nem todos os fótons absorvidos pela clorofila podem ser utilizados no processo fotoquímico, é desencadeado um mecanismo para dissipar o excesso de energia e evitar danos as membranas fotossintéticas e a própria clorofila, resultando em um branqueamento das células com uma conseqüente redução ou perda da capacidade fotossintética. Na presença

de excesso de luz, o oxigênio reage com a clorofila excitada originando um oxigênio singlete que é muito mais reativo podendo oxidar as clorofilas (branqueamento), os ácidos graxos polinsaturados que forma peróxidos e outros compostos. Então os carotenóides dissipam o radical peróxido e também a clorofila excitada adquirindo o estado triplete que por sua vez se dissipa despreendendo calor para o meio externo (MANRIQUE, 2003)

2.4.3 Fontes de carbono

De acordo com Chojnacka e Márquez-Rocha (2004b), a fonte de carbono empregada e a utilização ou não de energia luminosa podem classificar os cultivos em:

Cultivo heterotrófico – emprego exclusivo de compostos orgânicos como fonte energética. O carbono orgânico serve tanto como fonte energética quanto para a formação da biomassa;

Cultivo autotrófico (ou fotoautotrófico) – emprego da luz como exclusiva fonte energética, para a redução (fixação) do CO₂ (considerado de fonte inorgânica) formando substâncias orgânicas;

Cultivo mixotrófico – utilização simultânea de uma fonte luminosa e carbono orgânico como fonte de energia.

2.4.3.1 Fonte de carbono orgânico (crescimento heterotrófico)

A *A. platensis* cresce principalmente em meios de cultura contendo carbono inorgânico e poucos trabalhos têm sido publicados utilizando apenas fonte de carbono orgânico. Como fonte orgânica de carbono, os açúcares são os substratos mais utilizados para os cultivos heterotróficos e mixotróficos (ZHANG *et al.*, 1998; MARQUEZ *et al.* 1993; CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004b; MÜHLING *et al.*, 2005; ANDRADE; COSTA, 2007).

Ogawa and Terui (1970) foram os primeiros a relatar que uma cultura axênica de *Spirulina platensis* cresce em meio mineral enriquecido com 1% de peptona e tem uma taxa de crescimento maior que as culturas cultivadas em meio mineral. Marquez *et al.* (1993) relataram que a *Spirulina platensis* cresce heterotroficamente sob glicose em condições aeróbias no escuro bem como mixotroficamente na presença de luz. Chojnacka e Noworyta (2004a) também observaram o crescimento

da *S. platensis* em condições heterotróficas utilizando a glicose com fonte de carbono e energia.

S. platensis podem utilizar também glicerol como a única fonte de carbono, no entanto, as células, quando em contato com o glicerol pela primeira vez, formam agregados de células e passam por uma fase lag de adaptação. Após a sua sub-cultura, as células cresceram utilizando glicerol atingido 128,7 mg L⁻¹ e nos cultivos com apenas bicarbonato como fonte de carbono obteve 115,7mg L⁻¹ (NARAYAN *et al.*, 2005).

Por outro lado, Soundarapandian e Vasanthi (2008) relataram que diferentes cepas de *S. platensis* isoladas de solo são incapazes de utilizar apenas fontes de carbono orgânico como D-glucose, manitol, sacarose e uréia.

2.4.3.2 Fonte de carbono inorgânico (Crescimento autotrófico)

Microalgas fototróficas requerem CO₂ como fonte de carbono e este, contribui para o controle do pH no meio. O pH do meio de cultivo é um dos fatores mais importantes no cultivo de algas. O pH determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio e influencia direta ou indiretamente o metabolismo das algas. O pH depende de vários fatores, como composição e capacidade tamponante do meio, quantidade de dióxido de carbono dissolvido, temperatura (que determina a solubilidade do CO₂) e atividade metabólica das células (BECKER, 1995).

A fonte de carbono principal para a *A. platensis* é o íon bicarbonato, no qual entra na célula por transporte ativo. O bicarbonato intracelular é então desidratado via anidrase carbonica para CO₂, o qual é incorporado no ciclo de Calvin via ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (RUBISCO). Este carbono é usado simultaneamente para a síntese de todas as macromoléculas nas células (proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos) a partir do 3-fosfoglicerato como metabólito intermediário (COGNE *et al.*, 2003).

Durante o cultivo autotrófico da *Spirulina* sp. ocorre um rápido aumento do pH no meio de cultura, e isso é causado pela dissociação do ácido carbônico (H₂CO₃) em bicarbonato (HCO₃⁻) e OH⁻ (KIM *et al.*, 2007) e o bicarbonato é dissociado para produzir CO₂ e OH⁻ (RICHMOND; GROBBELAAR, 1986). O aumento do pH atua como um autoinibidor do crescimento celular (RICHMOND, 2000), e portanto, o CO₂ pode ser utilizado para a manutenção do pH ótimo.

Em cianobactérias alcalofílicas, onde o pH de crescimento típico é 10, a concentração de CO₂ é negligenciada, sugerindo que o transporte de CO₂ passivo não poderia contribuir significativamente para carbono inorgânico intracelular. Adicionalmente, estudos têm mostrado que *A. platensis* é fortemente dependente do transporte simporte Na⁺/HCO₃⁻ para a assimilação do carbono inorgânico. Como é típico de alcalofílicos, a *A. platensis* aparentemente não mantém o gradiente de pH externo positivo na sua membrana plasmática. Consequentemente, ocorre uma extrusão de sódio via bomba de sódio dependente de ATP, em contraste com o transporte antiporte Na⁺/H⁺ na maioria das cianobactérias. A Extrusão de sódio na presença de um inibidor do FSII (diuron) indica que uma soma significativa de ATP é suplementada pelo transporte de elétrons cíclico em volta do FSI, conteúdo na qual em *A. platensis* é excepcionalmente alto (BERRY *et al.*, 2003).

Análises químicas têm mostrado que biomassa algal consiste de 40% a 50% de carbono, na qual sugere que 1,5 a 2 kg de CO₂ são necessários para produzir 1 kg de biomassa (SOBCZUK *et al.*, 2000). Do mesmo modo, Chisti (2007) relata que, considerando que a biomassa microalgal possui aproximadamente 50% de carbono em sua biomassa seca (SÁNCHEZ MIRÓN *et al.*, 2003), todo esse carbono é derivado do dióxido de carbono. A produção de 100 toneladas de biomassa algal fixa em torno de 183 toneladas de dióxido de carbono e este, deve ser suplementado continuamente durante o cultivo iluminado. A adição controlada do CO₂ em respostas aos sinais de sensores de pH minimizam a perda de CO₂ e a variação do pH (CHISTI, 2007).

O sistema de transporte do CO₂ inclui a anidrase carbônica que converte o CO₂ para HCO₃⁻ durante a passagem através da membrana plasmática, havendo um acúmulo de HCO₃⁻ quando o CO₂ é suplementado. A concentração de CO₂ citoplasmático é abaixo do esperado no equilíbrio químico e, de acordo com o modelo proposto pelo mecanismo de concentração de carbono, esse desequilíbrio é relatado pelo fato que a anidrase carbônica está localizada dentro dos carboxissomos, na membrana plasmática e/ou membranas tilacóidais e está ausente no citoplasma (KAPLAN; REINHOLD, 1999).

O CO₂ entra na célula pela difusão passiva e a conversão do CO₂ para o HCO₃⁻ pela anidrase carbônica não permite a sua passagem livremente para fora da célula (CARRIERI *et al.* 2007). A concentração de CO₂ nos carboxissomos é de 50.000 vezes maior que a concentração extracelular. Isso implica em uma resistência a

difusão do CO₂ pela membrana biológica extremamente alta, apesar do CO₂ ser altamente permeável à membrana bilipídica. Geralmente, as algas apresentam um acúmulo de carbono inorgânico menor que em cianobactérias, isso por que a RubisCO das algas apresentam maior afinidade pelo CO₂ (KAPLAN; REINHOLD, 1999).

O CO₂ que entra na célula por difusão passiva é convertido para HCO₃⁻ pela “CA-like” por uma reação dependente de energia e a assimilação ativa do HCO₃⁻, que é contra seu potencial eletroquímico, depende do suplemento da energia metabólica. Essa energia necessária é, provavelmente, dependente do transporte cíclico do elétron em torno do FSI e da atividade do FSII (SOBCZUK *et al.*, 2000). Portanto, isso ainda não tem sido estabelecido se esta dependência é direta ou indireta (via gradiente de íons). A energia metabólica deveria ser utilizada para manter o gradiente de íon. O antiporte Na⁺/H⁺ está envolvido na regulação e manutenção do pH interno durante a entrada do HCO₃⁻ e subsequente fixação do CO₂ (KAPLAN; REINHOLD, 1999).

As microalgas podem fixar carbono a partir de diferentes fontes, tais como: CO₂ a partir da atmosfera, CO₂ a partir da exaustão de gases industriais, e CO₂ na forma de carbonatos solúveis (e.g., NaHCO₃ e Na₂CO₃). Tradicionalmente, microalgas são cultivadas em reatores fechados ou abertos, na qual são aerados ou expostos ao ar para permitir que a microalgas capturem o dióxido de carbono a partir da atmosfera para o crescimento celular. Como a atmosfera contém somente 0,03 – 0,06% de CO₂, é esperado que a limitação da transferência de massa possa reduzir a velocidade do crescimento das microalgas (CHELF *et al.* 1993). Por outro lado, gases da exaustão industrial tais como gases de combustão possuem acima de 15% de CO₂, fornecendo uma fonte rica de CO₂ para o cultivo de microalgas e um caminho potencialmente mais eficiente para biofixação de CO₂. Outra alternativa é fixar o CO₂ pela reação química para produzir carbonatos (exemplo Na₂CO₃) e usa-la mais tarde como fonte de carbono para o cultivo de microalgas (WANG *et al.*, 2008).

Estudos sobre a eficiência da utilização de CO₂ por microalgas têm sido feitos com o objetivo de melhorar a produtividade dos fotobiorreatores. Morais e Costa (2007b) observou que uma concentração de *Spirulina* sp. foi maior em cultivos alimentados com 6% e 12% CO₂ quando comparado ao cultivo utilizando somente o ar atmosférico. Watabane e Hall (1996) relataram um aumento na produtividade,

correspondendo a 15,9 g de biomassa seca $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$ no cultivo utilizando o fotobiorreator com *air lift* com ar enriquecido de CO_2 (4%).

Gordillo *et al.*, (1999) observaram uma redução na concentração celular máxima de *S. platensis* devido a redução na quantidade de proteínas solúveis, clorofila *a*, carotenóides totais e ficocianina nos cultivos enriquecido com 1% de CO_2 em relação aos cultivos enriquecidos com CO_2 atmosférico (0,035%). Portanto, altas concentração de CO_2 podem inibir o crescimento dos micro-organismos.

Em cultivo fotoautotrófico de *Chlorella* o conteúdo de proteínas e pigmentos foram maiores quando comparada com o cultivo heterotrófico (OGBONNA; TANAKA, 1997).

2.4.3.3 Fonte de carbono inorgânico e orgânico simultaneamente (crescimento mixotróficos)

A presença do metabolismo fotoautotrófico e heterotrófico simultâneo têm sido confirmado para o crescimento de microalgas, como por exemplo *Chlorella vulgaris* (MÁRQUEZ *et al.*, 1993), *Haematococcus pluvialis* (KOBAYASHI *et al.*, 1992; MÁRQUEZ *et al.*, 1993), *Chlorella pyrenoidosa* (OGBANNA; TANAKA, 1996), *Euglena gracilis* (OGBONNA *et al.*, 1999), *Phaeodactylum tricornutum* (CÉRON GARCIA *et al.*, 2000) e cianobactérias, como *Spirulina platensis* (MARQUEZ *et al.*, 1995; CHOJANACKA; NOWORYTA, 2004; ZHANG *et al.*, 1998).

Durante o crescimento mixotrófico há dois processos metabólicos independentes dentro das células, metabolismo fotossintético e a respiração aeróbia. Nesse tipo de metabolismo a presença do substrato orgânico significa que o crescimento celular não é estritamente dependente da fotossíntese e, até mesmo, a luz pode deixar de ser um fator indispensável para o crescimento celular (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004a).

É interessante notar que o crescimento específico de algumas microalgas (ex. *Chlorella vulgares*, *Haematococcus pluvialis*) crescendo mixotroficamente é a soma de suas velocidades específicas de crescimento em culturas fotossintéticas e heterotróficas (LEE, 2001; OGBONNA *et al.*, 2000).

Um possível modo para obter uma alta concentração de micro-organismos fotossintéticos e/ou produtos desses micro-organismos é o uso de cultura mixotrófica, onde fontes de carbono orgânicas e inorgânicas são concomitantemente fornecidas ao biorreator. Sob determinadas condições de cultivo, ambas a atividade

fotoautotrófica e a heterotrófica podem ocorrer simultaneamente e independentemente, resultando no aumento da velocidade específica de crescimento como já referido anteriormente.

Márquez *et al.* (1993) relatam que a *Spirulina platensis* é capaz de crescer em cultivo heterotrófico na presença de glicose bem como mixotroficamente na presença de luz, sugerindo que os crescimentos autotrófico e heterotrófico funcionam independentemente no crescimento mixotrófico. Nieva e Valiente (1996), portanto, observaram uma redução na taxa de fixação de CO₂ em condições de crescimento mixotrófico da *Anabaena variabilis*, sugerindo que alguns aspectos do metabolismo do CO₂ podem ser modulados pela presença de carbono orgânico. Do mesmo modo, Kang *et al.* (2004) observou que pode existir alguma interação entre o metabolismo de carbono orgânico e inorgânico, uma vez que a presença do carbono inorgânico acelerou a assimilação do carbono orgânico durante o cultivo do *Synechococcus* sp. PCC7002. A intensidade luminosa favoreceu o crescimento mixotrófico do *Synechocystis* sp. PCC 6803 utilizando glicose como fonte de carbono. Este fenômeno pode ser explicado pelo efeito positivo da luz sobre o fotossistema I (WANG *et al.*, 2002). A via glicolítica, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e a fosforilação oxidativa mitocondrial mantiveram alta atividade nos cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* durante a iluminação, indicando pouco efeito da luz nessas vias metabólicas. Portanto, o fluxo através da via das pentoses fosfato durante a iluminação foi muito pequena devido a regulação mediada pela luz (YANG *et al.*, 2000).

Adicionalmente, Márquez *et al.* (1993) concluíram que a *Spirulina platensis* tem a habilidade de realizar a fermentação, embora só utilize essa estratégia como um modo de sobrevivência sob condições anaeróbicas e no escuro.

Nos cultivos de *S. platensis* suplementados com glicose alcançaram o crescimento maior que nos cultivos sob condições de crescimento fotoautotróficos (MARQUEZ *et al.* 1995; 1993). Chen *et al.*, (2006) observaram que a suplementação de acetato como fonte de carbono proporcionou um aumento significativo da concentração celular e da produção de clorofila a, luteína, β -caroteno, ficocianina e aloficocianina quando comparada ao cultivo fotoautotrófico.

O melaço, subproduto da indústria de açúcar que contém mais do que 50% de açúcar, também pode ser um substrato suplementado de baixo custo na produção

industrial para o crescimento mixotrófico de *Spirulina platensis* (ANDRADE; COSTA, 2007).

O emprego de cultivos mixotróficos pode levar as células à síntese de compostos característicos tanto de cultivos fotoautotróficos quanto heterotróficos, como, pode implicar em altas taxas de produção de biomassa (CERON GARCIA *et al.*, 2000). Uma vez que num cultivo mixotrófico, o CO₂ e o carbono orgânico são simultaneamente assimilados, este tipo de cultivo pode ser o processo mais eficiente para a produção de biomassa microalgal, visto que implica em uma economia na energia gasta para a síntese de todo o aparato fotossintético e para a fixação de carbono (LEE, 2004).

2.5 Produção de CO₂ e VOCs proveniente da fermentação alcoólica

A revolução industrial e a intensa utilização dos combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás natural) estão associadas ao elevado nível de vida das sociedades ocidentais. Contudo, as reservas de combustíveis fósseis são limitadas e a sua utilização tem impactos ambientais consideráveis como, por exemplo, o aumento do efeito estufa e as conseqüentes alterações do clima. Neste contexto, o etanol surge como uma alternativa válida em termos de fonte de energia renovável e menos poluente.

Nas últimas décadas, o etanol tem ocupado um lugar de destaque e de grande importância tecnológica, firmando-se como um produto estratégico economicamente por ser amigável com o meio ambiente, pois é um aditivo ao combustível que reduz a emissão de monóxido de carbono, óxido de nitrogênio e hidrocarbonos (WHEALS *et al.*, 1999) e por ser produzido a partir de biomassa renovável como açúcar e amido, atualmente, e materiais de lignocelulose, no futuro (GOLDEMBERG, 2009).

Inicialmente, o objetivo de utilizar o álcool combustível era se tornar independente do mercado do petróleo e reduzir os custos de sua importação. Hoje em dia, a ênfase do uso do etanol combustível está sobre a redução da poluição devido ao protocolo de Quioto para limitar o aquecimento global (WHEALS *et al.*, 1999). Na produção e combustão do etanol de milho pode reduzir em até 12% a emissão de gases causadoras do efeito estufa quando comparado com o uso de combustíveis fósseis (HILL *et al.*, 2006) e quando utilizado etanol de cana-de-açúcar essa redução pode ser de 66% (ANDREOLI; SOUZA, 2006).

O álcool está em expansão por ser um combustível de baixo custo, renovável e cujo emprego como alternativa para a matriz energética mundial está em fase de crescimento. A tendência de aumento da produção de álcool no Brasil ocorre por vários fatores, como aumento da frota de carros bi-combustível (demanda interna), Protocolo de Quioto (demanda externa) e aumento do preço do petróleo. Políticas similares têm sido adotadas pela União Européia, Japão e Estados Unidos (GOLDEMBERG *et al.*, 2007). Por essas razões, a demanda por etanol no mercado internacional tem sido crescente nos últimos anos. O Brasil, além de ser um dos maiores produtores e consumidores de etanol, é também o maior exportador no cenário global. Segundo dados da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (Unica) até 2016 o Brasil produzirá 12,9 bilhões de litros de etanol para o mercado externo. Na safra 2008/2009, o total de etanol produzido foi de 27,5 bilhões de litros (ÚNICA).

O Brasil e os Estados Unidos são líderes mundiais na produção de etanol, utilizando como matéria prima a cana-de-açúcar e milho, respectivamente. Os dois países acumulam cerca de 70% da produção mundial (ROMERO, 2007). Além disso, o Brasil lidera a produção mundial de cana-de-açúcar (principal matéria-prima do etanol), sendo essa uma indústria que movimenta vários bilhões de dólares por ano. O fato de o etanol ser produzido dentro do Brasil, representa uma menor dependência de petróleo externo, diminuindo substancialmente os gastos com importações.

O agronegócio da cana-de-açúcar movimenta R\$ 40 bilhões por ano no país. A safra 2007/2008 ficou entre 547 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, 15,2% a mais do que a safra anterior. Metade dela é destinada à fabricação de etanol, o que faz do Brasil o segundo maior produtor de combustível no mundo. O primeiro lugar cabe aos Estados Unidos, que extraem etanol de milho a poder de pesados subsídios. Dois terços da produção nacional estão no estado de São Paulo. Avalia-se que o Brasil precisará dobrar sua produção num horizonte de 5 a 7 anos se quiser suprir as demandas locais e internacionais do combustível. Isso exigirá a construção de novas usinas, o crescimento das áreas plantadas, melhorias no manejo e principalmente, ganhos de produtividade (MARQUES, 2008).

O cenário futuro mostra que países como Estados Unidos, Japão e Europa vão precisar importar mais de 10 bilhões de litros de etanol até 2011/12. Se uma tonelada de cana produz 88 litros de etanol, precisaria adicionar mais de 110 milhões de toneladas de cana para atender o mercado futuro, o que acrescentaria

mais 1,2 milhões de hectares. A UNICA (União da indústria de cana-de-açúcar) prevê um crescimento da produção de 6 a 7% anualmente, chegando a uma produção de 560 milhões de toneladas de cana em 2010/11 (ANDREOLI; SOUZA, 2006)

A quantidade de CO₂ liberada diretamente para a atmosfera devido ao aumento da sua produção mundial pode causar prejuízos ao meio ambiente. No Brasil, a produção de etanol por processos fermentativos, principalmente pelo processo descontínuo alimentado ou contínuo, utilizando mosto de melaço de cana-de-açúcar e/ou caldo de cana-de-açúcar, tem no cultivo da *Saccharomyces cerevisiae* um grande impacto no âmbito socioeconômico. Existem cerca de 300 indústrias que utilizam fermentação alcoólica no Brasil, que movimentam bilhões de dólares e geram 6% dos empregos totais do País (União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, 2006).

No Brasil, 70% das destilarias de cana-de-açúcar usam o processo descontínuo com uma capacidade fermentativa acima de 1,5 milhões de litros de etanol por dia, e aproximadamente 350 destilarias usam a fermentação contínua (WHEALS *et al.*, 1999). Estudos comparativos e avaliações econômicas de diversos processos utilizados na produção de etanol concluíram que fermentação contínua apresentava uma redução de 57% no investimento de capital fixo em destilarias quando comparado ao daquelas que utilizam processo em batelada. Uma redução ainda maior, de 68 e 71%, é obtida para os processos que utilizam reciclo de células e operação a vácuo, respectivamente (CYSEWSKI; WILKE, 1978).

A fermentação contínua apresenta menor custo de investimento, maior facilidade para a instalação de sistemas de automação e ausência de “tempos mortos” que é o tempo em dado momento do ciclo fermentativo não está produzindo, típico de processos descontínuo. Além disso, a fermentação contínua tende a consumir menos anti-espumante, decorrência da alimentação mais estável de açúcar para o processo e também da geometria dos fermentadores. Por outro lado, a fermentação contínua apresenta maiores dificuldades quando temos que lidar com contaminantes indesejáveis no processo. Não é possível promover a assepsia de fermentadores, de bombas e de trocadores com frequência como ocorre no sistema em bateladas. Desta maneira, a fermentação contínua tende a consumir mais ácido sulfúrico e mais antibiótico.

Segundo Romano *et al.* (2003), as transformações químicas que ocorrem durante a fermentação por leveduras são a conversão dos açúcares em etanol e CO₂ e, em menores quantidades, a formação de CVOs. Basso *et al.* (1996) relata que, durante a fermentação alcoólica por levedura os produtos da fermentação são constituídos de 43 – 47% de etanol, 41 - 45% de gás carbônico e o restante são formados por outros compostos orgânicos, tais como glicerol, ácido succínico, ácido acético, entre outros. Dentre os voláteis orgânicos majoritários produzidos durante a fermentação de mosto de cana-de-açúcar por *Saccharomyces cerevisiae* encontram-se o etanol, acetaldeído, propanol, isobutanol, álcool isoamílico, acetato de etila (CACHOT *et al.*, 1991). Durante a fermentação alcoólica do mosto de cana-de-açúcar, os principais componentes gasosos são o CO₂ e o etanol, mas outros álcoois e ácidos também são liberados, em menores quantidades, na forma gasosa (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003).

A reação química simplificada da produção de etanol a partir da sacarose da cana-de-açúcar é:

Onde 342 g de sacarose produz 184 g de etanol e 176 g de CO₂. Com isso, pode-se estimar que cada grama de sacarose produz 0,514g de CO₂, assumindo uma recuperação de CO₂ em 100%, no caso de indústrias dedicadas a produção de etanol. No entanto, as indústrias de produção de etanol também utilizam como matéria-prima o melaço, um sub-produto da produção de açúcar industrial a partir da cana-de-açúcar que contém cerca de 15% da sacarose inicial (MOLLERSTEN *et al.*, 2003) e representa mais de 75% do custo total de produção de etanol (CYSEWSKI: WILKE, 1978).

Cada litro de etanol produzido pela fermentação alcoólica resulta em aproximadamente 0,76 kg de CO₂, portanto a capacidade de produção de CO₂ durante a fermentação de etanol combustível nos EUA e o Brasil é de aproximadamente 8,4 e 10,6 toneladas de CO₂ por ano, respectivamente (KHESHGI; PRICE, 2005). No Brasil, a produção média de etanol a partir da fermentação alcoólica é de 180 milhões de litros por ano, gerando consequentemente 0,14 milhões de CO₂ por ano (MOLLERTEN *et al.*, 2003).

O uso do biocombustível traz uma série de benefícios associados à redução dos gases de efeito estufa, e de outros poluentes atmosféricos, tais como o enxofre, além da redução do consumo de combustíveis fósseis. Porém, no processo de

fabricação, uma série de resíduos e subprodutos industriais é gerada, os quais podem, quando adequadamente geridos, contribuir para a viabilidade econômica da produção de biocombustíveis. Esses resíduos possuem potencial para uso na indústria de alimentos e para a nutrição animal, bem como na indústria químico-farmacêutica, mas há uma grande carência de estudos de análises de viabilidade técnica e financeira, que possam apontar as melhores alternativas de custo-benefício para o processamento e tratamento desses resíduos, os quais podem agregar valor e reduzir os custos de produção de biocombustíveis, com o aproveitamento e venda destes produtos e seus derivados.

Um número de subprodutos da indústria do etanol combustível pode ter o potencial para a aplicação de nutracêuticos ou de alimentos funcionais, que é uma das áreas de grande interesse atualmente e representa um mercado potencial enorme, ainda em seu desenvolvimento inicial. Por isso, o interesse em utilizar micro-organismos fotossintetizantes devido a sua capacidade de reduzir a emissão de CO₂ e de CVOs na atmosfera, subproduto da indústria de etanol, produzindo compostos de alto valor industrial.

3 Objetivos

Geral

Este trabalho tem como objetivo verificar a influência do efeito da adição de CO₂ proveniente de cilindro ou da fermentação alcoólica, mantendo o pH no valor ótimo igual a 9,5 no cultivo de *A. platensis* em reatores tubulares utilizando nitrato ou uréia como fonte de nitrogênio em diferentes intensidades luminosas.

Específicos

- Avaliar os testes preliminares da fermentação alcoólica contínua utilizada para posterior acoplamento dos gases liberados durante a fermentação, com os cultivos de *A. platensis*.
- Avaliar os parâmetros: concentração celular máxima, produtividade em células e fator de conversão de nitrogênio em células usando análise de variância multivariável nos cultivos de *A. platensis*;
- Determinar a composição centesimal da *A. platensis* no final dos cultivos: teor de proteínas, lipídios, cinzas e carboidratos usando a análise de variância multivariável;
- Estudar os parâmetros bioenergéticos da *A. platensis* durante os cultivos utilizando CO₂ de cilindro, avaliando os andamentos em função do tempo dos parâmetros valor teórico da energia de Gibbs dissipada para o crescimento ($1/Y_{GX}$), das produções molares de O₂, consumo de H⁺ e absorção de fótons para produzir 1 C-mol de biomassa;
- Calcular o rendimento teórico da energia fixada pelo aparato fotossintético, energia transformada em ATP e a energia liberada como calor calculando-se a partir da energia molar de Gibbs absorvida da luz pelo aparato fotossintético;
- Comparar o comportamento celular em duas diferentes configurações de fotobiorreatores tubulares, um horizontal e outro helicoidal.

4 Materiais e métodos

4.1 Fermentação alcoólica contínua

O CO₂ proveniente da fermentação alcoólica contínua foi utilizado como fonte de carbono para o cultivo de *A. platensis*. O desprendimento desse gás do reator foi arrastar voláteis orgânicos formados na fermentação, cujas interferências nos cultivos de *A. platensis* foram avaliadas. Para os cultivos contínuos de fermentação alcoólica, foi utilizado o mosto de melaço de cana-de-açúcar.

4.1.1. Testes preliminares para emprego da fermentação alcoólica contínua

4.1.1.1 Teste para avaliar a influência do tratamento do melaço na determinação da concentração celular

Para a realização desse teste, foi preparada uma suspensão celular de 300g L⁻¹ de levedura úmida em água destilada, a partir dessa suspensão foram retirados, sob agitação, 10 mL e adicionados em dois diferentes frascos, um contendo 290 mL de melaço não clarificado (item 4.1.1.1.1) e outro contendo 290 mL de melaço previamente clarificado (item 4.1.1.1.2), de modo que a concentração celular final de cada frasco tenha 10g L⁻¹ em 300 mL de mosto. A partir dessa suspensão foram retirados 5 mL para a análise da concentração celular, como descrito no item 4.3.1.1

4.1.1.1.1 Melaço não tratado

O melaço não tratado consiste apenas na sua diluição com água potável e preparado como descrito no item 4.1.1.1.3

4.1.1.1.2 Melaço tratado

O tratamento do melaço consistiu de sua prévia clarificação, diluição e suplementação adequadas. A clarificação foi realizada com diluição do melaço pela adição de água potável, em partes iguais, e adição de 1,5 g de fosfato de sódio monobásico, como agente floculante, em cada litro da solução de melaço diluído. Posteriormente, esse melaço diluído foi autoclavado a 121 °C por 10 minutos. Após o aquecimento, foi mantido em repouso, no mínimo por 48 horas, para a sedimentação do material em suspensão. O melaço clarificado foi, então, sifonado,

pronto para ser diluído com água e preparado como descrito no item 4.1.1.1.3, sem a adição do antibiótico. O mosto foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 30 minutos (PEREGO JÚNIOR, 1979).

4.1.1.1.3 Preparação do melaço

O melaço foi diluído até concentração 170 g L⁻¹ em açúcares redutores totais (ART) (GUERREIRO *et al.*, 1997) e suplementado com uréia na concentração de 0,5 g L⁻¹, suficiente para que a fonte de nitrogênio não se torne fator limitante da atividade da levedura (MAGALHÃES, 1978; CARVALHO, 1994; PEREGO-JUNIOR, 1979). O pH do mosto foi ajustado em 4,5 (JONES *et al.*, 1981) pela adição de ácido sulfúrico concentrado ou pela adição de solução de hidróxido de sódio 4N. Por fim, adicionou-se penicilina V ácida (500 UI/L) como antibiótico (AQUARONE, 1960; CARVALHO *et al.*, 2003).

4.1.1.2. Teste para avaliar a homogeneidade do reator

Para a realização do teste de homogeneidade foi preparado 10 litros de uma suspensão celular de 9 g L⁻¹ de levedura em água destilada e adicionada ao fermentador. Após 30 minutos de homogeneização mecânica do material, iniciou uma contínua adição de água destilada e retirada da amostra a uma vazão específica de alimentação calculada (D_c) igual a 0,124 h⁻¹. No intervalo de 30 minutos, em diferentes regiões do reator, as amostras foram recolhidas para determinar a concentração celular. A homogeneidade do reator é verificada, se a queda da concentração celular for uma função exponencial.

4.1.1.3. Teste para determinar a vazão específica de alimentação

Foram realizados 3 experimentos com a fermentação contínua nas condições descritas no item 4.1.5. Os valores de vazão específica de alimentação (D) foram 0,1 h⁻¹, 0,05 h⁻¹ e 0,025 h⁻¹.

4.1.2. Micro-organismo e condições de manutenção.

Saccharomyces cerevisiae CCT7150, uma cepa isolada de planta industrial de fermentação alcoólica nacional (Usina Nova América) e produtora de altas concentrações de etanol a partir de melaço, adquirida da Fundação André Tosello, foi utilizada nos cultivos contínuos. Sua manutenção, em tubo de ensaio, foi no meio Sabourand (Merck®). A cultura foi armazenada sob refrigeração, a 4 °C.

4.1.3. Preparo do inóculo

As células de levedura estocada foram multiplicadas em tubos contendo meio sólido *Sabourand* e incubadas em estufa a 30 °C por 24 h. Posteriormente, as culturas foram inoculadas com alça de platina, sob condições assépticas, em tubos contendo 10 mL do meio *Sabourand* e incubadas em estufa a 30 °C por 24 h. Cada tubo, por sua vez, inoculou um frasco de Erlenmeyer de 500 mL contendo 90 mL de mosto de melaço de cana-de-açúcar contendo 5 % de ART, que foi então incubado a 30 °C por 12 h, em agitador rotativo, a 400 rpm. Decorrido este tempo, o conteúdo de 10 frascos de Erlenmeyer preparados com o pré-inóculo (1 L) foi adicionado à dorna juntamente com o mosto (9 L) nas condições em que se trabalhou no processo contínuo, resultando em um volume útil do fermentador de 10 litros, que deu início a uma fermentação descontínua (PEREGO JÚNIOR, 1979).

4.1.4. Dispositivo para a cultura

Foi utilizado um fermentador fabricado pela INFORs HT, com dornas de vidro de 10 litros de capacidade nominal, com controles de temperatura, pH, nível de espuma e frequência de agitação, com saídas que foram conectadas a uma bomba peristáltica para alimentação do mosto e retirada do material durante a fermentação contínua.

4.1.5. Descrição das condições de fermentação contínua

O cultivo contínuo teve como início o cultivo descontínuo como descrito acima (item 4.1.3). A alimentação contínua do mosto ocorreu após um período de 6 a 8 h da inoculação do *S. cerevisiae* na dorna, para garantir que o micro-organismo se encontre na fase exponencial de crescimento. A concentração de açúcares no mosto de alimentação foi de 170 g L⁻¹ (GUERREIRO *et al.*, 1997), expressa em ART. O mosto foi suplementado com sulfato de amônio, na concentração de 1 g L⁻¹. A temperatura de fermentação foi mantida a 30 ± 1 °C (KOCK *et al.*, 2000), com frequência do agitador de 500 rpm. A vazão específica de alimentação foi determinada em ensaios preliminares (item 6.1).

4.2 Cultivo de *A. platensis*

4.2.1 Micro-organismo e manutenção

Spirulina (Arthrospira) platensis UTEX (1926) foi mantida em meio líquido de cultivo padrão para *Arthrospira* (item 4.2.2.1) em tubos hermeticamente fechados.

4.2.2 Meio de cultivo

Foram utilizados dois tipos de meio. Um meio padrão para o cultivo de *Arthrospira* (SCHLÖSSER, 1982) – item 4.2.2.1, com NaNO_3 como fonte de nitrogênio, que foi utilizado para duas finalidades: manutenção do micro-organismo e preparo do inóculo; um meio modificado (item 4.1.2.2), onde se utilizou uréia como fonte de nitrogênio.

4.2.2.1 Meio padrão para cultivo de *A. platensis*

O meio mineral padrão foi o de Schlösser (1982), cuja composição, por litro de água destilada, é a seguinte:

NaHCO_3	13,61g
Na_2CO_3	4,03g
K_2HPO_4	0,50g
NaNO_3	2,50g
K_2SO_4	1,00g
NaCl	1,00g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,04g
*Solução de metal PIV	6mL
**Solução de micronutrientes Chu	1mL
Vitamina B_{12} (15 μg /100mL H_2O)	1mL

*Solução de metal PIV (em 1 litro de água destilada):

Na_2EDTA	750 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	97 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	41 mg
ZnCl_2	5 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4 mg

****Solução de micronutrientes Chu (em 1 litro de água destilada):**

Na ₂ EDTA	50 mg
H ₃ BO ₃	618 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	19,6 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	44 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	20 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	12 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	12 mg

4.2.2.2 Meio modificado

O meio de Schlösser (1982) foi utilizado com substituição do nitrato de sódio por uréia.

A massa diária de uréia adicionada por unidade de volume foi determinada de acordo com o experimento padrão utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (descrito no item 5).

4.2.3 Preparo do inóculo

A *A. platensis* foi inoculada em 10 mL de meio líquido (em tubo de ensaio), em condições assépticas. Depois de 7 dias, esse material foi utilizado para inocular frascos de Erlenmeyer de 500 mL, com 200mL de meio de cultivo padrão (item 4.1.2.1), previamente esterilizado por autoclavação.

Os erlenmeyers após o repique foram imediatamente levados a agitador rotativo, a 100 min⁻¹ (FERRAZ, 1986), temperatura de 30 °C e iluminância de 72 μmol de fótons m⁻² s⁻¹ (CARVALHO *et al.*, 2004).

O crescimento celular foi acompanhado, sendo utilizada para inóculo uma suspensão de *A. platensis* após de 6 a 8 dias de cultivo (PELIZER *et al.*, 2003), em crescimento exponencial, isenta de contaminação. Nos cultivos utilizando meio mineral padrão, a suspensão foi filtrada, lavada e ressuspensa em meio de cultivo padrão. Nos cultivos utilizando uréia como fonte alternativa de nitrogênio, a suspensão foi filtrada, lavada com solução fisiológica para retirada do NaNO₃ e ressuspensa em meio de cultivo padrão isento de NaNO₃. Estas suspensões foram o inóculo para o cultivo no reator tubular, onde foram realizados os estudos empregando NaNO₃ como fonte de nitrogênio padrão e a uréia como fonte

alternativa de nitrogênio, com o pH do cultivo controlado pela adição de CO₂ proveniente de cilindro ou da fermentação alcoólica.

4.2.4 Dispositivo para cultura

4.2.4.1 Fotobiorreator tubular horizontal

O fotobiorreator tubular utilizado é apresentado na Figura 7. Este é constituído por 20 tubos de vidro transparentes (diâmetro interno de 1,0 cm) (CARLOZZI; PINZANI, 2005), com inclinação de 2% (1,15°) (TREDICI; ZITTELLI, 1998) para facilitar o escoamento do líquido, interligados com mangueiras de PVC de mesmo diâmetro interno, de forma que o volume iluminado corresponde a 2,12 litros (60,6%). O volume total do sistema foi de 3,5 litros. A recirculação de líquido foi de 26 L h⁻¹ para evitar a sedimentação da biomassa e melhorar a transferência de massa.

Na parte mais baixa dos tubos do reator tubular há um tubo na forma de Y que recebe ar proveniente de uma bomba, deslocando a suspensão celular para um frasco na parte superior, provido de agitação com um agitador magnético. Também na parte inferior do reator há uma conexão, no qual ocorre entrada de CO₂ para manutenção de pH quando da abertura da válvula solenóide, controlada por um controlador de pH.

Figura 7. Fotobiorreator tubular horizontal utilizado no cultivo de *A. platensis*

4.2.4.2. Fotobiorreator tubular espiralado

O fotobiorreator tubular espiralado utilizado é apresentado na Figura 8. Este é constituído por 5 conjuntos de tubos espiralados de vidro transparentes (diâmetro interno de 1,0 cm) (CARLOZZI; PINZANI, 2005) interligados com mangueiras de PVC de mesmo diâmetro interno. Cada conjunto é constituído por 3 tubos espiralados, logo o reator contém no total 15 tubos de vidros espiralados, de forma que o volume iluminado corresponde a 665 ml (60,6 %). O volume total do sistema foi de 1,1 litros. A recirculação de líquido foi de 26 L h⁻¹ para evitar a sedimentação da biomassa e melhorar a transferência de massa.

Na parte mais baixa dos tubos do reator tubular há um tubo na forma de Y que recebe ar proveniente de uma bomba, deslocando a suspensão celular para um frasco na parte superior. Também na parte inferior do reator há uma conexão, no qual ocorre entrada de CO₂ para manutenção de pH.

Figura 8. Fotobiorreator tubular espiralado utilizado no cultivo de *A. platensis*

4.2.5 Descrição de um experimento típico de cultivo da *A. platensis*

A suspensão de *Arthrospira* (item 4.3) foi adicionada ao biorreator tubular, na concentração inicial de 400 mg L⁻¹ (SOLETTTO *et al.*, 2008) e o volume de trabalho foi de 3,5 L no fotobiorreator tubular horizontal e de 1,1 L no fotobiorreator tubular espiralado. Devido a evaporação e a retirada de amostras, o meio de cultura isento da fonte de nitrogênio foi adicionado para manter o volume constante.

Nos experimentos, utilizando NaNO_3 como fonte de nitrogênio, a concentração inicial deste foi de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ e ocorreram adições do nitrato de sódio de modo que sua concentração não fosse inferior a 1 g L^{-1} (FAINTUCH, 1989), desta forma evitaria a limitação do crescimento celular pela fonte de nitrogênio. No cultivo utilizando a fonte de nitrogênio alternativa (uréia), a adição diária foi efetuada por pulsos (adição intermitente) (SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2004). As intensidades luminosas foram medidas com um sensor quantum (model LI-190 SB, Li-Cor, Lincoln, Neb., USA). As diferentes fontes de nitrogênio e intensidades luminosas foram pré-estabelecidas de acordo com o plano de trabalho (Item 5).

O valor de pH nos cultivos foi mantido em $9,5 \pm 0,2$ (SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2007; TREDICI; ZITTELLI, 1998), com auxílio de um aparelho controlador de pH METTLER TOLEDO acoplado a uma válvula solenóide. Nos ensaios com CO_2 puro (99,9%), a válvula solenóide estava ligada a um cilindro de CO_2 e nos ensaios com CO_2 proveniente de fermentação alcoólica, a válvula solenóide foi ligada à tubulação proveniente de um reator operando com processo contínuo de fermentação alcoólica em regime permanente.

A temperatura de $29 \pm 1^\circ\text{C}$ (SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2007) foi mantida por ar condicionado que climatizou a temperatura da sala onde está localizada o reator.

No final do experimento, o reator foi lavado com solução de hipoclorito de sódio 5% por 16 h, e com uma solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 50 mM para neutralizar o cloro residual de acordo com De Beer *et al.* (1994).

4.3 Técnicas Analíticas

Na fermentação alcoólica contínua, até o estabelecimento de regime permanente, as determinações de concentração celular, pH, ART, etanol no caldo fermentado foram determinados a cada 12 horas. Estabelecido o regime permanente, as determinações de concentração celular, pH, ART, etanol foram feitas diariamente. O efluente gasoso foi analisado qualitativamente para identificação dos principais compostos voláteis orgânicos.

No cultivo de *Arthrospira*, a concentração celular foi feita diariamente até atingir concentração celular máxima. As medidas de concentração de nitrato, uréia residual, amônia e de carbonato total, em função dos relativos grandes volumes necessários para a execução das técnicas, foram realizadas a cada dois dias. Nos cultivos utilizando o CO_2 proveniente da fermentação alcoólica, foram analisados os

compostos voláteis orgânicos presentes no meio isento de células. A concentração de clorofila **a** foi determinada no final de cada experimento, bem como a determinação de proteínas, lipídios totais, carboidratos e cinzas.

4.3.1. Acompanhamento da fermentação alcoólica

4.3.1.1. Determinação da concentração celular

A concentração celular expressa em massa seca foi determinada por filtração, de acordo com metodologia descrita por Carvalho *et al.*, (2003). Um volume de 5 mL da amostra foi filtrada em membrana millipore 1,2 µm de porosidade, previamente seca em estufa a 105 °C por 4 horas e em dessecador por 1 h e pesada. A biomassa filtrada e lavada com 50 mL de água destilada foi seca em estufa a 105 °C por 4 horas e em dessecador por 1 h e posteriormente pesada. A concentração celular foi determinada por diferença de massa antes e após a filtração.

4.3.1.2 Determinação do pH.

O pH será acompanhado por potenciometria, com um aparelho da marca METTLER TOLEDO.

4.3.1.3 Determinação de ART

A determinação da concentração de ART foi realizada por espectrofotometria, a 540 nm, pelo método de SOMOGYI-NELSON (1952), precedido da hidrólise da sacarose contida na fase líquida do meio de fermentação, realizada pela técnica de Falcone e Marques (1965).

A hidrólise da sacarose foi feita por hidrólise ácida, utilizando 5 mL da amostra e 25 mL da solução de ácido clorídrico 1,3 N e deixou-se em banho de água a 70 °C por 15 minutos. Deixou-se esfriar essa solução até a temperatura ambiente e foi adicionado NaOH 6N até verificar uma mudança no pH, utilizando fenolfitaléina como indicador. Posteriormente, completou-se o volume final para 100 mL com água destilada, diluindo-se, assim, a amostra 20 vezes. A partir dessa solução já diluída, fizeram-se novas diluições necessárias para a determinação do ART pelo método de Somogyi-Nelson (1952).

A análise compreende na adição de 1 mL da amostra convenientemente diluída e 1 mL do reativo de Somogy em tubo de Folin-Wu, onde foi fervido durante 10 minutos, resfriado em água com gelo. Após o resfriamento, adicionou-se 2 mL do reativo de Nelson e agitou-se os tubos em agitador até expulsar os gases formados. Completou-se o volume para 25 mL com água destilada e a solução foi lida em espectrofotometro a 520 nm. Foi feito um branco substituindo a amostra por água destilada.

O açúcar aquecido com uma solução alcalina de tartarato de cobre leva à obtenção de óxido cuproso que, reagindo com molibdato de arsênio, possibilita a produção de um composto de coloração azul passível de ser quantificada por colorimetria, a adição de sulfato de sódio a mistura minimiza a entrada de oxigênio na solução, responsável pela reoxidação do óxido cuproso.

4.3.1.4 Determinação da concentração de etanol

A determinação do etanol foi realizada através do método de oxidação por dicromato de potássio proposto por Joslyn (1907).

O etanol foi determinado mediante a destilação através de um microdestilador de KJELDHAL e recolhido em 20 mL de uma solução de dicromato de potássio fortemente acidulada com ácido sulfúrico. A determinação consiste na destilação de 1 mL do meio fermentado isento de células recolhido na solução de dicromato contida em erlenmeyer, onde o etanol reagiu com os íons dicromato como mostrado na eq. 1, produzindo acetaldeído e íons Cr(III). Conforme o etanol reage, há uma mudança da coloração laranja característica desta solução para um tom esverdeado. A reação de oxidação do etanol com íons dicromato envolve pelo menos duas etapas. Na primeira etapa, o etanol introduzido na solução reage com os íons dicromato produzindo um aldeído, que neste caso é o acetaldeído (reação 4). Na segunda etapa, como o aldeído produzido também é susceptível à oxidação, o acetaldeído é consumido, produzindo ácido acético (um ácido carboxílico), com a correspondente redução dos íons Cr(VI) para íons Cr(III) (reação 5). A reação entre o etanol e os íons dicromato pode ser descrita de forma global como mostrado na (reação 6):

Após a destilação, o erlenmeyer foi levado a um banho de água a 70 °C durante 20 minutos para que se complete a oxidação do etanol. Após esse tempo, deixou-se esfriar até temperatura ambiente e essa solução foi titulada com solução de sulfato ferroso amoniacal. Foi feita, concomitantemente, uma solução utilizando água em vez do destilado para determinar o poder redutor do sulfato ferroso amoniacal.

4.3.1.5 Determinação dos componentes voláteis presentes no gás efluente da fermentação alcoólica contínua.

Os voláteis majoritários liberados durante o regime permanente da fermentação alcoólica foram determinados pelo Laboratório de Análises Químicas do Instituto de Pesquisa Tecnológica (IPT) usando um cromatógrafo a gás (marca Shimadzu, modelo CG-2010) acoplado ao espectrômetro de massas (Shimadzu, Modelo GCMS – QP5050A).

4.3.2 Acompanhamento do cultivo de *A. platensis*

O volume das amostras diárias retiradas para o acompanhamento celular foram de 50 mL. Após a remoção da amostra, igual volume de meio de cultura, isento da fonte de nitrogênio, foi adicionado para manter o volume constante. Similarmente, a evaporação de água diária foi compensada pela adição do meio de cultura.

4.3.2.1 Determinação da concentração celular

4.3.2.1.1 Densidade ótica

O acompanhamento do crescimento celular foi realizado diariamente, em duplicata, por turbidimetria, a 560 nm (LEDUY; THERIEN, 1977). Os valores de transmitância obtidos no espectrofotômetro foram convertidos em concentração celular através de uma curva de calibração (Item 4.3.2.1.2)

4.3.2.1.2 Construção da curva de calibração

A curva de calibração foi obtida tomando-se um volume de 25 mL de uma suspensão concentrada, de células em fase de crescimento exponencial, que foi

filtrada e lavada, com água destilada, em uma membrana de acetato de celulose de 1,2 µm, previamente seca a 70 °C por 12 horas, e previamente pesada. A amostra foi levada à estufa a 100–105 °C por um período de 5 horas, suficiente para que mantivesse uma massa constante. A massa das células foi calculada por diferença dos valores das massas das membranas antes e depois da filtração, e dividido pelo volume filtrado para obter-se a concentração celular na suspensão. A partir desta mesma suspensão, foram preparadas diferentes diluições, e alíquotas dessas diluições foram levadas ao espectrofotômetro para leitura da transmitância a 560 nm de comprimento de onda e caminho óptico de 1 cm, com água destilada como branco. Dessa forma, foi obtida uma curva que relaciona concentração celular com o logaritmo da transmitância (Gráfico 1).

Gráfico 1. Curva de calibração para determinação da concentração celular de *A. platensis*

4.3.2.2 Determinação da concentração de carbonato total

Embora a concentração de carbonato total deva se manter constante em decorrência do fornecimento de CO₂ para a manutenção do pH, foi acompanhado na fase líquida do meio em cultivo.

No meio isento de células, o acompanhamento da concentração de fonte de carbono, na forma de carbonato total, foi através de titulometria. Inicialmente, adiciona-se hidróxido de sódio na amostra (Reação 7) e titula-se com HCl (Reação 8) na presença do indicador fenolftaleína para a conversão de carbonato em bicarbonato. Posteriormente foi titulada novamente com HCl (Reação 9) na

presença do indicador alaranjado de metila para que todo o bicarbonato transforme-se em ácido carbônico, por deslocamento de equilíbrio. O carbonato total foi quantificado pelos dois intervalos de viragem (PIERCE; HAENISCH, 1948).

4.3.2.3 Determinação da concentração de amônia total.

A amônia total foi quantificada no meio isento de células de 2 em 2 dias em potenciômetro marca ORION, modelo 710-A, por meio de um eletrodo seletivo para amônia, modelo 95-12 ORION. Tendo em vista que o eletrodo só é sensível ao íon amônia, e que no pH de cultivo existe equilíbrio entre os íons amônia e amônio, para se fazer a leitura, foi necessário corrigir o pH da amostra para 13 pela adição de NaOH 1,5 M antes da leitura no eletrodo, de forma que todo íon amônio fosse convertido em amônia (LEDUY; SAMSON, 1982). O volume utilizado foi de 15 mL e nesse procedimento foi necessária à calibração do aparelho em todos os dias em que foram realizadas as determinações. Isso foi feito através da construção de uma curva que correlaciona a milivoltagem lida no potenciômetro com soluções de NH_4Cl , em diferentes diluições, com concentrações conhecidas. A partir da equação dessa curva, com a milivoltagem lida na amostra do cultivo, foi calculada a concentração de amônia total. Esta metodologia também serviu para auxiliar na determinação da concentração de uréia, conforme se observa no item a seguir.

4.3.2.3.1 Construção da curva de calibração para determinação da amônia

A metodologia empregada para a determinação de amônia requer a construção de uma curva de calibração para cada dia em que foi analisada a amônia. Desta forma, no Gráfico 2, têm-se uma das curvas de calibração utilizada.

Gráfico 2. Curva de calibração para determinação da concentração de amônia

Nesse caso, a curva de calibração corresponde à $\text{Log} [\text{NH}_3]$: $-0,0213 \times \text{mV} - 1,0583$. A maior diluição da concentração de amônia foi de 5×10^{-6} (cujo o valor de Log é -5,3) que corresponde a um valor de milivoltagem de 182 detectado no eletrodo de amônia.

4.3.2.4 Determinação da concentração de uréia

Para a determinação da concentração de uréia, inicialmente foi hidrolisada em meio ácido, como segue: 10 mL do meio de cultivo isento de células foi submetido a um tratamento com H_2SO_4 (1 mL de H_2SO_4 5 N), a 200 °C, por 6 horas, em bloco digestor Tecnal, modelo TE-106 (CEZARE, 1998). Após esse tempo, o conteúdo presente no tubo onde ocorreu a hidrólise ácida foi quantitativamente transferido para um balão volumétrico de 50 mL, com neutralização do pH com NaOH 1,5 M, utilizando fenolftaleína como indicador, e finalmente o volume completado com água destilada. Desse balão foi retirado um volume de 15 mL para a determinação da concentração de amônia, conforme método descrito no item anterior. Considerando ainda a diluição da amostra, calcula-se a concentração de amônia global, que representa a amônia que já estava presente no meio de cultivo, mais a amônia proveniente da hidrólise da uréia. Assim, por diferença, é possível calcular a concentração de uréia no meio de cultivo.

4.3.2.5 Determinação do pH.

O pH foi acompanhado por potenciometria, com um aparelho da marca METTLER TOLEDO.

4.3.2.6 Determinação de nitrato

A análise de nitrato foi realizada através da adaptação do método descrito por Vogel (2002). Foram pipetados 10 mL do meio isento de células, 10 mL de NaOH (0,5 N) e 700 mg de liga de devarda (50% de cobre, 45% de alumínio, 5% zinco) em balão volumétrico onde foi aquecido em bico de Bunsen durante 1 hora para que todo o nitrato presente na amostra seja reduzido a amônio, como descrito na reação a seguir:

Durante o aquecimento, os íons amônio são despreendidos e recolhidos em uma solução padronizada de 10 mL de ácido clorídrico (0,1 N) formando o cloreto de amônio. Essa solução foi titulada com NaOH (0,05 N) padronizada, usando vermelho de metila como indicador, e a quantificação do amônio formado foi feita por diferença entre a quantidade de HCl inicial e final, depois da destilação. A conversão de volume do ácido titulado (mililitros) em massa de íons nitrato (gramas) foi baseada na informação de que 1 mL de ácido clorídrico 1 N corresponde a 0,06201g de íons nitrato (VOGEL, 2002).

4.3.2.7 Determinação da concentração de etanol

A determinação do etanol foi realizada através do método de oxidação por dicromato de potássio proposto por Joslyn (1907) como descrito no item 4.3.1.4

4.3.3 Avaliação da biomassa de *A. platensis* obtida no final do cultivo.

4.3.3.1. Determinação de Clorofila a

A análise de clorofila **a** foi realizada utilizando uma suspensão celular de 5 mL, correspondente à concentração celular máxima obtida. Essa suspensão foi filtrada e a biomassa foi ressuspendida em 5 mL de metanol e incubada em banho maria a 70°C por 2 minutos. Após esse tempo, a amostra foi filtrada em filtro de

politetrafluoretileno, 1,0 µm de diâmetro (Millipore®) e, o sobrenadante, contendo a clorofila, foi determinado espectrofotometricamente, a 665 nm, adotando-se o procedimento descrito por Vonshak (1997a). A curva de calibração foi feita previamente utilizando clorofila **a** padrão.

4.3.3.1.1 Curva de calibração para a determinação de Clorofila **a**

A curva de calibração foi construída utilizando uma solução de clorofila **a** padrão (Sigma®) obtida comercialmente, em metanol. A partir dessa solução, foram realizadas diferentes diluições que resultaram em leituras espectrofotométricas, em comprimento de onda de 665nm, obtendo valores de absorbância entre 0,200 e 0,800. A relação entre as diferentes concentrações de clorofila, em miligrama por litro, com os valores de absorbância obtem-se a equação, como mostrada no gráfico 3, que foi utilizada para a determinação da concentração de clorofila nos ensaios.

Gráfico 3. Curva de calibração para determinação de clorofila **a**

4.3.3.2 Determinação da composição centesimal

Ao final do cultivo, o meio contendo a *A. platensis* foi centrifugado, com 3 lavagens sucessivas com água destilada para retirada do sal adsorvido às células, e, após secagem com ventilação a 55 °C por 12 horas (PELIZER *et al.*, 1999), foi avaliada a composição centesimal da biomassa seca.

4.3.3.2.1 Proteínas totais

O teor protéico total na biomassa seca foi determinado pelo clássico método de KJELDHAL, adotando-se o fator de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (ASSOCIATION OF OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS, 1984). Esse método caracteriza-se pela destruição da matéria orgânica com ácido sulfúrico concentrado, em presença de um catalizador e aquecimento, com formação de nitrogênio inorgânico, na forma de sulfato de amônio. A seguir, em aparelho destilador de nitrogênio, adiciona-se hidróxido de sódio no tubo proveniente da digestão, para alcalinização do meio, e, desta forma, o sal de amônio é convertido à amônia, que é destilada para uma solução saturada de ácido bórico. Posteriormente, titula-se essa solução com HCl 0,02N fatorada para se quantificar a concentração de nitrogênio (FERRAZ, 1986).

4.3.3.2.2. Lipídios totais

A fração lipídica total foi obtida por extração com solvente orgânico (FERRAZ, 1986). A amostra foi triturada em gral e então transferida para um extrator contínuo de Soxhlet com refluxo da mistura de solventes clorofórmio-metanol (2:1 v/v) até o líquido ficar límpido (PIORRECK, 1984, OLGUÍN *et al.*, 2001). A fração lipídica total juntamente com os solventes foram tratados em sistema evaporador rotativo a vácuo. O material obtido reúne ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídios, carotenóides, pigmentos fotossintetizantes, esteróides e hidrocarbonetos, sendo chamados de fração lipídica total (GIOIELLI, 1997).

4.3.3.2.3. Cinzas

O teor de cinzas das células secas foi determinado por aquecimento de acordo com método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). 1g da amostra foi pesada em cápsula de porcelana, previamente aquecida em mufla a 550 °C, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. A amostra foi seca em estufa a 105 °C, carbonizada e incinerada em mufla a 550 °C durante 4 horas, tempo necessário para obter peso constante. Posteriormente, resfriou-se a amostra em dessecador durante 1 hora, até atingir a temperatura ambiente e pesada. As cinzas devem ficar brancas ou ligeiramente acinzentadas

4.3.3.2.4. Carboidratos totais

A porcentagem de carboidratos foi calculada pela diferença entre e as porcentagens dos demais componentes analisados na biomassa seca.

4.3.4. Avaliação da composição elementar

As determinações de CNHS/O foram realizadas pela CE *instruments flash* EA1112 series acoplada com um detector de condutividade térmica (TCD). Para as análises de Carbono, Nitrogênio, Hidrogênio e Enxofre foi utilizada a meteonina (C = 40,25%; N = 9,39%; H = 7,43%, S = 21,49%) como padrão, e para a análise de oxigênio foi utilizado o ácido aspártico (C = 36,09%; N = 10,52%; H = 5,3 %, S = 0,00%, O = 49,08%).

4.3.4.1 Determinação de CNHS

Foram determinados pesando aproximadamente 1 a 4 mg da amostra em recipiente de estanho e adicionar V₂O₅ (óxido de vanádio) para que toda a biomassa seja carbonizada. Utiliza-se gás oxigênio (99,995%) para carregar as amostras e fazer a combustão a 900°C formando os compostos reduzidos N₂, CO₂, H₂O e SO₂. Esses gases vão para a coluna cromatográfica onde serão separados e posteriormente detectados por sinais elétricos no detector de condutividade térmica usando o software EAGER 300, na qual fornece a porcentagem de N, C, H, S contida na amostra.

4.3.4.2 Determinação de oxigênio

Pesar aproximadamente 1 a 4 mg da amostra em recipiente de prata, eleva-se a temperatura a 1060°C onde ocorre a pirólise. Durante a pirólise são formados N₂, CO e H₂, estes são filtrados onde os compostos halogenados são retidos. Posteriormente, esses gases vão para a coluna cromatográfica, onde o CO é separado dos outros gases, utilizando gás hélio como carreador, detectados por sinais elétricos no detector de condutividade térmica.

4.4 Cálculos

4.4.1 Produtividade em etanol no regime permanente

$$P_{\text{etanol}} = D \cdot E_f \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: P_{etanol} = Produtividade em etanol ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$);

D = vazão específica de alimentação (h^{-1});

E_f = concentração de etanol (g L^{-1}).

4.4.2 Rendimento do etanol no regime permanente

$$\eta = \left(\frac{E_f}{ART_i} \right) \frac{1}{0,511} \cdot 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: η = rendimento em etanol (%);

E_f = concentração de etanol (g L^{-1});

ART_i = Açúcares redutores totais no mosto de entrada no reator (g L^{-1});

0,511 = rendimento teórico (estequiométrico) da conversão de glicose em etanol.

4.4.3 Produtividade em células nos cultivos de *A. platensis*

$$P_x = \frac{X_m - X_i}{T_c} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: P_x = produtividade em células ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)

X_m = concentração celular máxima obtida (mg L^{-1})

X_i = concentração celular inicial (mg L^{-1})

T_c = tempo de cultivo (dias)

4.4.4 Fator de conversão de nitrogênio em células nos cultivos de *A. platensis*:

$$Y_{x/n} = \frac{(X_m - X_i)V}{N_t} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: $Y_{X/N}$ = Fator de conversão de nitrogênio em células (mg mg^{-1})

X_m = concentração celular máxima obtida (mg L^{-1})

X_i = concentração celular inicial (mg L^{-1})

V = volume do meio (L)

N_t = quantidade total de nitrogênio adicionado (mg)

4.4.5 Coeficientes atômicos para 1 C-mol de biomassa

Foram escolhidos os principais átomos (C, H, O, N e S) que formam as macromoléculas proteínas, carboidratos, lipídios, RNA e DNA. Um C-mol de biomassa é definida como $\text{C}_{x1}\text{H}_{x2}\text{N}_{x3}\text{O}_{x4}\text{S}_{x5}$, e os coeficientes atômicos X_i são calculados a partir da Equação 5.

$$X_i = \frac{f_i}{MM_i} / \frac{f_c}{MM_c} \quad (\text{Equação 5})$$

f_i = fração em massa do átomo i na biomassa seca (g g^{-1})

MM_i = Massa molar do átomo i (g C-mol^{-1})

f_c = fração em massa do carbono na biomassa seca (g g^{-1})

MM_c = Massa molar do átomo do carbono (g C-mol^{-1})

Exemplo:

Para se calcular o coeficiente atômico do hidrogênio em 1 C-mol de biomassa no experimento 1 (Fonte de Carbono: cilindro; fonte de nitrogênio: nitrato; intensidade luminosa: $60 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Teor de hidrogênio na biomassa foi de 6,62% e o teor de carbono foi de 54,3%, o que corresponde a 66,2 mg de hidrogênio e 543 mg de carbono em 1 g da biomassa. Logo, substituindo esses valores na Equação 5, se encontra o coeficiente atômico do hidrogênio de 1,46.

$$X_H = \frac{66}{1} / \frac{543}{12}$$

$$X_H = 1,46$$

4.4.6 Grau de redução da biomassa

O grau de redução (γ) de um composto orgânico é definido como o número de elétrons envolvido na sua oxidação. Esse valor é a somatória da multiplicação entre os coeficientes atômicos e seu respectivo grau de redução (HEIJNEN, 2001)

4.5 Teoria dos parâmetros bioenergéticos

A energia de Gibbs dissipada para o crescimento e manutenção celular por unidade de biomassa ($1/Y_{GX}$; kJ/C-mol) foi estimada de acordo com Heijnen (2001) pela Equação 6:

$$\frac{1}{Y_{GX}} = \frac{1}{Y_{GX}^{\max}} + \frac{m_G}{\mu} \quad (\text{Equação 6})$$

$Y_{GX}^{\max}$ é o rendimento máximo teórico de biomassa sobre a energia de Gibbs que corresponde a um valor de 986 C-mol $_X$. kJ $^{-1}$ em cultivos fotoautotrófico com CO $_2$ como fonte de carbono (HEIJNEN, 2001).

Nesta equação, a velocidade específica de crescimento, μ , foi definida de acordo com Leduy e Zajic, (1973) como:

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{X_i}{X_{i-1}} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde X_i e X_{i-1} são as concentrações de biomassa no final e início do intervalo de tempo decorrido entre as duas determinações consecutivas ($\Delta t = 1$ dia), enquanto que m_G é a energia de Gibbs utilizada para a manutenção celular, correspondendo a 7,12 kJ C-mol $_X^{-1}$. h $^{-1}$ a 30°C (HEIJNEN, 2001).

A estimativa o número de fótons (Einsteins) para sustentar o crescimento autotrófico, n_{Ph} , foi necessário recorrer ao balanço de energia de Gibbs, tendo em conta as contribuições de energia para o crescimento e manutenção, $1/Y_{GX}$, e a absorção de 1 Einstein de fótons, Δg_{Ph} , em adição aqueles de formação de substratos e produtos, Δg_{fi} , como descritos pela equação:

$$\Delta g_{HCO_3^-} + \Delta g_{fN} + \Delta g_{fH_2O} + \Delta g_{fH}^+ + \Delta g_{fX} + 1/Y_{GX} + n_{Ph} \Delta g_{Ph} = 0 \quad (\text{Equação 8})$$

O valor de $\Delta g_{Ph} = 206,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ foi estimado através da equação:

$$\Delta g_{Ph} = \frac{hcN_A}{\lambda} \quad (\text{Equação 9})$$

Sendo $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J}$, a constante de Planck; $c = 2,99 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$, a velocidade da luz; $N_A = 6,022 \times 10^{23} \text{ fótons de Einstein}^{-1}$, o número de Avogadro; e $\lambda = 580 \text{ nm}$, o comprimento de onda do foton absorvido (Li *et al.*, 2001).

Calculando os valores de Δg_{Ph} e n_{Ph} é possível estimar a energia molar de Gibbs absorvida pela equação 10.

$$\Delta G_a = n_{Ph} \Delta g_{Ph} \quad (\text{Equação 10})$$

A energia total de Gibbs absorvida pela fotossíntese (ΔG_a) foi assumida como a soma da energia fixada pelo sistema para aumentar o seu próprio conteúdo entálpico (ΔH), a energia transformada em ATP usada para o crescimento e manutenção celular (ΔG_{ATP}) e a liberada como calor (Q):

$$\Delta G_a + \Delta G_{ATP} + \Delta H + Q = 0 \quad (\text{Equação 11})$$

Onde ΔG_{ATP} e ΔH foram calculados a partir do n_{Ph} , a energia de Gibbs associada a 1 ATP mol e a média da variação de potencial entre FSI e FSII (TORRE *et al.*, 2003).

A produção molar de O_2 (q_{O_2}) e o consumo de H^+ (q_{H^+}) foram calculados de acordo com Torre *et al.* (2003), multiplicando-se os seus coeficientes estequiométricos pela concentração celular expressa em $C\text{-mol L}^{-1}$ e usando a composição elementar da biomassa experimental.

5. Planejamento experimental

Os experimentos realizados estão descritos na Tabela 2. Os valores de intensidade luminosa foram escolhidos em função do trabalho de Watanabe e Hall (1995). O valor de pH foi fixado em $9,5 \pm 0,2$, de acordo com trabalho de Sanchez-Luna *et al.* (2007) e Tredici e Zittelli (1998). As adições diárias de uréia foram fixadas com base na necessidade de nitrogênio da célula calculadas a partir dos resultados das produtividades celulares obtidos nos experimentos padrões realizados utilizando a fonte convencional de nitrogênio (NaNO_3).

Para a realização dos ensaios padrões, a concentração de NaNO_3 (SCHLÖSSER, 1982) foi mantida acima de 1 g L^{-1} para evitar a limitação do crescimento pela fonte de nitrogênio. A partir da curva de crescimento experimental utilizando o nitrato como fonte de nitrogênio, para cada intensidade luminosa estudada, obtém-se uma equação que representa a curva de crescimento teórica e a partir desta, calcula-se a produtividade celular diária. Considerando que as células possuem 7% de nitrogênio (BEZERRA, 2006), calcula-se a quantidade diária de nitrogênio necessária para o crescimento celular, obtendo-se assim, a equação de adição de nitrogênio amoniacal. Por isso, é necessário realizar uma curva de crescimento padrão com NaNO_3 para cada condição analisada (diferentes intensidades luminosas). A exemplificação do escrito acima, esta representado no Item 6.2.

Tabela 2 - Planejamento experimental

Experimento	Intensidade luminosa ($\mu \text{ mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Fonte de nitrogênio	Controle de pH por CO_2 de cilindro	Controle de pH por CO_2 de fermentação alcoólica
1	60	NaNO_3	Sim*	Não
2	60	Uréia	Sim*	Não
3	60	NaNO_3	Não	Sim*
4	60	Uréia	Não	Sim*
5	120	NaNO_3	Sim*	Não
6	120	Uréia	Sim*	Não
7	120	NaNO_3	Não	Sim*
8	120	Uréia	Não	Sim*
9	240	NaNO_3	Sim*	Não
10	240	Uréia	Sim*	Não
11	240	NaNO_3	Não	Sim*
12	240	Uréia	Não	Sim*

*valor fixado em 9,5 com uso de CO_2

6. Resultados e discussão

No item 6.1 estão descritos os resultados dos testes preliminares da fermentação alcoólica e no item 6.2 estão apresentados os resultados dos experimentos 1 ao 12 referentes aos acompanhamentos dos cultivos ao longo do tempo. A concentração celular, concentração de carbonato, de nitrato, de amônia e uréia foram apresentadas neste item.

As determinações da concentração celular foram feitas diariamente, enquanto que as medidas de concentração de nitrato, amônia, uréia, e de carbonato total no meio de cultura, em função dos relativos grandes volumes de amostra necessários para a execução das técnicas, foram realizadas de dois em dois dias.

Os parâmetros concentração celular máxima, produtividade em células e fator de conversão de nitrogênio em células estão descritos no item 6.3. As determinações da concentração de clorofila foram realizadas no final de cada experimento e estão descritas no item 6.4 e a avaliação da composição centesimal, teor de proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas estão descritos no item 6.5.

As análises estatísticas foram realizadas através de análise de multivariância e diferença entre as médias em nível de 5% de significância, visando-se examinar a influência de cada variável independente para os parâmetros cinéticos X_m , P_x e $Y_{X/N}$, bem como para o conteúdo de proteínas, lipídios, carboidratos, cinzas e teores de clorofila *a*.

As análises dos parâmetros bioenergéticos dos cultivos de *A. platensis* utilizando CO₂ de cilindro estão descritas no item 6.6 e a comparação entre o perfil de crescimento da *A. platensis* em duas diferentes configurações de fotobioreator tubular está descrito no item 6.7.

6.1 Testes preliminares para a realização da fermentação alcoólica

Antes de iniciar os experimentos acoplando a fermentação alcoólica contínua com a produção de *A. platensis*, foram realizados testes para avaliar: a influência da clarificação do melaço na determinação da concentração celular; a homogeneidade do reator; as vazões específicas de alimentação no processo contínuo de modo a obter regime permanente e produção gases suficiente para a correção do pH durante o cultivo de *A. platensis*.

6.1.1 Avaliação da influência da clarificação do melaço na determinação da concentração celular.

Inicialmente, foi proposto utilizar o melaço de cana-de-açúcar clarificado e esterilizado, no entanto, devido as dificuldade operacionais como por exemplo grandes volumes de melaço que seria utilizado para a manutenção do processo contínuo, optou-se por utilizar o melaço não clarificado e não esterilizado, uma vez que, nas usinas brasileiras não é empregado, atualmente, esse pré-tratamento do melaço (LIMA *et al.*, 2001). Dhamija *et al.* (1982) relata que os custos adicionais para o pré-tratamento de melaço e da levedura reciclada, pode limitar o uso do processo. Portanto, a técnica de reciclo de leveduras por centrifugação e uso de melaço não clarificado torna o processo mais econômico.

O melaço de cana-de-açúcar possui aproximadamente 50% de açúcares (sacarose: 25 a 40%; glicose e frutose: 12 a 35%), água, carboidratos, cinzas, metais pesados, compostos nitrogenados e, em menor quantidade, ácidos não nitrogenados (ácido cítrico, ácido málico, oxálico glicólico), ceras, esteróides e vitaminas (ROUKAS, 1998). Vários fatores influenciam na composição do melaço ou mel final, os métodos de fabricação do açúcar, o tempo de armazenamento e as regiões do plantio. Este elevado teor de açúcar é a razão porque o melaço é largamente utilizado na indústria de fermentação, em particular, produção de etanol.

O emprego do melaço não tratado poderia influenciar a determinação da concentração celular por massa seca, uma vez que no melaço contém, além da sacarose, diversos outros resíduos que poderiam ficar retidos na membrana de filtração dificultando esse processo e/ou resultando no falso aumento da concentração celular. Por isso, realizou-se um teste para avaliar se o não tratamento do melaço influenciaria na determinação da concentração celular. Os resultados e a análise estatística da diferença entre as médias estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores da concentração celular, médias e desvio padrão, em massa seca, obtidas a partir do melaço não clarificado e do melaço clarificado.

Melaço não clarificado (g.L ⁻¹)	Melaço clarificado (g.L ⁻¹)
11,10	10,10
10,94	10,74
10,82	10,04
Média = 10,9 ± 0,14 ^a	Média = 10,3 ± 0,40 ^a
Diferença percentual = 6,40	

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95%.

Como se pode observar na Tabela 3, as médias da concentração celular determinada por massa seca foram estatisticamente iguais nas duas condições de melaço avaliadas, melaço clarificado e melaço não clarificado. Com esses resultados, optou-se utilizar o melaço não clarificado, uma vez que, no âmbito industrial o processo de clarificação aumenta os custos operacionais, resultando em um aumento dos custos do produto final. Por isso, estudos sobre os pré-tratamentos do melaço de cana-de-açúcar têm sido desenvolvidos para que viabilizem não só a obtenção dos produtos, mas também as etapas de recuperação e purificação sem aumento excessivo no custo do processo (VALDUGA *et al.*, 2007).

6.1.2 Teste de homogeneidade do reator

O teste de homogeneidade no reator foi realizado com o objetivo de se avaliar se as amostras retiradas em qualquer lugar do reator podem ser consideradas equivalentes, com um risco de erro estatisticamente determinado neste trabalho em 10%. Para isso, o teste de homogeneidade foi realizado de acordo com Koshimizu *et al.* (1983).

Na Tabela 4 estão descritos os valores da concentração celular e o logaritmo da concentração celular em função do tempo, com uma vazão de alimentação de $0,124 \text{ h}^{-1}$. A homogeneidade do reator é verificada se a queda da concentração celular for uma função exponencial.

Tabela 4 - Variação da concentração de leveduras em função do tempo

Tempo (horas)	[X] (g L^{-1})	Ln X
0,5	8,9	0,94939
1,0	7,2	0,85733
1,5	6,2	0,79379
2,0	5,7	0,75587
2,5	5,0	0,70070
3,0	4,6	0,66651
3,5	3,9	0,59988
4,0	3,3	0,51851
4,5	3,0	0,48287
5,0	2,5	0,39445

Aplicando-se o logaritmo neperiano aos valores do [X] (Tabela 4) e construindo um gráfico $\ln X$ em função do tempo, obtêm-se a equação da reta, onde o coeficiente angular da reta obtida é igual à vazão específica de alimentação do sistema teórico (D_t).

Gráfico 4. Logarítmico da concentração celular em função do tempo

O valor de D_t obtido pela reta é igual a $0,115 \text{ h}^{-1}$, que se comparado ao valor calculado, $0,124 \text{ h}^{-1}$, apresenta uma diferença de 7,8%, indicando que o sistema pode ser considerado homogêneo (KOSHIMIZU *et al.*, 1983).

6.1.3 Avaliação de diferentes vazões específicas de alimentação (D)

O efeito da vazão específica de alimentação (D : $0,1 \text{ h}^{-1}$; $0,05 \text{ h}^{-1}$ e $0,025 \text{ h}^{-1}$) na fermentação alcoólica contínua foi avaliada para a produção de etanol. Os resultados são mostrados nos Gráficos de 5 a 7.

Gráfico 5. Concentração celular no regime permanente (X_P ; ♦), etanol (▲) e açúcar redutor total (ART; ■) para $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

Gráfico 6. Concentração celular no regime permanente (X_P ; ♦), Etanol (▲) e açúcar redutor total (ART; ■) para $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$.

Gráfico 7. Concentração celular no regime permanente (X_P ; ♦), Etanol (▲) e açúcar redutor total (ART; ■) para $D = 0,025 \text{ h}^{-1}$.

Como se pode observar nos Gráficos de 5 a 7, foi possível a obtenção do regime permanente nos 3 valores de D empregados, indicando a adequação desses valores e da concentração de ART à velocidade de crescimento do micro-organismo.

Nos ensaios de fermentação contínua, a condição de estado estacionário foi obtida após três tempos de residência, sem qualquer tipo de problema operacional, como obstrução do tubo de retirada de caldo, crescimento na parede e mistura imperfeita. O Gráfico 5 mostra um resultado típico em termos de perfis de

concentração celular (X), concentração de glicose (S) e concentração de etanol (E). No estado estacionário ($D = 0,1 \text{ h}^{-1}$), a concentração de ART residual na saída do reator foi de $94,21 \pm 4,49 \text{ g L}^{-1}$, a concentração celular foi de $5,47 \pm 0,47 \text{ g L}^{-1}$ e a concentração de etanol de $41,69 \pm 1,63 \text{ g L}^{-1}$. Com a redução da vazão específica de alimentação para $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ (Gráfico 5), a concentração de glicose residual reduziu para cerca de $47,80 \pm 8,70 \text{ g L}^{-1}$ e as concentrações de etanol e celular aumentaram para $45,42 \pm 3,1 \text{ g L}^{-1}$ e $6,18 \pm 0,77 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, devido ao maior tempo de residência nessa segunda condição. Reduzindo a vazão específica de alimentação para $0,025 \text{ h}^{-1}$ (Gráfico 6), a concentração de etanol aumentou para $55,3 \pm 7,57 \text{ g L}^{-1}$. Isso porque menor a vazão específica de alimentação, maior o tempo de contato entre as células e o açúcar, convertendo-o mais eficientemente no etanol. Esse resultado mostra que a redução da vazão específica de alimentação aumenta a produtividade em etanol.

Similarmente, Perego Jr (1979) observaram que a diminuição da vazão específica de $0,117$ para $0,049 \text{ h}^{-1}$ durante a fermentação alcoólica contínua, menores foram os valores de ART residual, 58 g L^{-1} e 28 g L^{-1} , respectivamente. Por outro lado, a concentração de etanol aumentou de $49,6 \text{ g L}^{-1}$ para 68 g L^{-1} e a concentração celular reduziu de $6,7 \text{ g L}^{-1}$ para $5,3 \text{ g L}^{-1}$. Esses valores diferiram do presente trabalho devido às diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* bem como o melaço utilizado. O melaço, por ser um produto natural, varia de composição de acordo com o clima, solo, tempo de colheita.

Na Tabela 5 mostra que a redução da vazão específica de alimentação levou a um aumento no rendimento do processo, obtendo maior valor de $63,6 \%$ no emprego de D igual a $0,025 \text{ h}^{-1}$. O aumento na vazão específica de alimentação proporciona um aumento do fluxo de entrada de açúcar, provavelmente superior ao aumento da velocidade de consumo, levando a uma diminuição da concentração de etanol, aumento da concentração de ART residual e consequentemente, diminuição da eficiência de transformação. O rendimento representa a eficiência da fermentação alcoólica, tomando como base a equação estequiométrica de Gay-Lussac, onde a relação teórica, para 100% de eficiência de conversão de hexose em etanol, é de $0,511 \text{ g}$ de etanol produzido para cada grama de hexose consumida.

Tabela 5 - Valores de X_p , ART, Etanol e Rendimento do processo, no regime permanente, para os diferentes valores de D, com ART inicial de 170 g.L^{-1}

D (h^{-1})	X_p (g.L^{-1})	ART_f (g.L^{-1})	E_f (g.L^{-1})	η (%)	P_x ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	P_e ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
0,100	$5,47 \pm 0,47$	$94,2 \pm 4,49$	$41,7 \pm 1,63$	47,99	0,55	4,17
0,050	$6,18 \pm 0,77$	$47,8 \pm 8,70$	$45,4 \pm 3,10$	52,29	0,31	2,27
0,025	$6,09 \pm 0,54$	$53,2 \pm 5,67$	$55,3 \pm 7,57$	63,64	0,15	1,38

D: vazão específica de alimentação;

X_p : média dos valores de concentração celular ao longo do regime permanente e seus desvios padrões;

ART_f : açúcares redutores totais no caldo fermentado

E_f : oncentração de etanol no caldo fermentado

η : Rendimento do processo

P_x : Produtividade em células

P_e : Produtividade em etanol

Na fermentação alcoólica, vários fatores podem influenciar no rendimento do processo, ou seja, a conversão de açúcar em etanol, entre eles a concentração de açúcar e o fluxo pelo qual ele é adicionado e removido do reator (em processos contínuos), pH, concentração celular, presença de bactérias contaminantes e o tipo de processo adotado. Na indústria, o rendimento do processo é calculado baseado na concentração de açúcar total que entra no sistema fermentativo sem considerar o açúcar residual, podendo ser maior que 90 a 93% do valor teórico da conversão de glicose em etanol (INGLEDEW, 1999).

O processo de fermentação mais comumente utilizado nas destilarias do Brasil é utilizando a recuperação de leveduras através da centrifugação do vinho. Aproximadamente 90% da levedura são reutilizadas de uma fermentação para a próxima. Esta suspensão de fermento diluído e acidificado, conhecido na prática com o nome de pé-de-cuba, permanece em agitação de uma a três horas antes de retornar à dorna de fermentação, resultando em altas densidades celulares dentro do reator (10-17% p/v) e contribuindo para um tempo de fermentação curto. Isso favorece a valores de conversões teóricos de açúcares em etanol de 90 a 92% (BASSO *et al.*, 2008), valores maiores do que os obtidos no presente trabalho (Tabela 5).

Em termos de produtividades, a Tabela 5 mostra que as máximas produtividades em células (P_x) e em etanol (P_e) foram obtidas para um alto valor de D ($0,1 \text{ h}^{-1}$), de cerca de $0,55 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $4,17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Por outro

lado, nessas condições, o rendimento em etanol obteve menor valor (48%). Quando a taxa de diluição é alta, os açúcares são adicionados a uma velocidade mais rápida do que são consumidos, logo a perda de açúcar aumenta e a concentração de etanol reduz, diminuindo consequentemente a eficiência do processo. Como se pode observar no trabalho de Melzoch *et al.* (1991), a produtividade de etanol máxima foi de $15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ no regime permanente com uma concentração de *S. cerevisiae* de 46 g L^{-1} e concentração de etanol de 81 g L^{-1} em bioreator agitado continuamente com reciclo total de células utilizando a ultrafiltração.

Nas condições adotadas nessa fermentação, com ART de 170 g.L^{-1} , optou-se por aplicar D igual a $0,025 \text{ h}^{-1}$, por obter um maior valor de rendimento alcoólico e gerar CO_2 suficiente a ser incorporado nos cultivos de *A. platensis* em fotobiorreator tubular.

6.1.4 Avaliação dos voláteis orgânicos no gás de arraste

De acordo com os resultados obtidos pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas, foram encontrados nos gás de arraste da fermentação alcoólica contínua predominância de (CO_2), pequenas proporções de etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) e elementos traços de acetaldeído ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$). Isso está de acordo com Romano *et al.* (2003) que relataram as transformações químicas durante a fermentação por leveduras produzem principalmente CO_2 e etanol, e em menores quantidades, a formação de CVOs. Basso *et al.* (1996) relata que, durante a fermentação alcoólica por levedura os produtos da fermentação são constituídos de 43 – 47% de etanol, 41 - 45% de gás carbônico e o restante são formados por outros compostos orgânicos, tais como glicerol, ácido succínico, ácido acético, entre outros. Dentre os voláteis orgânicos majoritários produzidos durante a fermentação de mosto de cana-de-açúcar por *Saccharomyces cerevisiae* encontram-se o etanol, acetaldeído, propanol, isobutanol, álcool isoamílico, acetato de etila (CAEHOT *et al.*, 1991).

6.2. Avaliação do crescimento da *A. platensis*

Experimento 1

Fonte de nitrogênio = NaNO_3 ; Intensidade luminosa = $60 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$;

Fonte de CO_2 = Cilindro

Tabela 6 - Valores m\u00e9dios de Concentra\u00e7\u00e3o celular (X) e concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total referentes ao experimento 1.

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Carbonato total (g L^{-1})
0	$405 \pm 2,7$	$11,55 \pm 0,00$
1	590 ± 32	-
2	884 ± 24	$11,93 \pm 0,27$
3	1248 ± 202	-
4	1368 ± 99	$11,86 \pm 0,26$
5	1914 ± 19	-
6	2292 ± 103	$11,31 \pm 0,21$
7	2379 ± 46	-
8	2899 ± 17	$11,24 \pm 0,21$
9	2831 ± 22	-
10	2952 ± 76	$11,06 \pm 0,64$

Gráfico 8. Concentração celular referente ao experimento 1

Experimento 2

Fonte de nitrogênio = uréia; Intensidade luminosa= $60 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; Fonte de CO_2 = Cilindro.

Tabela 7 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no experimento 2 de acordo com a equação $y = -4,4554x^3 + 54,865x^2 + 143,17x + 400$ ($60 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

Tempo (dias)	Adição diária de nitrogênio (mM dia^{-1})
0	0,484
1	0,691
2	0,832
3	0,906
4	0,913
5	0,853
6	0,726
7	0,533
8	0,277

Gráfico 9. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 2 ($60 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

Tabela 8 - Valores médios de Concentração celular (X), concentração de carbonato total, amônia total e uréia residual referentes ao experimento 2

Tempo (dias)	X (mg L ⁻¹)	Carbonato total (g L ⁻¹)	Amônia total (mol L ⁻¹)	Uréia residual (mol L ⁻¹)
0	406 ± 0,00	11,55 ± 0,00	-	-
1	534 ± 49	-	-	-
2	906 ± 18	11,55 ± 0,27-	1,32E-05	2,40E-04
3	1059 ± 37	-	-	-
4	1538 ± 137	12,90 ± 0,04	1,36E-05	1,97E-04
5	2003 ± 94	-	-	-
6	2330 ± 28	11,54 ± 1,25	1,35E-05	2,12E-04
7	2602 ± 25	-	-	-
8	2847 ± 0	10,02 ± 0,89	3,38E-06	8,27E-04
9	2869 ± 14	-	-	-
10	2847 ± 56	10,78 ± 0,18	***	6,81E-04

*** Valor abaixo do limite mínimo detectado pela metodologia

Gráfico 10. Concentração celular referente ao experimento 2

Experimento 3

Fonte de nitrogênio = NaNO_3 ; Intensidade luminosa = $60 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$;

Fonte de CO_2 = fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica.

Tabela 9 - Valores m\u00e9dios de Concentra\u00e7\u00e3o celular (X) e concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total referentes ao experimento 3.

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Carbonato total (g L^{-1})
0	490 $\pm$ 0	11,55 $\pm$ 0,00
1	591 $\pm$ 92	-
2	1193 $\pm$ 87	12,24 $\pm$ 0,5
3	1430 $\pm$ 10	-
4	1959 $\pm$ 197	12,34 $\pm$ 0,23
5	2161 $\pm$ 171	-
6	2445 $\pm$ 48	12,9 $\pm$ 0,05
7	2621 $\pm$ 102	-
8	2789 $\pm$ 82	11,38 $\pm$ 1,04
9	2782 $\pm$ 125	-
10	2832 $\pm$ 89	11,1 $\pm$ 1,04

Gr\u00e1fico 11. Concentra\u00e7\u00e3o celular referente ao experimento 3

Experimento 4

Fonte de nitrogênio = Uréia; Intensidade luminosa = $60 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; Fonte de CO_2 = fermentação alcoólica.

Tabela 10 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no experimento 4 de acordo com a equação $y = -2,0689x^3 + 11,591x^2 + 332,92x + 400$ ($60 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

Tempo (dias)	Adição diária de uréia (mM dia ⁻¹)
0	0,86
1	0,88
2	0,88
3	0,84
4	0,78
5	0,68
6	0,55
7	0,39
8	0,20

Gráfico 12. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao experimento 4 ($120 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

Tabela 11 - Valores médios de Concentração celular (X), concentração de carbonato total, amônia total e uréia residual referentes ao experimento 4

Tempo (dias)	X (mg L ⁻¹)	Carbonato total (g L ⁻¹)	Amônia total (mol L ⁻¹)	Uréia residual (mol L ⁻¹)
0	494±0	11,55±0,00	-	2,84E-04
1	618±74	-	-	-
2	1213±59	11,39 ± 0,69	***	2,18E-04
3	1498±33	-	-	-
4	1874±76	10,95 ± 0,5	3,24E-05	2,21E-04
5	2250±44	-	-	-
6	2516±147	10,83 ± 1,39	4,2E-04	8,29E-04
7	2694±105	-	-	-
8	2867±28	10,86 ± 0,91	1,3E-03	3,08E-05
9	2871±34		-	-
10	2860±61	11,8 ± 0,71	3,5E-04	2,02E-03

***Valor abaixo do limite mínimo detectado pela metodologia

Gráfico 13. Concentração celular referente ao experimento 4

Experimento 5

Fonte de nitrogênio = NaNO_3 ; Intensidade luminosa = $120 \mu \text{ mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$;

Fonte de CO_2 = Cilindro.

Tabela 12 - Valores m\u00e9dios de Concentra\u00e7\u00e3o celular (X) e concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total referentes ao experimento 5.

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Carbonato total (g L^{-1})
0	406 ± 0	$11,55 \pm 0,00$
1	529 ± 22	-
2	894 ± 4	$11,55 \pm 0,80$
3	1401 ± 76	-
4	2118 ± 82	$11,91 \pm 1,36$
5	2584 ± 50	-
6	3209 ± 110	$11,34 \pm 0,03$
7	3262 ± 115	-
8	3302 ± 100	$12,12 \pm 0,00$

Gr\u00e1fico 14. Concentra\u00e7\u00e3o celular referente ao experimento 5.

Experimento 6

Fonte de nitrogênio = Uréia; Intensidade luminosa= $120 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Fonte de CO_2 = Cilindro.

Tabela 13 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no experimento 6 de acordo com a equação $y = -13,286x^3 + 144,86x^2 + 62,226x + 400$ ($120 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tempo (dias)	Adição diária de uréia (mM dia ⁻¹)
0	0,485
1	1,010
2	1,335
3	1,462
4	1,389
5	1,117
6	0,645

Gráfico 15. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao experimento 6 ($120 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tabela 14 - Valores médios de Concentração celular (X), concentração de carbonato total, amônia total e uréia residual referentes ao experimento 6.

Tempo (dias)	X (mg L ⁻¹)	Carbonato total (g L ⁻¹)	Amônia total (mol L ⁻¹)	Uréia residual (mol L ⁻¹)
0	309 ± 00	11,55 ± 0,00	-	-
1	548 ± 10	-	-	-
2	797 ± 7	11,17 ± 1,34	2,14E-05	1,97E-05
3	1267 ± 163	-	-	-
4	2062 ± 92	11,01 ± 0,04	2,91E-06	1,82E-06
5	2558 ± 170	-	-	-
6	2980 ± 103	12,53 ± 0,58	1,19E-06	2,52E-06
7	3093 ± 234	-	-	-
8	3266 ± 50	10,33 ± 0,04	***	2,75E-06

***Valor abaixo do limite mínimo detectado pela metodologia

Gráfico 16. Concentração celular referente ao experimento 6

Experimento 7

Fonte de nitrogênio = NaNO_3 ; Intensidade luminosa = $120 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$;

Fonte de CO_2 = Fermentação alcoólica

Tabela 15 - Valores médios de Concentração celular (X) e concentração de carbonato total referentes ao experimento 7.

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Carbonato total (g L^{-1})
0	$477 \pm 0,00$	$11,55 \pm 0,00$
1	954 ± 135	-
2	1151 ± 140	$12,24 \pm 0,80$
3	1667 ± 70	-
4	2165 ± 256	$12,33 \pm 1,36$
5	2516 ± 147	-
6	2969 ± 23	$11,34 \pm 0,35$
7	2827 ± 28	-
8	2969 ± 59	$11,12 \pm 1,14$

Gráfico 17. Concentração celular referente ao experimento 7.

Experimento 8

Fonte de nitrogênio = Uréia; Intensidade luminosa= $120 \mu \text{ mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$;

Fonte de CO_2 = Fermentação alcoólica

Tabela 16 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no experimento 8 de acordo com a $y = -5,8128x^3 + 38,625x^2 + 386,06x + 400$ ($120 \mu \text{ mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

Tempo (dias)	Adição diária de uréia (mM dia ⁻¹)
0	1,05
1	1,15
2	1,17
3	1,10
4	0,95
5	0,70
6	0,37

Gráfico 18. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao experimento 8 ($120 \mu \text{ mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

Tabela 17 - Valores médios de Concentração celular (X), concentração de carbonato total, amônia total e uréia residual referentes ao experimento 8

Tempo (dias)	X (mg L ⁻¹)	Carbonato total (g L ⁻¹)	Amônia total (mol L ⁻¹)	Uréia residual (mol L ⁻¹)
0	445 ±0	11,55 ± 0,00	-	-
1	767 ±46	-	-	-
2	1053 ±50	11,17 ± 1,34	4,30E-04	3,07E-05
3	1554 ±31	-	-	-
4	2158 ±143	11,01 ± 0,04	4,77E-04	2,73E-06
5	2552 ±87	-	-	-
6	2952 ±35	12,53 ± 0,58	1,66E-04	5,4E-06
7	3048 ±96	-	-	-
8	3079 ±86	10,33 ± 0,04	3,67E-05	1,94E-06

Gráfico 19. Concentração celular referente ao experimento 8

Experimento 9

Fonte de nitrogênio = NaNO_3 ; Intensidade luminosa = $240 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$;

Fonte de CO_2 = Cilindro.

Tabela 18 - Valores m\u00e9dios de Concentra\u00e7\u00e3o celular (X) e concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total referentes ao experimento 9.

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Carbonato total (g L^{-1})
0	410 ± 0	$11,55 \pm 0,00$
1	815 ± 94	-
2	1297 ± 206	$11,17 \pm 0,27$
3	2174 ± 90	-
4	2625 ± 297	$12,64 \pm 0,33$
5	2994 ± 213	-
6	3291 ± 207	$12,46 \pm 1,12$
7	3422 ± 172	-
8	3299 ± 117	$10,45 \pm 0,64$

Gr\u00e1fico 20. Concentra\u00e7\u00e3o celular referente ao experimento 9

Experimento 10

Fonte de nitrogênio = Uréia; Intensidade luminosa= $240 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Fonte de CO_2 = Cilindro.

Tabela 19 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no experimento 10 de acordo com a equação $y = -12,057x^3 + 100,82x^2 + 318,99x + 400$ ($240 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tempo (dias)	Adição diária de uréia (mM dia ⁻¹)
0	1,01
1	1,34
2	1,48
3	1,45
4	1,23
5	0,83
6	0,25

Gráfico 21. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 10 ($240 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tabela 20 - Valores médios de concentração celular (X), concentração de carbonato total, amônia total e uréia residual referentes ao experimento 10.

Tempo (dias)	X (mg L ⁻¹)	Carbonato total (g L ⁻¹)	Amônia total (mol L ⁻¹)	Uréia residual (mol L ⁻¹)
0	402 ± 0,00	11,55±0,00	-	-
1	461 ± 62	-	-	-
2	839 ± 139	10,03 ± 0,80	***	2,7994E-05
3	1705 ± 89	-	-	-
4	2663 ± 95	11,20 ± 1,30	1,53E-05	6,5768E-06
5	3015 ± 78	-	-	-
6	3236 ± 72	11,01 ± 0,58	1,78E-05	9,5016E-05
7	3307 ± 30	-	-	-
8	3293 ± 113	12,00 ± 0,17	2,32E-06	7,5662E-05

***Valor abaixo do limite mínimo detectado pela metodologia

Gráfico 22. concentração celular referente ao experimento 10

Experimento 11

Fonte de nitrogênio = NaNO_3 ; Intensidade luminosa = $240 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$;

Fonte de CO_2 = fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica.

Tabela 21 - Valores m\u00e9dios de Concentra\u00e7\u00e3o celular (X) e concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total referentes ao experimento 11.

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Carbonato total (g L^{-1})
0	358 ± 0	$11,55 \pm 0,00$
1	976 ± 53	-
2	1298 ± 61	$10,03 \pm 2,7$
3	1928 ± 78	-
4	2428 ± 207	$11,41 \pm 0,14$
5	2834 ± 199	-
6	3102 ± 130	$10,53 \pm 1,61$
7	2969 ± 59	-
8	3109 ± 19	$9,65 \pm 0,79$

Gr\u00e1fico 23. Concentra\u00e7\u00e3o celular referente ao experimento 11

Experimento 12

Fonte de nitrogênio = Uréia; Intensidade luminosa= $240 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Fonte de CO_2 = fermentação alcoólica.

Tabela 22 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no experimento 12 de acordo com a equação $y = -8,2763x^3 + 62,437x^2 + 372,65x + 400$ ($240 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tempo (dias)	Adição diária de uréia (mM dia ⁻¹)
0	1,07
1	1,26
2	1,32
3	1,26
4	1,07
5	0,77
6	0,33

Gráfico 24. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 12 ($240 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tabela 23 - Valores médios de Concentração celular (X), concentração de carbonato total, amônia total e uréia residual referentes ao experimento 12.

Tempo (dias)	X (mg L ⁻¹)	Carbonato total (g L ⁻¹)	Amônia total (mol L ⁻¹)	Uréia residual (mol L ⁻¹)
0	400±0	11,55±0,00	-	-
1	625±228	-	-	-
2	1095±802	10,03 ± 0,80	***	4,77E-05
3	1562±357	-	-	
4	1912±47	11,20 ± 1,30	9,5E-05	1,10E-04
5	2609±231	-	-	
6	3071±111	11,01 ± 0,58	2,20E-05	1,26E-04
7	3180±820	-	-	
8	3200±734	12,00 ± 0,17	2,5E-06	***

***Valor abaixo do limite mínimo detectado pela metodologia

Gráfico 25. Concentração celular referente ao experimento 12

Resultados do processo descontínuo alimentado no cultivo de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* utilizando CO₂ proveniente de cilindro ou de fermentação alcoólica com diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de sódio ou uréia) e intensidade luminosas (60, 120 ou 240 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) podem ser observados nos Gráficos 8, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 20, 22, 23 e 26.

Os perfis das curvas de crescimento foram semelhantes, com ausência da fase lag no cultivo de *A. platensis* no início do cultivo, crescendo exponencialmente e estabilizando na fase estacionária. As diferentes fontes de nitrogênio (nitrato e uréia) utilizadas nas diferentes intensidades luminosas (60, 120 e 240 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avaliadas) não influenciaram nos perfis das curvas de crescimento. Essa característica foi observada em trabalhos anteriores de Pelizer *et al.* (2003) e Danesi *et al.* (2002). Isso se deve a semelhança nas condições de crescimento tais como composição química do meio de cultura e temperatura de crescimento entre a preparação do inóculo e o cultivo. Outro fator é que as células para a preparação do inóculo estavam na fase exponencial de crescimento, isto é, o inóculo era um cultivo jovem constituído de células ativas. De fato, Pelizer *et al.* (2003), que trabalharam com KNO_3 como fonte de nitrogênio, relataram a influência da idade do inóculo no crescimento da *S. platensis*, comprovando que a utilização de inóculo no 6º dia de cultivo, proporcionou maiores valores no crescimento celular em cultivos realizados em minitanques. Nessas condições, também não detectaram fase lag de crescimento.

Autores como Danesi *et al.* (2002), trabalhando com uréia como fonte de nitrogênio, também não observaram a presença de fase lag no cultivo de *S. platensis*. De fato, mesmo em cultivos onde o inóculo foi cultivado em meio com nitrato, como é o caso do presente trabalho, seria esperado que o uso de fontes de nitrogênio que levem à presença de amônia no meio de cultivo não apresentasse fase lag de crescimento celular, pois a amônia é a fonte de nitrogênio preferencialmente utilizada pela *S. platensis* (BOUSSIBA, 1989; BELKIN; BOUSSIBA, 1991b).

A fonte de nitrogênio no meio de cultura é nutriente fundamental para o crescimento de micro-organismos fotossintetizantes (WEN; CHEN, 2001). Diferentes fontes de nitrogênio inorgânico para o cultivo de *S. platensis* tem sido estudados tais como cloreto de amônio (CARVALHO *et al.*, 2004), sulfato de amônio (SOLETTI *et al.*, 2005), nitrato de amônio, fosfato de amônio (COSTA *et al.*, 2001) nitrato de sódio (SCHLÖSSER, 1982), nitrato de potássio (PAOLLETTI, 1975) e uréia (SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2004).

Comparando-se os cultivos com nitrato (Gráficos 8, 11, 14, 17, 20 e 23) e os cultivos com uréia (Gráficos 10, 13, 16, 19, 22 e 25) para cada intensidade luminosa e fonte de CO_2 estudada, observam-se que as curvas de crescimento dos cultivos e

as concentrações celulares diárias com uréia foram semelhantes as curvas de crescimentos e as concentrações celulares diárias utilizando nitrato. Isso mostra que a equação de alimentação com uréia (Gráficos 9, 12, 15, 18, 21 e 24), obtida em cada intensidade luminosa e fonte de CO₂, reproduziu seu respectivo cultivo utilizando o nitrato.

Como pode ser observado nas Tabelas 8, 11, 14, 17, 20 e 23, as concentrações de amônia e uréia residual durante os cultivos sempre apresentaram concentrações inferiores ou próximas 10⁻⁴ molar, mostrando que não houve acúmulo de amônia e uréia residual nos cultivos e essa concentração também são consideradas não tóxicas, pois esta concentração torna-se tóxica numa concentração acima de 10 mM e inibitória na concentração de 1,7 mM a 2 mM (ABELIOVICH; AZOV, 1976; CARVALHO *et al.*, 2004; CONVERTI *et al.*, 2006b).

O nitrato é fonte de nitrogênio convencional nos cultivos de micro-organismo e é encontrado, em abundância, em ambientes naturais. No entanto, o emprego de nitrato, em meio sintético utilizado na produção comercial de micro-organismos, pode aumentar custo do produto final. Por isso, fontes de nitrogênio alternativas têm sido estudadas visando à redução nos custo de produção.

Uréia tem sido considerada uma fonte alternativa de nitrogênio no cultivo de *S. platensis* por proporcionar um aumento da concentração celular (SASSANO *et al.*, 2004; SOLETTTO *et al.*, 2005; DANESI *et al.*, 2004) e por ter alta competitividade econômica. Isso decorre do seu baixo custo e alto conteúdo de nitrogênio, tendo como consequência o baixo custo por unidade de nitrogênio quando comparada a outras fontes de nitrogênio.

A uréia, quando hidrolisada, origina duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono. Essa conversão ocorre primeiramente quando a uréia (CO(NH₂)₂) combina com a água (hidrólise) e forma o carbonato de amônio ((NH₄)₂CO₃). Esse composto é instável e decompõe para formar o gás amônia (NH₃) e o dióxido de carbono (CO₂) (DORN, 2007). A amônia, por sua vez, é uma molécula pequena e não carregada que se move relativamente livre através da bicamada lipídica. Um possível mecanismo para a assimilação da amônia pode envolver a simples difusão da amônia, seguindo pelo seu aprisionamento através da protonação, uma vez que dependendo do pH (pH < 8) em que se encontra, a amônia reage com a água formando o íon amônio (NH₄⁺). Portanto, a membrana é permeável à amônia, mas impermeável ao íon amônio (BOUSSIBA *et al.*, 1984).

Costa *et al.* (2001) em estudos comparativos usando diferentes fontes de nitrogênio, em processo descontínuo, no cultivo de *S. platensis*, observaram que 0,01 M de uréia ou nitrato de amônio proporcionaram maiores concentrações celulares de aproximadamente 1g L^{-1} , não diferindo estatisticamente do cultivo com o nitrato de sódio. No entanto, nos cultivos com maiores concentrações dessas fontes de nitrogênio (0,03 M e 0,05 M) não houve crescimento celular.

Costa *et al.* (2004) avaliaram o crescimento da *S. platensis* na lagoa Mangueira suplementando uréia por processo descontínuo alimentado e observaram um aumento de 2,67 vezes na concentração da biomassa no cultivo suplementado com $1,125\text{ mg L}^{-1}$ de uréia quando comparada nos cultivos não suplementado com uréia. No entanto, nos cultivos com $2,250\text{ mg L}^{-1}$ de uréia, houve uma redução na concentração celular. Isso sugere que a adição de uréia na lagoa Mangueira é benéfica ao crescimento da *S. platensis*, mas se adicionada em altas concentrações, podem inibir o crescimento. Por outro lado, Soletto *et al.* (2005) compararam cultivos de *S. platensis* utilizando processo descontínuo com a mesma concentração de sulfato de amônio ou uréia como fonte de nitrogênio, e observaram que na concentração de 1,7 mM, houve um rápido crescimento da biomassa quando utilizado uréia e houve uma inibição no crescimento quando utilizado o sulfato de amônio. Como sugerido em trabalhos prévios, a ação simultânea das condições alcalina (DANESI *et al.*, 2002) e a ação da urease (CARVAJAL *et al.*, 1982; SHIMAMATSU, 2004) poderia ter promovido a hidrólise da uréia em amônia acoplado com a assimilação da amônia pelas células, minimizando, portanto, a inibição pela amônia.

Sassano *et al.* (2004) observaram que utilizando 500 mg L^{-1} de massa total de uréia, alimentada durante 12 dias proporcionou aumento na concentração de *S. platensis*, em minitanques, quando comparadas ao emprego do nitrato.

Su *et al.* (2007), observaram que o maior desempenho em termos de rendimento de biomassa e conteúdo de lipídios durante o crescimento da *Isochrysis galbana* foi no meio contendo uréia como fonte de nitrogênio, indicando que a uréia é a fonte preferencial de nitrogênio em relação ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4Cl .

O emprego da uréia pode levar a inibição do crescimento celular. Em condição alcalina ou a presença de urease no meio de cultivo hidrolisa uma molécula de uréia em duas moléculas de amônia e esta, em altas concentrações é considerada tóxica para as células (SASSANO *et al.*, 2004). Por outro lado, quando em baixas

concentrações, podem limitar o crescimento, uma vez que a presença de nitrogênio é fundamental para o crescimento e manutenção celular. Por isso, o modo de adição de uréia é importante para melhorar a produtividade do cultivo.

O modo de alimentação empregado no cultivo de uréia pode prevenir o acúmulo ou a falta desse nutriente no cultivo. Sanchez-Luna *et al.* (2004) relataram que a adição diária de uréia a uma taxa constante pode ser usada no cultivo de *S. platensis*, implicando em baixo custo na produção da biomassa por não precisar de bombas para alimentação.

A baixa concentração de nitrogênio no cultivo limita o crescimento celular. Por outro lado, a alta concentração de nitrogênio inibe o mesmo. Deste modo, foram feitos cultivos de *A. platensis* utilizando a fonte de nitrogênio convencional (NaNO_3) para se observar a necessidade diária de nitrogênio consumida pelas células nas diferentes intensidades luminosas, e com base nessas curvas de crescimento obtidas, foram calculadas as quantidades de uréia diária necessárias visando evitar a limitação ou inibição de crescimento celular pela fonte de nitrogênio, como pode-se observar nas Tabelas 7, 9, 10, 13, 16, 19 e 22. Além disso, foi empregado o processo descontínuo alimentado que deve ser usado para melhorar a densidade celular no crescimento da *A. platensis*, desde que a concentração de nitrogênio solúvel possa ser adicionada até alcançar a produção máxima de biomassa sem resultar na inibição do crescimento.

Outro fator importante no crescimento celular de micro-organismos fotossintetizantes é a intensidade luminosa. Nas culturas fotossintéticas, a quantidade de energia luminosa captada pelas células tem uma relação direta com a capacidade de fixação do CO_2 , consequentemente, a luz determina a produtividade e a taxa de crescimento celular. As diferentes intensidades luminosas estudadas influenciaram nas concentrações celulares máximas. Um aumento da intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para $120 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ houve um aumento no valor da concentração celular máxima. No entanto, um aumento da intensidade luminosa de $120 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para $240 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, as concentrações celulares máximas obtiveram valores próximos. Geralmente, a taxa de crescimento das células microalgas aumenta com a intensidade luminosa, e a taxa atinge um valor de saturação quanto maior for a intensidade luminosa porque o excesso da energia luminosa não pode ser utilizada para a fotossíntese nas células e, quando submetidas a um valor de intensidade

luminosa ainda maior, o crescimento celular é reprimido como relatado por Hirata *et al.*, (1998) e Chojnacka e Noworyta (2004a).

Segundo Hirata *et al.*, (1998) e Chojnacka e Noworyta (2004a), existe uma correlação entre o crescimento da *Arthrospira* ssp e a intensidade luminosa que são definidas por regiões denominadas: região limitada por luz, saturada por luz e inibida por luz. A região saturada por luz é definida como alta intensidade luminosa, onde o crescimento celular independe da intensidade luminosa. Essa região saturada por luz pode ser observada no presente trabalho, uma vez que, o aumento da intensidade luminosa não interferiu na concentração celular máxima. O intervalo da intensidade luminosa dessas regiões depende de vários fatores como: configuração do reator, micro-organismo, condições de cultivo.

S. platensis cultivada em reator retangular alcançou um aumento no valor da velocidade específica de crescimento com o aumento da intensidade luminosa de 8 a 34 W m^{-2} , mas foi reduzido quando a intensidade luminosa aumentou de 34 W m^{-2} ($156 \text{ } \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para 158 W m^{-2} ($724 \text{ } \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e foi completamente reprimida a 158 W m^{-2} (HIRATA *et al.*, 1998). Chojnacka e Noworyta (2004a) avaliando o cultivo fotoautotrófico da *S. platensis* em reator retangular também concluíram que a velocidade de crescimento específica aumenta com o aumento da intensidade luminosa até um valor de 30 W m^{-2} . Entre os valores de intensidade luminosa de 30 W m^{-2} ($138 \text{ } \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a 50 W m^{-2} ($229 \text{ } \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), observa-se a região de saturação luminosa e acima desse valor (50 W m^{-2}) ocorre o fenômeno da fotoinibição.

Nos cultivos sob maiores intensidades luminosas (120 e $240 \text{ } \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) desenvolveram uma coloração amarelada no decorrer do cultivo, por outro lado, no cultivo a $60 \text{ } \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, as células apresentaram uma coloração mais verde-azulada clássica. Como é bem conhecido, sob condições limitantes de nitrogênio, o conteúdo de clorofila da *S. platensis* diminui, apresentando uma coloração verde-amarelada ao contrário da coloração verde-azulada clássica (CARVALHO *et al.*, 2004). No entanto, no presente estudo, como não houve limitação de nitrogênio durante os cultivos, essa coloração amarelada pode ser devido à alta intensidade luminosa, uma vez que as intensidades luminosas estudadas atingiram a região saturado por luz como definido por Hirata *et al.*, (1998) e Chojnacka e Noworyta (2004a). Do mesmo modo, Vonshak *et al.* (1996) relataram que o crescimento da *S. platensis* torna-se saturado a um intervalo de 150 a 200

μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e esta faixa da intensidade luminosa corresponde a aproximadamente de 10-15% da radiação solar total a 400-700 nm.

Geralmente o pH do meio aumenta durante o crescimento celular devido à assimilação da fonte de carbono, o bicarbonato, durante a fotossíntese (WATANABE *et al.*, 1995; BINAGHI *et al.*, 2003). Os íons bicarbonato são transportados ativamente para o interior celular, convertidos a carbonato e gás carbônico, que é utilizado na fotossíntese. Para cada molécula de CO_2 utilizada pela célula ocorre a liberação de um íon carbonato. O pH da cultura foi mantido a $9,5 \pm 0,2$ (SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007; TREDICI; ZITTELLI, 1998), logo o CO_2 consumido pelo microorganismo foi repostado por CO_2 não havendo modificações severas do pH, o que acarretaria uma redução no crescimento da *S. platensis*. Valores de pH altos, por exemplo acima de 11, pode ser um fator no qual restringe a produtividade no sistema *air-lift* usando ar não suplementado com CO_2 (WATANABE *et al.*, 1995).

Normalmente, culturas de microorganismos fotossintéticos usam como fonte de carbono o bicarbonato e/ou carbonato. Estes nutrientes são adicionados em grande quantidade no meio Schlösser para o cultivo de *A. platensis* ($12,08 \text{ g L}^{-1}$). Adicionalmente, estes micro-organismos têm a capacidade de fixar CO_2 como fonte de carbono, na qual é liberado pelos efluentes industriais. Logo, este CO_2 pode ser adicionado ou substituído no meio de cultura reduzindo os custos da produção de microorganismos fotossintéticos, bem como reduzindo os problemas ambientais causados por esse gás.

O sequestro de CO_2 mostrou ser efetivo nas células de *Chlorella vulgaris* e a presença da mistura de CVOs (benzeno, tolueno, acetona, metanol e naftaleno) presente no efluente não interferiu no uso desse CO_2 e, adicionalmente 11% dos CVOs foram removidos (KEFFER; KLEINHEINZ, 2002).

Diferentes autores relataram sobre o crescimento mixotrófico da *A. platensis* na presença de glicose (ZHANG *et al.*, 1998; CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004) ou acetato (CHEN *et al.*, 2006). Márquez *et al.* (1993) mostraram que a *S. platensis* é capaz de crescer heterotroficamente ou mixotroficamente, na presença de glicose, sugerindo que o crescimento autotrófico e heterotrófico são independentes. Em cultivos mixotróficos, o CO_2 e composto orgânico são assimilados conjuntamente, podendo ser um processo mais eficiente para a produção de biomassa microalgal, desde que isto implica em uma economia em energia usada para a síntese do aparato fotossintético e para a fixação do carbono (LEE, 2004). Chen *et al.* (2006)

mostraram que o acetato pode ser usado como fonte de carbono, em cultivos mixotróficos de *S. platensis*, para a produção de vários pigmentos fotossintéticos e obtenção da concentração de biomassa máxima ($1,65 \text{ g L}^{-1}$), na qual obtiveram valores maiores que usando apenas bicarbonato ($1,08 \text{ g L}^{-1}$).

Menzyanova *et al* (2002) observaram que a adição de pequenas quantidades de etanol (0,1 - 0,3%) aumentou a concentração de *Dunaliella viridis*, enquanto que em quantidades maiores que 0,5%, não houve efeito no crescimento. A adição múltipla e sucessiva de etanol no cultivo favoreceu a um acúmulo de etanol no meio de cultivo, o que provocou uma inibição o crescimento da *D. viridis* quando a concentração de etanol foi de 0,3% e causou a morte celular na concentração de etanol de 0,5%.

Apesar do etanol ser o CVO predominante no material gasoso, sua proporção em relação ao CO_2 é pequena (resultados obtidos pelo instituto de Pesquisa Tecnológica). Assim, no presente trabalho não se observou um efeito dos voláteis orgânicos (CVOs) liberados da fermentação alcoólica no cultivo de *A. platensis*. Esses CVOs são constituídos a maior parte por 43 – 47% de etanol (Basso *et al.*, 1996) e, em menor quantidade acetaldeído, propanol, isobutanol, álcool isoamílico e acetato de etila (CAEHOT *et al.*, 1991). Logo, *A. platensis* pode ser usada para o tratamento de efluentes gasosos nas indústrias de fermentação alcoólica. Logo, observou-se que o efluente gasoso liberado das indústrias de fermentação alcoólica pode ser usado no cultivo de *A. platensis* sem prejudicar o crescimento celular.

Similarmente, Ferraz *et al.* (1985) observaram que é possível cultivar *S. maxima* em reatores abertos (*open ponds*) borbulhando o CO_2 proveniente da fermentação alcoólica de modo descontínuo e usando nitrato com fonte de nitrogênio.

A adição de CO_2 no reator, além de controlar o pH, fornece a fonte de carbono para o crescimento celular. Como pode ser observado nas Tabelas 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21 e 23, mesmo ocorrendo o crescimento celular, as concentrações de carbonato total sempre apresentaram valores altos, de um modo geral próximos aos $12,08 \text{ g L}^{-1}$ iniciais (concentração indicada em Schlösser *et al.* 1982), indicando que os cultivos também não foram limitados pela fonte de carbono.

Durante a fotossíntese oxigênica, realizada pela *S. platensis*, ocorre a liberação de O_2 no meio de cultura. Elevadas concentrações de O_2 no meio de cultura pode prejudicar o crescimento celular, uma vez que, este pode danificar o

aparato fotossintético dificultando a realização da fotossíntese. Por isso, a concentração de O_2 deve ser controlada durante o crescimento celular. As concentrações de oxigênio foram analisadas diariamente e os valores não atingiram níveis inibitórios, pois foram sempre menores que 10 mg L^{-1} (Vonshak, 1997).

6.3 Avaliação dos parâmetros concentração celular máxima (X_m), Produtividade em células (P_x) e Fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$)

Na Tabela 24 estão descritos os valores da concentração celular máxima, produtividade em células e fator de conversão de nitrogênio em células. Nas Tabelas 25, 28 e 31 estão descritos a análise de variância dos parâmetros cinéticos, X_m , P_x e $Y_{X/N}$, respectivamente. Os valores médios de X_m , P_x e $Y_{X/N}$ para cada variável independente estão descritos nas Tabelas 26, 27, 29, 30, 32 e 33.

Tabela 24 - Valores da concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) com diferentes fontes de CO_2 , fontes de nitrogênio e intensidades luminosas.

Experimento	Fonte de CO_2	Intensidade luminosa (I)	Fonte de nitrogênio	X_m ($mg\ L^{-1}$)	P_x ($mg\ L^{-1}\ d^{-1}$)	$Y_{X/N}$ ($g.\ g^{-1}$)
1	Cilindro	60	$NaNO_3$	2899 ± 17	250 ± 2	$4,2 \pm 0,03$
2	Cilindro	60	Uréia	2847 ± 1	245 ± 1	$14 \pm 0,00$
3	Fermentação alcoólica	60	$NaNO_3$	3120 ± 156	299 ± 10	$4,0 \pm 0,14$
4	Fermentação alcoólica	60	Uréia	2957 ± 99	308 ± 4	$14 \pm 0,17$
5	Cilindro	120	$NaNO_3$	3209 ± 109	454 ± 18	$4,5 \pm 0,18$
6	Cilindro	120	Uréia	2980 ± 103	408 ± 17	$11 \pm 0,50$
7	Fermentação alcoólica	120	$NaNO_3$	2728 ± 27	428 ± 4	$4,3 \pm 0,04$
8	Fermentação alcoólica	120	Uréia	2855 ± 11	425 ± 6	$15 \pm 0,2$
9	Cilindro	240	$NaNO_3$	3291 ± 206	482 ± 34	$5,4 \pm 0,38$
10	Cilindro	240	Uréia	3236 ± 72	473 ± 12	$13,3 \pm 0,34$
11	Fermentação alcoólica	240	$NaNO_3$	3102 ± 130	450 ± 22	$5,0 \pm 0,24$
12	Fermentação alcoólica	240	Uréia	3070 ± 112	445 ± 19	$14 \pm 0,56$

$I = \mu mol\ de\ fótons\ m^{-2}\ s^{-1}$

6.3.1 Concentração celular máxima

Na Tabela 25 estão apresentados os resultados da análise de variância da concentração celular máxima (X_m) e nas Tabelas 26 e 27 estão apresentadas as

médias do X_m nas variáveis independentes fontes de nitrogênio e intensidades luminosas, respectivamente.

Tabela 25 - Análise de variância para a concentração celular máxima

efeitos	Soma dos quadrados	Número de grau de liberdade	Media dos quadrados	Teste F	Nível de significância
Fonte de CO ₂	13585	1	13585	1,57	0,225
Fonte de Nitrogênio	84	1	84	0,01	0,922
Intensidade luminosa	443083	2	221542	25,66	0,000
Resíduos	164033	19			
total	620786	23			

Como se observa na Tabela 25, a variável independente intensidade luminosa foi estatisticamente significativa na determinação do X_m ($p = 0,000$), enquanto que as variáveis independentes fonte de CO₂ ($p = 0,225$) e fonte de nitrogênio ($p = 0,922$) não influenciaram estatisticamente no valor de X_m . De fato, a similaridade das fontes de nitrogênio já era esperada, uma vez que a adição de uréia nos cultivos, para cada intensidade luminosa, foram baseadas em seus respectivos cultivos com nitrato, visando um crescimento celular não limitado e nem inibido pela fonte de nitrogênio e obtendo, portanto, valores de X_m médios semelhantes. Ambas as fontes de nitrogênio utilizadas são facilmente assimiladas pela *A. platensis*, os valores de X_m foram estatisticamente iguais para cada intensidade luminosa avaliada (Tabela 26).

Em relação à fonte de CO₂, Isto mostra que o CO₂ e os voláteis orgânicos liberados na atmosfera como resíduo podem ser utilizados como fonte de carbono no cultivo de *A. platensis*, sem prejudicar o crescimento celular.

Tabela 26 - Médias das concentrações celular máxima para a variável independente fonte de nitrogênio.

Fonte de nitrogênio	X_m média (mg.L ⁻¹)*
Nitrato	3027 ± 162 ^a
Uréia	3031 ± 174 ^a

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95% (Teste de Tukey).

Comparando-se as médias de X_m entre as diferentes intensidades luminosas, observa-se que o valor médio de X_m na intensidade luminosa de 60 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi estatisticamente diferente ao valor médio de X_m quando a intensidade luminosa foi de 120 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e este foi estatisticamente semelhante ao valor médio de X_m quando a intensidade luminosa foi de 240 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 27). Essas comparações das médias de X_m explicam o valor do nível descritivo obtido pela análise de variância para a variável intensidade luminosa ($p = 0,000$, Tabela 25), mostrando que a esta influencia no valor de X_m . Esses resultados estão de acordo com Chojnacka e Noworyta (2004a) que avaliaram o cultivo fotoautotrófico da *S. platensis* em reator retangular também concluíram que a velocidade de crescimento específica aumenta com o aumento da intensidade luminosa até um valor de 30 W m^{-2} (138 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Entre os valores de intensidade luminosa de 30 W m^{-2} (138 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 50 W m^{-2} (229 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), observa-se a região de saturação luminosa. Acima desse valor (50 W m^{-2}) ocorre o fenômeno da fotoinibição. Do mesmo modo, no presente trabalho, os valores de X_m foram estatisticamente iguais nas intensidades luminosas de 120 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 240 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, cujas intensidades luminosas são próximas às intensidades luminosas que correspondem à região de saturação luminosa observada por Chojnacka e Noworyta (2004a).

Tabela 27 - Médias das concentrações celular máxima para a variável independente intensidade luminosa.

Intensidade luminosa (μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	X_m média (mg.L^{-1})*
60	2851 $\pm$ 54 ^a
120	3056 $\pm$ 115 ^b
240	3180 $\pm$ 96 ^b

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95% (Teste de Tukey).

A maior concentração celular máxima encontrada nesse trabalho foi maior do que a obtida por Binaghi *et al.* (2003) utilizando minitanques no cultivo de *S. platensis* (1,5 g L^{-1}) e também maior que a obtida por Watanabe e Hall (1996) utilizando fotobiorreator tubular cônico no cultivo de *S. platensis* (1,3 g L^{-1}).

Morais e Costa (2007a) relataram que em cultivo de *S. platensis* em fotobiorreator tubular vertical obtiveram maiores valores de X_m de 4,13 g L⁻¹ suplementado com 6% CO₂ quando comparadas em cultivos em Erlenmeyer. Esses autores relatam que a *S. platensis* podem crescer com 18% CO₂, demonstrando que estes suportam altas concentrações de CO₂, podendo ser usado para mitigar o efeito do CO₂ emitido pelos gases efluentes.

Olguín *et al.* (2001) avaliando o crescimento da *S. platensis* em meio contendo água do mar suplementado com efluentes anaeróbicos a partir da digestão de resíduo da suinocultura e em meio Zarrouk, também observaram um aumento no valor de X_m com o aumento da intensidade luminosa de 66 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para 144 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

6.3.2 Produtividade volumétrica de células

Na Tabela 28 estão apresentados os resultados da análise de variância da produtividade em células (P_x) e nas Tabelas 29 e 30 estão apresentadas as médias do P_x nas variáveis independentes fontes de nitrogênio e intensidades luminosas, respectivamente.

Tabela 28 - Análise de variância para a produtividade em células

efeitos	Soma dos quadrados	Número de grau de liberdade	Media dos quadrados	Teste F	Nível de significância
Fonte de CO ₂	315	1	315	1,37	0,256
Fonte de Nitrogênio	1	1	1	0,00	0,947
Intensidade luminosa	116579	2	58289	253,72	0,000
Resíduos	4365	19	230		
total	121260	23			

Avaliando-se os parâmetros produtividades em células pela análise de variância (Tabela 28), pode-se notar que a fonte de CO₂ ($p=0,256$) e a de nitrogênio ($p=0,947$) não interferiram nas produtividades em celulares. Portanto, a intensidade luminosa mostrou ser estatisticamente significativa no valor de P_x ($p=0,000$).

Tabela 29 - Médias das produtividades em células para a variável independente fonte de nitrogênio

Fonte de nitrogênio	Px médio (mg.L ⁻¹ d ⁻¹)*
Nitrato	404 ± 74 ^a
Uréia	405 ± 75 ^a

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95%.

Como se pode observar na Tabela 29, os valores médios de Px para as diferentes fontes de nitrogênio estudadas não diferiram estatisticamente. Do mesmo modo como ocorreu com o parâmetro Xm, os valores de Px nos cultivos com uréia e nitrato foram semelhantes, para cada intensidade luminosa. Isso já era esperado, uma vez que a adição de uréia nos cultivos, para cada intensidade luminosa, foram baseadas em seus respectivos cultivos com nitrato. *Spirulina platensis* cultivadas em minitanques com 2,57 mg L⁻¹ de KNO₃ ou 500 mg L⁻¹ de uréia obtiveram valores de Px semelhantes para as intensidades luminosas estudadas, 1,4 klux (16,8 μmol de fótons m⁻² s⁻¹) ou 5,6 klux (67,2 μmol de fótons m⁻² s⁻¹) (RANGEL-YAGUI *et al.* 2004).

Tabela 30 - Médias das produtividades em células para a variável independente intensidade luminosa

Intensidade luminosa (μmol de fótons m ⁻² s ⁻¹)	Px médio (mg.L ⁻¹)*
60	306±7 ^a
120	443±19 ^b
240	463±16 ^b

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95%.

Os maiores valores de produtividade em células foram encontrados nas maiores intensidades luminosas obtendo valores médios de 443 ± 19 mg L⁻¹ d⁻¹ a 120 μmol de fótons m⁻² s⁻¹, e 463 ± 16 mg L⁻¹ d⁻¹ a 240 μmol de fótons m⁻² s⁻¹ independente da fonte de nitrogênio utilizada (Tabela 30). Durante a fotossíntese, as células podem utilizar somente uma soma limitada de energia luminosa por vez. Este fenômeno de saturação luminosa é provavelmente resultado de um mecanismo interno onde as células podem realizar a fotossíntese usando somente uma

determinada quantidade de luz (CARLOZZI, 2003). Isso significa que, durante a saturação luminosa, um aumento da intensidade luminosa não permitirá um aumento da concentração celular e nem reduzirá o tempo de cultivo, mantendo próximos os valores de produtividades de células nesse intervalo de saturação luminosa.

Na menor intensidade luminosa ($60 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), o valor de P_x foi menor em relação às outras intensidades luminosas, obtendo valor médio de $306 \pm 7 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$. Do mesmo modo como observado nas outras intensidades luminosas, as fontes de nitrogênio estudadas não influenciaram na produtividade celular. Essa diferença nos valores de P_x entre as intensidades luminosas foi devido a um maior tempo de cultivo nos experimentos submetidos à intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A produtividade é uma razão inversa do tempo de cultivo, logo, quanto maior a intensidade luminosa, mais rápida as células atingem a concentração celular máxima e, conseqüentemente, maior será a produtividade celular diária. Quanto maior a intensidade luminosa, maior é a quantidade de fótons emitidos e, estes podem ser absorvidos pelas células, isto é, maior é a quantidade de energia luminosa que será convertido em energia química, que por sua vez, as células utilizam essa energia química para a manutenção e o crescimento celular. Esse efeito também foi observado por Danesi *et al.*, (2004) Rangel-Yagui *et al.* (2004) em cultivos de *S. platensis* em minitanques utilizando KNO_3 ou uréia como fontes de nitrogênio.

O maior valor da produtividade encontrada nesse trabalho foi próximo a $510 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ obtido por Watanabe e Hall (1996) investigando o crescimento da *S. platensis* em fotobiorreator helicoidal cônico, sob ciclos 12h/12h (claro/escuro) e uma média de fluxo de fótons de $546 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Watanabe *et al.* (1995) em processo descontínuo, utilizando a *S. platensis* cultivada em fotobiorreator tubular helicoidal cônico utilizando luz artificial ($118 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) também obtiveram uma produtividade volumétrica diária de $0,51 \text{ g L}^{-1} \text{d}^{-1}$. Foram usados dois sistemas (*airlift* e bomba) para reciclar a cultura. Com o sistema *airlift*, os autores encontraram a maior concentração da biomassa de $1,6 \text{ g. L}^{-1}$ após 5 dias de crescimento da *S. platensis* e uma menor concentração da biomassa quando utilizado o sistema de bomba. No fotobiorreator tubular helicoidal cônico quando cultivado em ambiente externo a produtividade foi de $900 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (TREDICI;

ZITTELLI, 1998). Travieso *et al.*, (2001) encontrou uma produtividade máxima de $0,40 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ em fotobiorreator tubular helicoidal operado de modo semicontínuo.

No presente trabalho, os maiores valores da produtividade em células encontradas, foram maiores do que a relatada por Richmond (1990) em reatores tubulares em ambiente externo que foi de $370 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e Moraes e Costa (2007b) que obteve X_{max} de $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, no cultivo de *Spirulina* sp. na presença de 6% de dióxido de carbono em fotobiorreator tubular com três estágios em série. Por outro lado, autores como Carlozzi e Pinzani (2005) conseguiram uma produtividade em células máxima de $1,82 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ utilizando o processo descontínuo em ambiente externo. Lee (2001) relata que dependendo da configuração de fotobiorreator tubular fechado e de placas retangulares, a produtividade volumétrica foi de $0,25$ a $3,64 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ utilizando o processo descontínuo alimentado.

Travieso *et al.* (2001) relataram uma produtividade máxima de $0,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, em processo semicontínuo de *Spirulina* utilizando uma diluição de 1:5 e taxa de diluição de $0,0078 \text{ h}^{-1}$. Esses autores utilizaram o fotobiorreator patenteado “*Biocoil*” da Biotechna Grassier, UK (European patent EPO239272, March 6, 1987).

Vernerey *et al.* (2001) utilizando uma nova configuração de fotobiorreator para o aumento da escala (72 litros) na produção de *S. platensis* conseguiram uma produtividade de $1,38 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ com intensidade luminosa de 300 W m^{-2} e pH controlado a 9,5 pela adição de CO_2 .

Cultivos de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular *outdoor* no período de março a setembro de 2002 na República Checa, com a maioria dos dias ensolarados, a irradiância do ambiente máxima foi entre 1,5 and 1,8 mmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Nessas condições, a produtividade máxima atingida foi de $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ correspondendo a um rendimento de área (baseada na área superficial) de aproximadamente $32,5 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ na qual é um valor relativamente alto se considerar que foi obtida no mês de setembro. A concentração celular ótima da cultura foi obtida em um intervalo de 1 a 2 g L^{-1} demonstrando que a faixa da concentração celular ótima, no cultivo de *Spirulina*, não é muito restrita (MASOJIDEK *et al.*, 2003).

6.3.3 Fator de conversão de nitrogênio em células

Na Tabela 31 estão os resultados da análise de variância para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) e nas Tabelas 32 e 33 estão os valores

médios do $Y_{X/N}$ nas variáveis independentes fontes de nitrogênio e intensidades luminosas, respectivamente.

Tabela 31 - Análise de variância para fator de conversão de nitrogênio em células

efeitos	Soma dos quadrados	Número de grau de liberdade	Media dos quadrados	Teste F	Nível de significância
Fonte de CO ₂	0,54	1	0,54	0,91	0,351
Fonte de Nitrogênio	507,8	1	507,8	845,3	0,000
Intensidade luminosa	0,43	2	0,22	0,36	0,700
Resíduos	11,23	19	0,59		
total	520	23			

Como observado na Tabela 24, os maiores valores do fator de conversão ($Y_{X/N}$) foram obtidos nos cultivos utilizando uréia como fonte de nitrogênio, independente da fonte de CO₂ e da intensidade luminosa utilizada. Isso pode ser avaliado pela análise de variância (Tabela 31) onde apresenta o nível descritivo para a fonte de CO₂, fonte de nitrogênio de $p = 0,000$ e para a intensidade luminosa o $p = 0,700$. A maior média dos valores de $Y_{X/N}$ foi $13,80 \pm 0,90 \text{ g g}^{-1}$ obtida nos cultivos utilizando uréia como fonte de nitrogênio (Tabela 32), diferindo estatisticamente dos valores obtidos nos cultivos com nitrato ($4,60 \pm 0,55 \text{ g g}^{-1}$). De fato, nos cultivo utilizando uréia, a concentração de nitrogênio adicionada diariamente foi calculada com base na necessidade das células para o crescimento e a manutenção celular, não ocorrendo uma limitação ou um excesso de nitrogênio adicionado durante o cultivo (item 5). Como mencionado por Rangel-Yagui *et al.* (2004) o excesso de uréia diminui a eficiência de utilização desse nutriente e, portanto, menor o valor de $Y_{X/N}$. Da mesma forma, a menor massa total adicionada no cultivo proporcionou maiores valores de $Y_{X/N}$ ($7,39 \text{ g g}^{-1}$) no cultivo de *S. platensis* em minitanques utilizando o cloreto de amônio como fonte de nitrogênio (Carvalho *et al.*, 2004). Por outro lado, nos cultivos com nitrato, a concentração deste foram mantidas acima de 1 g L^{-1} , de modo a evitar a limitação do crescimento pela fonte de nitrogênio. Por isso, os maiores valores de $Y_{X/N}$ foram obtidos nos cultivos utilizando uréia. Resultados similares foram obtidos por Danesi *et al.* (2003) empregando 2,5 g de uréia em

diferentes protocolos de alimentação e temperatura em relação a KNO_3 e por Danesi *et al.* (2004) que também observaram um maior fator de conversão utilizando uréia em relação a KNO_3 , independente da intensidade luminosa utilizada (2 e 5 klux). Rangel-Yagui *et al.* (2004) também observaram maiores valores de $Y_{X/N}$ nos cultivos utilizando uréia.

Tabela 32 - Médias dos fatores de conversão de nitrogênio em células para a variável independente fonte de nitrogênio

Fonte de nitrogênio	$Y_{X/N}$ (mg.mg ⁻¹)*
Nitrato	4,60 ± 0,55 ^a
Uréia	13,80 ± 0,90 ^b

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95%.

Em relação à variável independente intensidade luminosa, pode-se observar na Tabela 33 que não diferiram estatisticamente nos valores de $Y_{X/N}$. Isto é, independente da intensidade luminosa utilizada, os valores de conversão de nitrogênio em células foram estatisticamente iguais. De fato, a quantidade de nitrogênio adicionada nos cultivos está relacionada com o crescimento celular, portanto, quanto maior o valor de X_m , maior foi a quantidade de nitrogênio adicionada nos cultivos, independente da fonte nitrogênio utilizada (nitrato ou uréia). Com isso, razão entre biomassa formada e nitrogênio adicionado foi estatisticamente igual nas diferentes intensidades luminosas estudadas.

A Intensidade luminosa influenciou no crescimento celular (Item 6.2) e a fonte de nitrogênio (nitrato ou uréia) foi adicionada de acordo com a necessidade da célula para o crescimento celular (Item 5). Por isso, o $Y_{X/N}$ foi estatisticamente igual ($p = 0,245$) nas diferentes intensidades luminosas estudadas (Tabela 31).

O fator de conversão de nitrogênio em células é definido como a quantidade de nitrogênio utilizada para a formação de biomassa, como no presente trabalho, o nitrogênio adicionado foi de acordo com a necessidade diária das células, os valores médios de $Y_{X/N}$ para cada intensidade luminosa não poderiam variar, como pode ser observado na Tabela 33.

Nos trabalhos apresentados por Bezerra *et al.* (2008), Danesi *et al.* (2004) e Rangel-Yagui *et al.* (2004) observaram que os valores de X_m e $Y_{X/N}$ aumentam com

o aumento da intensidade luminosa fornecida ao cultivo. Maiores energias fornecidas pelas mais altas luminosidades empregadas nos cultivos permitem as células de consumirem o nitrogênio disponível, levando a maiores valores de X_m e $Y_{X/N}$. Isso ocorreu porque a mesma quantidade de nitrogênio foi adicionada nos ensaios com diferentes intensidades luminosas, logo o $Y_{X/N}$ foi uma função de X_m . Por outro lado, no presente trabalho, os valores médios $Y_{X/N}$ não diferiram estatisticamente com o aumento da intensidade luminosa porque a quantidade total de nitrogênio adicionada variou nos cultivos com as diferentes intensidades luminosas, isto é, quanto maior a intensidade luminosa, maior foi a quantidade de nitrogênio adicionada e, conseqüentemente maior concentração celular. Por isso, o $Y_{X/N}$ não diferiram nas diferentes intensidades luminosas estudadas (Tabela 26).

Tabela 33- Médias dos fatores de conversão de nitrogênio em células para a variável independente intensidade luminosa

Intensidade luminosa ($\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	$Y_{X/N}$ (mg.mg ⁻¹)*
60	9,22 $\pm$ 0,34 ^a
120	9,02 $\pm$ 0,34 ^a
240	9,35 $\pm$ 0,34 ^a

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95%.

Os maiores valores do fator de conversão encontrado nesse trabalho (13,27 $\pm$ 0,28 mg mg⁻¹) foi maior do que 7,39 g g⁻¹ (CARVALHO et al, 2004), 8,5 g g⁻¹ (RANGEL-YAGUI et al. 2004a) utilizando uréia e 5,7 $\pm$ 0,17 g g⁻¹ utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio nos cultivos de *S. platensis* em minitaques (BEZERRA et al., 2008). Isso porque, no presente trabalho a *S. platensis* foi cultivada em fotobiorreator tubular fechado, o que proporciona menor volatilização da amônia e melhor é o seu aproveitamento pelas células, ocasionando maiores valores de $Y_{X/N}$.

6.4 Avaliação da concentração de clorofila a

No final de cada experimento, foi realizada a determinação da concentração de clorofila **a** na concentração celular final, e os resultados estão descritos na Tabela 34.

Tabela 34 – Concentrações de clorofila na biomassa final.

Experimento	Fonte de CO ₂	Intensidade luminosa ^a	Fonte de nitrogênio	Concentração de clorofila (mg cl. g cel ⁻¹)
1	Cilindro	60	NaNO ₃	5,21±0,28
2	Cilindro	60	Uréia	4,15±0,20
3	Fermentação alcoólica	60	NaNO ₃	3,92±0,08
4	Fermentação alcoólica	60	Uréia	3,26±0,30
5	Cilindro	120	NaNO ₃	3,44±0,10
6	Cilindro	120	Uréia	2,96±0,09
7	Fermentação alcoólica	120	NaNO ₃	2,94±0,40
8	Fermentação alcoólica	120	Uréia	2,10±0,23
9	Cilindro	240	NaNO ₃	1,75±0,37
10	Cilindro	240	Uréia	1,81± 0,15
11	Fermentação alcoólica	240	NaNO ₃	2,94±0,35
12	Fermentação alcoólica	240	Uréia	2,10±0,23

^a μmol de fótons m⁻² s⁻¹

Dentre os metabólitos microalgais, a clorofila foi muito pouco investigada. São os únicos pigmentos naturais de coloração verde em abundância, mas sua instabilidade ao isolamento tem restringido a sua utilização como corante natural na indústria de alimentos. As clorofilas utilizadas como corantes alimentares provêm principalmente de plantas terrestres (HENDRY, 1996)

Microalgas fotossintéticas são organismos que capturam energia luminosa eficientemente. O pigmento fotossintético, clorofila **a**, é o principal componente

fotoquímico ativo, na qual funciona como um receptor de luz para direcionar a fotossíntese. O conteúdo deste pigmento em microalga é, portanto, relatado para atividade fotossintética (MACINTYRE *et al.*, 2002). A intensidade de luz captada pelos pigmentos influencia na produção da biomassa e no acúmulo de produtos alvos na microalga cultivada sob diferentes condições.

As clorofilas são pigmentos verdes, de alto valor comercial, encontradas em plantas, microalgas e cianobactérias como *A. platensis*. A concentração desse pigmento nas células depende das condições ambientais. Devido a sua cor e as propriedades físico-químicas, são utilizadas como corantes naturais em produtos alimentícios.

Na Tabela 35 observa-se que ambas as variáveis independentes avaliadas nesse estudo, fonte de nitrogênio e intensidade luminosa, interferiram na concentração de clorofila **a** na biomassa final. Isso foi confirmada pela análise estatística ANOVA, onde apresentou um valor de nível descritivo de 0,011 para a variável independente fonte de nitrogênio e de 0,000 para a intensidade luminosa.

Tabela 35 - Análise de variância para a concentração de clorofila na biomassa final.

efeitos	Soma dos quadrados	Número de grau de liberdade	Média dos quadrados	Teste F	Nível de significância
Fonte de CO ₂	0,3725	1	0,3725	1,01	0,328
Fonte de Nitrogênio	2,9751	1	2,9751	8,04	0,011
Intensidade luminosa	15,8306	2	7,9153	21,39	0,000
Resíduos	7,0318	19	0,1272		
Total	26,210	23			

Avaliando-se as médias da concentração de clorofila **a** nas diferentes fontes de nitrogênio (Tabela 34), observa-se que nos cultivos utilizando nitrato obtiveram maiores concentrações de clorofila em relação aos cultivos com uréia, nas intensidades luminosas de 60 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 120 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Essa diferença na concentração de clorofila pode ser explicada pelo fato dos cultivos com nitrato, a concentração de nitrato no meio de cultura foi mantida sempre superior a 1 g L^{-1} , enquanto que nos cultivos com uréia, a concentração de uréia no

meio cultura foi abaixo de 10^{-4} M (item 6.2). Essa concentração de uréia, apesar de não interferir na concentração celular, pode ter influenciado na concentração de clorofila nas células. Resultados similares foram observados por Danesi *et al.*, (2004) e Rangel-Yagui *et al.* (2004) em cultivos de *S. platensis* em minitanques, substituindo a fonte de nitrogênio KNO_3 por uréia.

O efeito da limitação de nitrogênio e ferro comprometeu a capacidade fotossintética, reduziu o conteúdo de clorofila celular e diminuiu o rendimento quântico do fotossistema II (YOUNG; BEARDALL, 2005). Muggli e Harrison (1996) observaram que a concentração de clorofila nas células de *Emiliana huxleyi* cultivadas com nitrato foi estatisticamente maior que nas células cultivadas com amônia sob condições limitadas de ferro e intensidade luminosa abaixo da saturação. Por outro lado, nos cultivos não limitados com ferro, as concentrações de clorofilas foram estatisticamente iguais. Sob duas diferentes intensidades luminosas abaixo da região de saturação (45 e 70 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), as células cultivadas em nitrato mantiveram uma maior taxa de clorofila por volume de células que nas células cultivadas com amônio, similar ao que aconteceu nas condições limitadas por ferro.

A intensidade luminosa é uma importante variável que interfere na concentração de clorofila. Como podemos observar na Tabela 34, maiores concentrações de clorofilas médias, independente da fonte de nitrogênio e de CO_2 , são encontradas nas menores intensidades luminosas. De um modo geral, o aumento da concentração de clorofila, com a redução da luminosidade, aumenta a capacidade de absorção de luz, pois a clorofila é quem efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese e representa um mecanismo de adaptação à condição de menor intensidade luminosa. A redução do conteúdo de pigmentos a altas irradiâncias permite as algas reduzirem a taxa de fornecimento de energia pela absorção da luz nas células, com a finalidade de balancear a energia absorvida e a energia necessária para a fixação do carbono e crescimento celular (GEIDER *et al.*, 1997). Geralmente, a clorofila e as ficobiliproteínas tendem a aumentar sua concentração, com a redução da intensidade luminosa (TOMASELLI *et al.*, 1997)

Nas menores intensidades luminosas, onde a competição pelo poder redutor é maior, observa-se que as células cultivadas em nitrato mantêm maiores níveis de clorofila que nas células cultivadas em amônia. Portanto, as células cultivadas em nitrato precisam mais do poder redutor para transportar e utilizar sua fonte de

nitrogênio, eles podem requerer mais clorofila que as células cultivadas em amônio para suprir tais necessidades. Por outro lado, altas intensidades luminosas alteram o complexo protéico contendo pigmentos captadores de luz como observado por Smith *et al.* (1990) em células de *Dunaliella salina*. Telfar *et al.* (1990) mostrou que iluminação prolongada causa destruição dos pigmentos da clorofila e conduz a inibição fotoquímica do FSII

Cultivos de *Spirulina subsalsa* exposto à alta intensidade luminosa ($100 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mostrou uma redução no conteúdo de pigmentos nas células. O conteúdo de carotenóide e clorofila *a* reduziu com o aumento da intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $100 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O conteúdo de ficobilissomos obteve uma maior redução quando comparados com o conteúdo de clorofila *a* (aproximadamente 70% e 57%, respectivamente). Devido a uma redução nos carotenóides, zeaxantina foi o carotenóide predominante a maior intensidade luminosa (TOMASELLI *et al.* 1995). Um aumento da intensidade luminosa de 2 klux ($24 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para 5 klux ($60 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), houve uma redução na concentração de clorofila de $14 \pm 1,8 \text{ mg cl. g cel}^{-1}$ para $8,0 \pm 1,8 \text{ mg cl. g cel}^{-1}$ nos cultivos com KNO_3 e $14,2 \pm 0,8 \text{ mg cl. g cel}^{-1}$, para $7,2 \pm 1,4 \text{ mg cl. g cel}^{-1}$ para os cultivos com uréia, respectivamente (DANESI *et al.*, 2004). Pode-se observar que a concentração de clorofila nos cultivos a 5 klux ($60 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram próximas as concentrações obtidas no presente trabalho, nos cultivos a $60 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\text{NaNO}_3 = 5,21 \pm 0,3 \text{ mg cl. g cel}^{-1}$; Uréia = $4,15 \pm 0,2 \text{ mg cl. g cel}^{-1}$; Tabela 34). Essa diferença pode ser devido ao aumento do efeito sombreamento ser maior em minitanques quando comparada aos fotobiorreatores tubulares, o que favorece a um aumento da concentração de clorofila nos cultivos em minitanques. Soundarapandian e Vasanthi (2008) observaram um maior teor de clorofila em diferentes cepas de *S. platensis* cultivadas a 3 klux ($36 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) intensidade luminosa com ciclos alternados de 16 horas no claro e 8 horas no escuro.

Dados na literatura mostram que na biomassa de *A. platensis* possuem 1% de clorofila (VONSHAK, 1997; COGNO *et al.*, 2003). No entanto, no presente trabalho a maior concentração de clorofila foi de 0,5%, correspondendo ao experimento 1 ($60 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, NaNO_3 ; Tabela 13). Esse baixo valor de concentração de clorofila em relação aos valores citados na literatura é devido às altas intensidades luminosas utilizadas no neste trabalho. Soundarapandian e Vasanthi (2008)

relataram que a concentração de clorofila nas *S. platensis* cultivadas a 3 klux pode variar de 0,85% (8,526 $\mu\text{g. mg cel}^{-1}$) a 0,97% (9,723 $\mu\text{g. mg cel}^{-1}$) dependendo da cepa utilizada. Jimenez *et al.* (2003) em cultivos de *S. platensis* em minitanques utilizando a energia solar no sul da Espanha obtiveram uma concentração de clorofila de 7,9 g kg^{-1} (0,79%).

Carlozzi e Pinzani (2005) observaram uma concentração máxima de clorofila de 2%, em cultivos *outdoor* de *S. platensis* em fotobiorreator espiralado fechado. Esta concentração permaneceu constante do 6º ao 10º dia de cultivo. Tomaselli *et al.* (1997) também observaram um aumento na concentração de clorofila de 15,1 $\mu\text{g. mg cel}^{-1}$ para 26,3 $\mu\text{g. mg cel}^{-1}$ nos cultivos de *A. máxima* em reator de vidro retangular, a intensidade luminosa de 144 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 25 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Tredici e Zittelli (1998), em cultivos contínuos “outdoors” de *A. platensis* em fotobiorreator tubular e plano, obtiveram a concentração de clorofila de $1,55 \pm 0,02\%$ e $1,63 \pm 0,02\%$ na massa seca no início do período luminoso.

De fato, a concentração de clorofila depende das condições ambientais, principalmente da intensidade luminosa. No presente estudo, nos cultivos submetidos à alta intensidade luminosa favoreceram a uma redução na concentração de clorofila, principalmente nos cultivos a 240 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Do mesmo modo Nakajima e Ueda (1997) observaram um aumento no crescimento celular de *Chlorella pyrenoidosa* e uma redução no conteúdo de pigmentos captadores de luz nas células cultivadas a altas intensidades luminosas (50 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Na presença de excesso de luz, o oxigênio produzido durante a fotossíntese reage com a clorofila excitada originando um oxigênio singlete que é muito mais reativo podendo oxidar as clorofilas e ocasionando consequentemente o fenômeno denominado de branqueamento (MARIQUE, 2003). As clorofilas tendem a ser foto-oxidadas a alta irradiação e, devido aos carotenóides poderem prevenir a foto-oxidação das clorofilas, a relação entre as clorofilas e carotenóides pode ser usada como um indicador potencial de perdas foto-oxidativas causadas por fortes irradiações (HENDRY & PRICE, 1993).

6.5 Avaliação da composição centesimal

Micro-organismos fotossintetizantes usam fonte de carbono inorgânico, energia luminosa e nitrogênio para sintetizar compostos orgânicos, como proteínas, carboidratos, vitaminas, lipídios, pigmentos entre outros. Com isso, a composição centesimal da biomassa pode variar com as condições ambientais (RAFIQUL *et al.*, 2005; MOHANTY *et al.* 1997).

Na Tabela 36 estão apresentados os teores de proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas das biomassas secas obtidas no final dos experimentos.

Tabela 36 - Porcentagem de proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas na biomassa seca final

Experimento	Intensidade luminosa (I)*	Fonte de CO ₂	Fonte de nitrogênio	Proteínas totais (%)	Lipídios totais (%)	Cinzas (%)	Carboidratos totais (%)
1	60	Cilindro	NaNO ₃	31,9±0,1	8,63±0,3	4,42±0,01	52,26±3,58
2	60	Cilindro	Uréia	23,3±0,7	6,60±0,9	4,42±0,04	64,71±0,64
3	60	Alcoólica	NaNO ₃	32,4±0,7	10,1±0,8	5,83±0,02	52,22±3,41
4	60	Alcoólica	Uréia	42,7±2,3	11,2±1,4	5,08±0,91	64,92±3,36
5	120	Cilindro	NaNO ₃	28,1±0,4	12,1±0,6	4,76±0,02	55,00±0,16
6	120	Cilindro	Uréia	29,9±0,6	7,30±0,7	4,82±0,18	57,94±0,05
7	120	Alcoólica	NaNO ₃	31,5±1,8	8,62±0,6	4,97±0,18	55,76±3,41
8	120	Alcoólica	Uréia	40,4±0,7	9,53±0,7	3,94±0,63	46,42±0,91
9	240	Cilindro	NaNO ₃	21,3±0,1	14,2±2,3	4,28±0,04	60,04±2,43
10	240	Cilindro	Uréia	31,9±0,9	12,9±0,5	5,40±0,50	50,79±1,47
11	240	Alcoólica	NaNO ₃	27,8±0,4	14,4±2,9	5,79±0,48	52,22±3,41
12	240	Alcoólica	Uréia	21,0±0,3	11,7±2,8	4,49±0,04	64,92±3,36

I = Intensidade luminosa ($\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

A Fotossíntese é o processo pelo qual a energia luminosa é convertida em energia química pelas plantas, bactérias fotossintéticas e cianobactérias. A energia luminosa é capturada pelos pigmentos fotossintéticos como clorofila, carotenóides e ficocianina na qual são complexados com proteínas que são partes do fotossistema I e II em cianobactérias. O sistema fotossintético é fortemente conectado com outras

vias metabólicas, como biossíntese de proteínas e lipídios, nas quais são necessárias para o crescimento celular (MOHANTY *et al.* 1997).

Os teores de proteína variaram de 21% a 42%. Esses valores estão próximos aos valores encontrados por Cañizares-Villanueva *et al.* (1994) cultivando *S. maxima* em meio de cultura constituído por resíduo da criação de porcos (diluído a 50% em água). Embora o teor de proteína seja baixo (36%), a biomassa ainda é apropriada para o uso como suplemento aliementar para animais. Jiménez *et al.* (2003) também encontraram um baixo teor de proteína de 47% do peso seco, em média, na produção industrial da *Spirulina*, em Malaga no sul da Espanha.

A biossíntese de proteína depende principalmente da disponibilidade de nitrogênio, de carbono, para formação do esqueleto carbônico, e da intensidade luminosa, na qual fornece energia para fixação do CO₂. Nos cultivos utilizando nitrato, bem como nos cultivos utilizando uréia não houve limitação do crescimento pela fonte de nitrogênio (Item 6.1.1). A fonte de carbono também não foi limitada, uma vez que o pH foi mantido durante todo o tempo de cultivo com a adição de CO₂. As intensidades luminosas foram altas, pertencendo à região de saturação luminosa (Item 6.1.1). Logo, mesmo dispondo de nitrogênio, carbono e energia, as células não converteram o nitrogênio disponível em proteínas. SAKAMOTO e BRYAN, (1999) observaram que um aumento da intensidade luminosa de 250 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para 1 mmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no cultivo de *Synechococcus* sp. PCC 6301 não foi observado um aumento na absorção de nitrato, mostrando que a taxa do consumo de nitrato foi saturado a intensidade luminosa de 250 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Soundarapandian e Vasanthi (2008) observaram que o conteúdo de proteína nas *S. platensis* cultivadas a 3 klux (36 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com ciclos alternados de 16 horas no claro e 8 horas no escuro pode variar de 59,37% (593,7 μg . mg^{-1} cel) a 64,21% (642,1 μg . mg^{-1} cel) dependendo da cepa utilizada. Torzillo *et al.* (1991) observaram um aumento na síntese de carboidrato nas células de *S. platensis* cultivadas “outdoors” a altas intensidades luminosas e temperatura de 25°C. O excesso do carboidrato sintetizado foi parcialmente utilizado a noite para a síntese de proteína. Isso pode ter contribuído a um baixo teor de proteína no presente trabalho, uma vez que, os cultivos foram submetidos sempre a altas intensidades luminosas, não obtendo ciclos claro/escuro durante o cultivo.

A análise de variância (Tabela 37) indicou que a fonte de nitrogênio e de CO₂ não influenciaram na variável dependente teor de proteína, enquanto que a

intensidade luminosa influenciou como pode-se observar na análise de diferença entre as médias para essa variável (Tabela 38).

Tabela 37 - Análise de variância para o teor de proteína na biomassa final

efeitos	Soma dos quadrados	Número de grau de liberdade	Media dos quadrados	Teste F	Nível de significância
Fonte de CO ₂	53,04	1	53,04	2,35	0,142
Fonte de Nitrogênio	11,34	1	11,34	0,50	0,487
Intensidade luminosa	434,1	2	217,0	9,63	0,001
Resíduos total	428,33 926,8	19 23	22,54		

Tabela 38 - Médias do teor de proteína na biomassa final para a variável independente intensidade luminosa

Intensidade luminosa ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Proteína (%)*
60	35,8 $\pm$ 4,3 ^a
120	32,6 $\pm$ 5,0 ^a
240	25,6 $\pm$ 5,1 ^b

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95% (Teste de Tukey).

O modelo da biossíntese e metabolismo de lipídios em cianobactérias e/ou algas são afetados pelos fatores ambientais, dentre esses as condições de iluminação (BABADZHANOV *et al.*, 2004; KHOTIMCHENKO e YAKOVLEVA, 2005). As células de *Tichocarpus crinitus* são capazes de mudar o conteúdo de armazenamento e estrutural de lipídios e a composição de ácidos graxos. Altas intensidades luminosas estimulam o acúmulo de lipídios de armazenamento (triacilgliceróis), enquanto a baixas intensidades luminosas induzem a um aumento nos lipídios estruturais (glicolipídios). Isto indica um alto grau de controle de estrutura nas membranas das algas, porque o grau de insaturação dos ácidos graxos tem sido considerado um dos fatores mais importantes no controle da fluidez e funcionalidade da membrana celular. Adicionalmente, as diferenças na

composição dos lipídios nas *T. crinitus* cultivadas a altas e baixas irradiações solar podem ser consideradas como uma resposta adaptativa das células algais para as várias condições de crescimento. Portanto, a sobrevivência das células nas mudanças ambientais pode ser atribuída à funcionalidade das membranas, onde o aparato fotossintético é formado (KHOTIMCHENKO e YAKOVLEVA, 2005).

Nos cultivos com disponibilidade de nitrogênio, carbono e altas intensidades luminosas as células utilizam a energia e o carbono disponível para crescimento, manutenção celular e formação de componentes orgânicos, tais como proteínas, lipídios e carboidratos. Como apresentados na Tabela 41, o teor de lipídio aumenta com a intensidade luminosa. Esse efeito foi observado por Solovchenko *et al.*, (2008) nos cultivos da microalga *Parietochloris incisa*. Isto pode ser consequência da produção excessiva de ácidos graxos, entre eles triacilgliceróis, provavelmente como um modo de converter o excesso de luz em energia química para evitar o dano fotooxidativo (ASADA, 1994; RABBANI *et al.* 1998; MENDOZA *et al.* 1999; NIYOGI, 1999). Kaixian *et al.* (1993) observaram um aumento no teor de lipídios com o aumento da intensidade luminosa nas células de *Phaeodactylum tricornutum*. Solovchenko *et al* (2008) relataram que os triacilgliceróis acumuladas em algas (*Parietochloris incisa*) sob condições de stress são frequentemente depositadas em glóbulos de lipídios citoplasmático referidos como corpos oleosos na qual aumentam em tamanho e número sob deficiência na nutrição mineral, especialmente na falta de nitrogênio e altas irradiâncias.

Como observado na Tabela 41, os cultivos a $240 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ obtiveram maiores teores de lipídios. Steiner *et al* (1970) observaram que as células de *Chromatium* cultivadas a baixas intensidades luminosas ($100 \text{ ft/c} = 0.1 \text{ klux} = 1.2 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) obteve menor teor de fosfolipídios em relação aos cultivos a altas intensidades luminosas ($7,500 \text{ ft/c} = 8 \text{ kux} = 96 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). $1 \text{ lux} = 0.929 \text{ foot-candles}$.

Na Tabela 39 estão apresentados os valores da análise de variância dos teores de lipídios. Como se pode observar, apenas a intensidade luminosa influenciou nos valores de lipídios, apresentando um valor de nível descritivo menor que 5%. Embora o nível de significância da variável independente fonte de nitrogênio seja menor que 5%, a análise estatística diferença entre as médias mostraram essa variável não interfere no teor de lipídio, apresenta um valor de nível descritivo maior que 5% (Tabela 40).

Tabela 39 - Análise de variância para o teor de lipídios na biomassa seca final

efeitos	Soma dos quadrados	Número de grau de liberdade	Media dos quadrados	Teste F	Nível de significância
Fonte de CO ₂	1,43	1	1,43	0,59	0,453
Fonte de Nitrogênio	18,53	1	18,53	7,62	0,012
Intensidade luminosa	141	2	71	29	0,000
Resíduos	46	19	2,44		
total	207	23			

Tabela 40 - Médias do teor de lipídio na biomassa final para a variável independente fonte de nitrogênio

Fonte de nitrogênio	Lipídios (%)*
Nitrato	10,9 ± 3,10 ^a
Uréia	9,18 ± 2,75 ^a

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95% (Teste de Tukey).

Tabela 41 - Médias do teor de lipídio na biomassa final para a variável independente intensidade luminosa

Intensidade luminosa ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Lipídios (%)*
60	7,63 ± 1,1 ^a
120	9,72 ± 1,9 ^a
240	13,6 ± 2,1 ^b

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95% (Teste de Tukey).

A similaridade entre as fontes de nitrogênio (Tabela 40) podem ser explicadas pelo fato de que nos cultivos com uréia, a quantidade de uréia adicionada foi calculada com base nos seus respectivos cultivos com nitrato, nas quais foram

cultivos não limitados por nitrogênio (concentração de nitrogênio superior a 1 g L^{-1}). Logo, isso favoreceu a semelhança entre os teores de lipídios nos cultivos a diferentes fontes de nitrogênio.

Os valores de lipídios encontrados variaram de $6,6 \pm 0,9\%$ a $14,4 \pm 2,9\%$ dependendo das condições de cultivo. Esses valores estão de acordo com Cogno *et al* (2003) e Vonshak (1997), na qual relataram que o conteúdo de lipídios da *A. platensis* em condições fotoautotróficas podem variar de 8 – 12% quando cultivadas em meio sintético. Tokusoglu e Ünal (2003) encontraram um teor de lipídio médio entre três diferentes cepas de *S. platensis* de 7,53% não diferindo estatisticamente entre si.

O teor de lipídio foi de $8,63 \pm 0,3\%$ com NaNO_3 e $6,6 \pm 0,9\%$ com uréia na intensidade luminosa de $60 \text{ } \mu\text{moles de f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, utilizando CO_2 de cilindro. Esses valores foram próximos aos teores de lipídios encontrados por Rafiqul *et al* (2005) cultivando *S. platensis* (7,4%) e para *S. fusiformis* (8.2%), a 2,5 klux ($30 \text{ } \mu\text{mol de f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Oliveira *et al* (1999) observaram um teor de lipídios de $6,96 \pm 0,86\%$ nas células de *S. platensis* cultivadas em 4 l Virtis fermenter, a $180 \text{ } \mu\text{mol de f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Olguín *et al* (2001) observaram uma menor concentração de lipídios nos cultivos a maior intensidade luminosa em cultivos de *S. platensis* cultivada tanto em meio sintético (meio Zarrouk) como em meio complexo (água do mar do Golf do México suplementado com 2% de efluente anaeróbico da criação de porcos). A concentração de nitrogênio no meio complexo possui 10 vezes a menos que o meio sintético ($2,5 \text{ g. L}^{-1} \text{ NaNO}_3$). O teor de lipídio de 8% encontrado no meio de cultivo com $2,5 \text{ g. L}^{-1} \text{ NaNO}_3$, a $66 \text{ } \mu\text{moles de f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi próximo ao encontrado no presente trabalho $6,6 \pm 0,9\%$ no cultivo não limitado por NaNO_3 e $60 \text{ } \mu\text{moles de f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Nos cultivos a $60 \text{ } \mu\text{mol de f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mostrou maiores valores de lipídios quando cultivadas com CO_2 proveniente de fermentação alcoólica em relação aos cultivos utilizando CO_2 de cilindro. Sob condições autotróficas, a produtividade de lipídios foram menores quando comparadas com o crescimento heterotrófico em culturas de *Chlorella vulgaris* (LIANG *et al*, 2009) e crescimento heterotrófico e mixotrófico nas células de *Chlamydomonas reinhardtii* (BOYLE; MORGAN, 2009).

O teor de carboidrato nas células *A. platensis* não diferiram estatisticamente pela análise de variância nas diferentes condições estudadas (Tabela 44), obtendo

um nível de significância de 0,118, 0,974 e 0,562 para as variáveis independentes fontes de CO₂, fonte de nitrogênio e intensidades luminosas, respectivamente. O teor de carboidrato encontrado variou de 38 a 51%, valores considerados altos. No entanto, esses valores foram próximos aos valores obtidos por Cañizares-Villanueva *et al.* (1994) que observaram um teor de carboidrato de 42% e 44% em células de *S. maxima* cultivadas em meio sintético (Zarrouk) e meio constituído por resíduo da criação de porcos (diluído a 50%), respectivamente, sob intensidade luminosa de 3 klux (36 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). O teor de carboidrato neste trabalho foi um pouco maior que o observado por Cañizares-Villanueva *et al.* (1994), provavelmente devido a diferença de intensidade luminosa, pois maiores teores de carboidratos são obtidos nos cultivos sob maior intensidade luminosa.

Olguín *et al.*, (2001) obtiveram um alto teor de polissacarídeos de 28,41% nas células de *S. platensis* cultivadas em meio complexo quando exposta a intensidade luminosa de 144 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Esse alto valor poderia ter sido devido a dois fatores simultâneos: deficiência de nitrogênio e alta intensidade luminosa. Desse modo, no presente trabalho não houve deficiência de nitrogênio nos cultivos, no entanto, a área iluminada no fotobioreator tubular usado no presente trabalho é maior quando comparada com os cultivos em *bench raceway* utilizados por Olguín *et al.* (2001) e esse aumento pode ter favorecido a obtenção dos altos teores de carboidratos.

Tomaselli *et al.* (1997) observaram uma redução no teor de carboidrato nas células de *A. máxima* de 282 mg.g^{-1} (28%) para 180 mg.g^{-1} (18%), quando a intensidade luminosa reduziu de 144 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para 25 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A capacidade dos microorganismos fototróficos em estocar na forma de carboidratos o excesso do carbono fixado durante a aclimação a altas intensidades luminosas e mobilizar esse esqueleto carbônico para a síntese de proteína, representa um requisito importante para a sobrevivência.

Tabela 42 - Análise de variância para o teor de carboidratos na biomassa seca final

efeitos	Soma dos quadrados	Número de grau de liberdade	Media dos quadrados	Teste F	Nível de significância
Fonte de CO ₂	107	1	107	2,68	0,118
Fonte de Nitrogênio	0,04	1	0,04	0,00	0,974
Intensidade luminosa	48	2	24	0,59	0,562
Resíduos total	763 918	19 23	40		

A partir dos estudos relatados previamente na literatura mostram que o teor de carboidrato é 12 a 16% nas células de *Arthrospira platensis* cultivadas em meio sintético e em condições fotoautotróficas sem condições de stress, como alta salinidade, alta intensidade luminosa, deficiência em nitrogênio (COGNO *et al.*, 2003; VONSHAK, 1997). Carlozzi e Pinzani (2005) relataram que as células de *Arthrospira platensis* foram estimuladas para sintetizar carboidratos durante o dia e estes foram consumidos para permitir a síntese de proteínas durante a noite. De acordo com Ma *et al.* (1997), uma menor taxa na síntese de proteína é observado a altas irradiações, comparando com a síntese de carboidrato. Isto pode conduzir a um acúmulo de carboidrato nas células sem um concomitante aumento na síntese de proteína. Tem sido sugerido que o carbono a partir dos polímeros de carboidratos estocados pode ser transferido para formação de proteínas durante a noite (Ma *et al.*, 1997). No entanto, como no presente trabalho não houve fotoperíodo de fase claro/escuro, propiciou a um acúmulo de carboidrato nas células e a reduziu a concentração de proteínas. Adicionalmente, Torzillo *et al.* (1991) relataram que as células de *Spirulina* expostas a altas irradiâncias direcionam a biomassa a sintetizar carboidratos, na qual pode ser usado como um reservatório do poder redutor, e a uma redução na síntese de proteínas.

Como podemos observar na análise de variância (Tabela 43), o teor de cinzas não foi influenciado pelas variáveis estudadas atingindo valores que variaram de $4,28 \pm 0,04\%$ a $5,83 \pm 0,02\%$. Esses valores estão de acordo com os valores obtidos por Miao (2005) que obtiveram um teor de cinzas de $6,36 \pm 0,05\%$ em cultivos autotróficos e $5,93 \pm 0,04\%$ em cultivos heterotróficos de *Chlorella protothecoides*. Similarmente, Tokusoglu e Ünal (2003) observaram um conteúdo de cinzas em três

diferentes cepas de *Spirulina* denominada de 1, 2 e 3 foram de 7,43%, 7,51% and 10,38% respectivamente. A microalga marinha *Isochrysis* obteve o maior conteúdo de cinzas (16,08%).

Tabela 43 - Análise de variância para o teor de cinzas na biomassa seca final

efeitos	Soma dos quadrados	Número de grau de liberdade	Media dos quadrados	Teste F	Nível de significância
Fonte de CO ₂	0,68	1	0,69	1,8	0,192
Fonte de Nitrogênio	0,58	1	0,58	1,52	0,232
Intensidade luminosa	1,12	2	0,56	1,47	0,255
Resíduos total	7,23	19	0,38		
	9,62	23			

Jiménez *et al.* (2003) encontraram um alto teor de cinzas no cultivo de *S. platensis*, aproximadamente 20% (valores típicos são de 5–7%), esse alto valor pode ser explicado pelo fato de que a alga obtida a partir do filtro foi introduzida diretamente *spray drier* sem passar pelo processo de lavagem. Como o meio de crescimento é altamente enriquecido com bicarbonato, a lavagem é necessária para eliminá-los. Esse processo normalmente reduz o conteúdo de cinzas.

No presente trabalho, a composição do meio de cultura foi mantido em todas as condições experimentais, com modificação apenas da fonte de nitrogênio, de nitrato de sódio para uréia em alguns experimentos. Adicionalmente, a biomassa passou por um processo de lavagem antes da etapa de secagem, que removeu os sais adsorvidos nas células. Portanto, isso favoreceu a manutenção no teor de cinzas na biomassa seca. Canizares *et al* (2004) obtiveram elevados teores de cinzas (14%) na biomassa de *Spirulina máxima* utilizando 50% de efluente suíno no meio de cultura. Isso foi atribuído ao elevado quantidade de partículas minerais presente no meio.

6.6. Avaliação dos parâmetros bioenergéticos

Foram avaliados os parâmetros bioenergéticos da *A. platensis* durante os cultivos, avaliando os andamentos em função do tempo dos parâmetros: energia de Gibbs dissipada para o crescimento e manutenção celular ($1/Y_{GX}$), das produções molares de O_2 , consumo de H^+ e número de fótons para sustentar o crescimento fotoautotrófico. Foi avaliada a eficiência da fotossíntese em *A. platensis* calculando-se a energia molar de Gibbs absorvida da luz para produzir um C-mol de biomassa, a partir do correspondente número de Einsteins absorvidos e da energia média molar dos fótons.

A energia de Gibbs dissipada por unidade da biomassa ($1/Y_{GX}$; kJ por C-mol X) foi calculada pela Equação 6 como descrita no item 4.5. A equação mostra que na dissipação da energia de Gibbs estão inclusos tanto a manutenção como o crescimento celular. A energia de Gibbs é utilizada também para a manutenção das funções celulares como reposição dos gradientes que faltam, degradação proteínas. Esta energia de Gibbs é produzida pelo catabolismo de certas quantidades de doadores de elétrons (substratos).

No Gráfico 26 ilustra o comportamento da dissipação da energia de Gibbs para o crescimento e manutenção celular, $1/Y_{GX}$, em relação ao tempo. Como regra geral, esse parâmetro bioenergético aumentou com o tempo em todas as condições testadas, como resultado do crescente nível de biomassa, que foi responsável por diminuir a velocidade específica de crescimento. Um aumento na intensidade luminosa até $120 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ favoreceu o crescimento de células por causa de fotolimitação, com isso as exigências de energia aumentaram notavelmente no período de tempo mais curto. Por outro lado, nenhum (uréia) ou muito pouco (nitrato) aumento de $1/Y_{GX}$ foram observados na faixa da intensidade luminosa de $120\text{-}240 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, por causa da obtenção das condições de saturação de luz. Esse comportamento também é consistente com os menores valores de $1/Y_{GX}$ previamente observados em tanques abertos (TORRE *et al.*, 2003), o que permitiu um menor crescimento devido ao efeito de sombreamento (DANESI *et al.*, 2004).

Gráfico 26. Energia de Gibbs de dissipação durante o cultivo de *A. platensis*, intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$): (□, ■) 60, (△, ▲) 120, (◇, ◆) 240; Fonte de nitrogênio: nitrato (símbolo aberto), uréia (símbolo fechado).

Com os dados da composição elementar da biomassa seca obtida no final de cada experimento, foram calculados os coeficientes atômicos para os elementos C, N, H, O, S, principais elementos que constituem a composição elementar da biomassa. Determinado o coeficiente atômico dos elementos C, H, O, N, S (descrito no item 4.6.5.3), e conhecendo-se os graus de redução desses elementos ($\text{C} = 4$; $\text{H} = 1$; $\text{O} = -2$; $\text{S} = 6$; $\text{N-NH}_4^+ = -3$ ou $\text{N-NO}_3^- = 5$) de acordo com os íons nas quais são inseridos na biomassa (HCO_3^- , H_2O , H^+ , O_2 , NH_4^+ e SO_4^{2-}), foi possível calcular o grau de redução da biomassa (descrito no item 4.6.5.4; Tabela 44) bem como os coeficientes estequiométricos para balanços de carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre, carga iônica e poder de redução para a produção fotoautotrófica de 1 mol de carbono (C-mol) de biomassa seca, usando NaNO_3 e uréia como fonte de nitrogênio, de acordo com Heijnen (2001), em cada condição estudada de acordo com a aplicação do princípio de conservação.

O crescimento autotrófico pode ser representado por uma equação de balanço de massa global, onde as fontes de nitrogênio (NO_3^- ou NH_4^+) e carbono (HCO_3^-), H_2O e H^+ estão envolvidas para a formação de 1 C-mol de biomassa:

Para esse propósito, foi usada a composição elementar descrita por Cornet *et al.* (1992) (Equação 11), ou a composição elementar determinada experimentalmente como descrita no item Materiais e métodos.

Os coeficientes estequiométricos foram estimados através dos balanços de materiais de carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre, carga e grau de redução da biomassa usados para a formação da biomassa. Os principais íons envolvidos na formação da biomassa e seus respectivos coeficientes estequiométricos estão descritos na Tabela 44.

Como pode ser observado, o grau de redução da biomassa (γ_X), calculado no modelo da composição da biomassa determinado experimentalmente neste trabalho, foi sempre um pouco maior com o nitrato (4,89 – 5,19) do que com uréia (3,99 – 4,32), como esperado pelo maior número de oxidação do nitrato (HEIJNEN, 2001).

Tabela 44 - Coeficientes estequiométricos estimados através dos balanços de materiais de carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre, carga e grau de redução da biomassa cultivada em fotobiorreator tubular horizontal, utilizando nitrato ou uréia como fontes de nitrogênio.

		HCO_3^-	NO_3^-	NH_4^+	H_2O	O_2	H^+	SO_4^{-2}	Biomassa
Δg_{f_i} (kJ mol ⁻¹)		-587,2	-111,4	-79,4	-237,3	0	-39,9	-744,6	-67,0
Coeficiente estequiométrico (mol C-mol _{DM} ⁻¹)									
testes	I ^a	a	b	b	C	d	e	f	γ_X^b
1 ^c	60	-1	-0,20	-	0,20	1,45	-1,20	-	5,8
1 ^d	60	-1	-0,11	-	0,32	1,30	-1,11	0,00	5,19
2 ^d	60	-1	-	-0,07	0,24	1,00	-0,93	0,00	3,99
3 ^d	120	-1	-0,11	-	0,23	1,22	-1,11	0,00	4,89
4 ^d	120	-1	-	-0,08	0,42	1,03	-0,92	0,00	4,11
5 ^d	240	-1	-0,10	-	0,23	1,27	-1,10	0,00	5,09
6 ^d	240	-1	-	-0,08	0,34	1,08	-0,92	0,00	4,32

^a Intensidade luminosa (μmol m⁻² s⁻¹)

^b Grau de redução da biomassa.

^c Composição elementar da biomassa descrita por Cornet *et al.*, (1992)

^d Composição elementar da biomassa determinada experimentalmente.

Estimando os coeficientes estequiométricos da reação 11 e conhecendo a energia de Gibbs de formação de produtos e reagentes (Tabela 44) (HEIJNEN, 2001), é possível calcular o número de moles de fótons (Einsteins) para sustentar o crescimento autotrófico de 1 C-mol de biomassa (n_{ph}) pela Equação 8 (item 4.5).

Embora os valores reais de Δg_{fi} deveriam ter sido utilizados para este cálculo, foram utilizados os valores das condições biológicas padrão. Torre *et al.* (2003) demonstraram que as diferenças entre a energia de Gibbs de formação nas condições reais de cultivo não diferem entre si ou diferem não mais que 3% apartir de seus respectivos valores estimados com base nas condições biológicas padrão ($T = 298,4K$; $C = 1,0M$, $pH = 7,0$). Por isso foram utilizados os valores de energia de Gibbs nas condições biológicas padrão.

No entanto, para o íon H^+ , a energia de Gibbs de formação (Δg_{fH^+}) é, por definição, uma função da cultura do pH. Assim, esse parâmetro foi recalculado para as condições reais da equação de Gibbs:

$$\Delta g_{f_{H^+}} = \Delta g_{f_{H^+}} + RT \ln \left[\frac{10^{-pH}}{10^{-7}} \right] \quad (\text{Equação 12})$$

Durante as reações luminosas da fotossíntese, a energia livre carregada pelos fótons é capturada por pigmentos (por exemplo, a clorofila), organizadas em grandes complexos de proteínas chamado de "centros de reação". A energia de um fóton provoca excitação eletrônica, elevando um elétron para um nível maior de energia exatamente igual à energia do fóton ($h\nu$). São exigidos um mínimo de 8 fótons para transferir 4 elétrons de 2 moléculas de H_2O para reduzir a 2 moléculas de $NADPH_2$, de acordo com a equação:

Subsequentemente, os elétrons são transferidos do NADPH para o CO_2 através do ciclo de Calvin para produzir os constituintes da biomassa (RAVEN *et al.*, 2000).

Como mostrado na Gráfico 27, a diminuição progressiva da velocidade específica de crescimento (μ) ao longo do cultivo provocou um aumento (em valor absoluto) no número de Einsteins absorvido para produzir 1 C-mol de biomassa

(n_{Ph}). Nos maiores valores de μ , quase atingiu o valor teórico de n_{Ph} relatado por Richmond (1983) para sustentar o crescimento sob condições ideais, que é de 8 Einsteins por C-mol de biomassa.

Como já foi observado em trabalho anterior (TORRE *et al.*, 2003), a exigência de energia adicional em relação à situação ideal de 8 Einsteins C-mol DM⁻¹ foi insignificante no início dos cultivos (alta velocidade específica de crescimento) e, em seguida, aumentou consideravelmente durante a fase estacionária de cada experimento, sugerindo que, em condições provavelmente limitada pelo sombreamento, a biomassa usa a energia, preferencialmente, para a manutenção do que para o crescimento. Em condições de limitação de luz (no início), ou de sombreamento (na fase estacionária), um aumento progressivo da intensidade de luz não excedeu qualquer influência significativa sobre este parâmetro.

Gráfico 27. Influência da velocidade específica de crescimento da *A. platensis* sobre o número de moles de fótons absorvido para produzir 1 C-mol de biomassa em diferentes condições de cultivo: (○) Composição elementar da biomassa descrita por Cornet *et al.* (1992), PPFD = 60 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Composição elementar da biomassa determinada experimentalmente, PPFD ($\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$): (□, ■) 60, (△, ▲) 120, (◇, ◆) 240. Fonte de nitrogênio: nitrato (símbolos abertos), uréia (símbolos fechados).

Como mostrado no Gráfico 27, as culturas com nitrato necessitam de maiores valores de n_{Ph} para sustentar o crescimento autotrófico em relação às culturas utilizando uréia. Como as concentrações celulares dos cultivos utilizando nitrato ou uréia foram semelhante em todas as intensidades luminosas (Item 6.1), a exigência adicional fóton nos cultivos com nitrato foi provavelmente utilizado para reduzir o nitrato a amônio (HATORI; MYERS, 1966), que é a forma preferencial de nitrogênio assimilado pela *A. platensis* (BOUSSIBA *et al.*, 1984). Este efeito também foi observada por Torre *et al.* (2003) em tanques abertos.

Finalmente, pode ser observado na mesma figura que o uso do modelo bioenergético acima com os coeficientes relatados por Cornet *et al.* (1992) para a composição da biomassa de *A. platensis* (CHNOS) levou a resultados praticamente coincidentes com aqueles obtidos utilizando as experimentais determinadas neste trabalho. Essa constatação demonstra que a composição da biomassa tem um impacto pouco significativo sobre os resultados de tal modelo bioenergético, logo poderia simplesmente ser usado como um instrumento geral assumindo os dados da literatura, sem a necessidade de qualquer determinação da biomassa.

No Gráfico 28 mostra os comportamentos da produção molar de O_2 e do consumo de H^+ durante os cultivos nas diferentes intensidades luminosas. Essas tendências demonstram que as diferentes atividades de consumo e produção seguem fielmente o crescimento celular. O aumento progressivo desses parâmetros com a intensidade luminosa confirma que esta foi o fator limitante ao crescimento, nunca atingindo as condições de inibição da luz. Como esperado, este comportamento foi qualitativamente semelhante nas culturas utilizando nitrato como fonte de nitrogênio.

Gráfico 28. Produção molar de O₂ (símbolo fechado) e consumo de H⁺ (símbolo aberto) em função do tempo em diferentes condições de cultivo: Intensidades luminosas ($\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$): ($\square, \blacksquare$) 60, ($\triangle, \blacktriangle$) 120, ($\diamond, \blacklozenge$) 240. Fonte de nitrogênio: nitrato (linha rachurada), uréia (linha contínua).

Como é conhecido, a energia do fluxo de elétrons entre o FSII e NADPH direciona prótons através da membrana plasmática, criando uma força motriz de prótons que fornece energia para a síntese de ATP pela ATP sintase (LEHNINGER, 2004). Portanto, assumiu-se que uma parte da energia molar de Gibbs absorvida pelos dois fotossistemas foi usada para converter ADP em ATP. Como mostrado no Gráfico 29, os maiores valores de ΔG_a e ΔG_{ATP} foram obtidos no final do cultivo, devido a condições ambientais desfavoráveis, como a falta de nutrientes ou liberação de metabólitos celulares. No que se refere à intensidade luminosa, os maiores valores de ΔG_a e ΔG_{ATP} foram observados nas culturas a intensidades luminosas iguais e maiores que $120 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, que garantiu a maior concentração de células (Item 6.1). Os valores de ΔG_a e ΔG_{ATP} não aumentaram, no caso dos cultivos utilizando uréia, ou aumentou muito pouco, no caso dos cultivos utilizando nitrato, na faixa de intensidade luminosa de 120 - $240 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, devido às condições de saturação de luz, como mencionado anteriormente.

Gráfico 29. Energia total de Gibbs absorvida pelo aparato fotossintético (símbolo fechado) (ΔG_a) e energia transformada em ATP (símbolo aberto) (ΔG_{ATP}) durante o cultivo da *A. platensis*, intensidade luminosa (μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$): ($\square, \blacksquare$) 60, ($\blacktriangle, \triangle$) 120, ($\diamond, \blacklozenge$) 240. Fonte de nitrogênio: nitrato (linha tracejada), uréia (linha contínua).

No Gráfico 30 mostra os resultados da energia fixada pela fotossíntese (ΔH) e a liberada como calor (Q) a diferentes condições de intensidades luminosas e fontes de nitrogênio. Pode ser visto que, no final de cultivos, tanto ΔH como Q aumentaram com a intensidade luminosa. Como é bem conhecido, sob condições de excesso de luz, parte da energia absorvida é dissipada termicamente através de um mecanismo não fotoquímico (Non-Photochemical Quenching) (MOZZO *et al.*, 2008), e uma quantidade significativa de energia livre é perdida como calor durante as reações bioquímicas entre a absorção luz e a formação carboidratos (HAUSKA; ARNALD, 2000). Esse resultado foi atribuído a um mecanismo fisiológico para proteger o aparelho fotossintético contra fotodestruição (KARAPETYAN, 2008; HEBER *et al.*, 2006), cuja função é desempenhada pelos complexos antena do aparato fotossintético, que muda forma de captação de luz para uma forma de dissipação térmica eficiente (MOZZO *et al.*, 2008).

Gráfico 30. Energia fixada pelo aparato fotossintético (símbolo fechado) (ΔH) e energia liberada como calor (símbolo aberto) (Q) durante o cultivo de *A. platensis*, intensidade luminosa (μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$): ($\square, \blacksquare$) 60, ($\triangle, \blacktriangle$) 120, ($\diamond, \blacklozenge$) 240. Fonte de nitrogênio: nitrato (linha rachurada), uréia (linha contínua).

Como era esperado pelo fato de que tanto a síntese de ATP como a formação de NADPH são resultantes do mesmo complexo fotossintético, o comportamento do ΔH foi bastante semelhante ao observado para o ΔG_{ATP} .

No Gráfico 31 mostra a distribuição percentual da energia luminosa absorvida em função do tempo nos cultivos a $60 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ escolhidos como exemplo. Resultados qualitativamente semelhantes foram observados nos cultivos a maiores intensidades luminosas (dados não mostrados). Os cultivos com uréia apresentaram maiores valores de η_{ATP} e η_{F} e menores valores de η_{Q} quando comparado aos cultivos usando nitrato. Isso pode ser explicado pelo fato de um maior requerimento energético para a redução de nitrato de amônia. Além disso, em todos os experimentos, a fração de energia armazenada como ATP (η_{ATP}) e a fixada pelos sistemas (η_{F}) diminuíram ao longo do tempo, enquanto que o liberado em forma de calor (η_{Q}) aumentou.

Gráfico 31. Porcentagem na distribuição da energia luminosa absorvida durante o cultivo de *A. platensis* usando nitrato (símbolo fechado) e uréia (símbolo aberto) como fonte de nitrogênio. Energia fixada pelos fotossistemas ($\diamond, \blacklozenge$), energia transformada em ATP ($\square, \blacksquare$), energia liberada como calor ($\blacktriangle, \triangle$).

Os maiores valores η_{ATP} e η_F foram por volta de 12% e 23-27% nas culturas com nitrato e 15% e 31-34% em culturas com uréia, respectivamente. Nos cultivos a maiores intensidades luminosas (120 e 240 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), os valores de η_F diminuem mais acentuadamente que os cultivos a 60 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, devido à maior concentração de células (item 6.1), que reduziu a disponibilidade de luz para a célula (efeito de sombreamento). A disponibilidade de nutrientes é outro importante fator ambiental influenciando a composição do aparato fotossintético de cianobactérias. Murakami et al. (1997) têm mostrado que as respostas ao CO_2 , Na^+ e estresse pela luz em *Synechocystis sp.* provocam alterações no estado redox de componentes entre os sistemas de transporte de elétrons. Da mesma forma, a diminuição na disponibilidade de alguns nutrientes no final do cultivo de *A. platensis* pode ter contribuído para diminuir os valores de η_F . Como esperado, η_Q mostraram um comportamento oposto, aumentando progressivamente a partir dos valores mínimos (60-66% com nitrato e 49-54% com uréia) no início do cultivo e cerca de 90% no final. Isto significa que, no final do cultivo da maior parte da energia absorvida foi liberada como calor.

6.7 Comparação entre os fotobiorreatores de diferentes configurações

Após a escolha da melhor condição do cultivo de *A. platensis* em fotobiorreator tubular horizontal utilizando CO₂ de cilindro, foram realizados experimentos nas mesmas condições em fotobiorreator tubular espiralado para avaliar o comportamento celular em duas diferentes configurações de fotobiorreatores tubulares. Luo *et al.* (2003) tem mostrado que a configuração de cada reator é um dos principais fatores que controlam a produtividade do cultivo fotossintético. Por isso, foram comparadas as curvas de crescimento *A. platensis* duas diferentes configurações dos fotobiorreatores tubulares, uma horizontal (Figura 7) e outra espiralada (Figura 8).

Como observado no Gráfico 32, os crescimentos celulares da *A. platensis* nos diferentes fotobiorreatores foram semelhantes, obtendo valores de concentrações celulares diárias próximas. Isso pode ser explicado pela semelhança nas condições físicas entre os fotobiorreatores, tais como diâmetro interno do tubo, velocidade de escoamento do líquido, bem como as condições de cultivos como a intensidade luminosa, temperatura, meio de cultivo, que foram mantidas as mais semelhantes possíveis.

Gráfico 32. Concentração celular nas duas diferentes configurações dos fotobiorreatores tubulares: (◆) horizontal e (◇) espiralado.

7. Conclusões

Os parâmetros concentração celular máxima (X_m) e produtividade em células (P_x) foram influenciados pela variável independente intensidade luminosa (I), obtendo maiores valores quando submetidos a maiores intensidades luminosas. Por outro lado, a variável independente fonte de nitrogênio (N) não influenciou nesses parâmetros, mostrando a viabilidade na substituição do nitrato pela uréia nos cultivos de *Artrhospira platensis*.

A variável independente intensidade luminosa não influenciou no parâmetro fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$). No entanto, para variável independente fonte de nitrogênio, os cultivos utilizando uréia apresentaram maiores valores de $Y_{X/N}$ quando comparados aos cultivos com nitrato. As diferentes fontes de CO_2 não influenciaram nos parâmetros analisados X_m , P_x e $Y_{X/N}$. Logo, o CO_2 juntamente com os voláteis orgânicos liberados durante a fermentação alcoólica pode ser utilizado para o cultivo da *A. platensis* sem interferir no crescimento celular.

Na composição centesimal da biomassa, pode-se observar que intensidade luminosa influenciou nos teores de clorofila, proteínas e lipídios, obtendo maiores valores de clorofila e proteína nos cultivos a baixa intensidade luminosa, enquanto que, nessas condições foram obtidos menores teores de lipídios. A fonte de nitrogênio influenciou apenas no teor de clorofila, obtendo maiores valores utilizando nitrato como fonte de nitrogênio. A fonte de CO_2 não influenciou na composição da biomassa. Nenhuma das variáveis independentes estudadas influenciou nos teores de cinzas e carboidratos na biomassa final.

Os resultados também indicaram que todas as variáveis independentes tiveram uma certa influência nos parâmetros de bioenergética. A dissipação de energia de Gibbs aumento com o tempo em todas as condições analisadas, obtendo os maiores valores em tempos mais curtos nos cultivos a 120-240 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, independentemente da fonte de nitrogênio selecionado. O número de moles de fótons absorvidos pelas células para produzir um C-mol de biomassa foi maior nas culturas com nitrato, independentemente da intensidade luminosa. Os maiores valores de produção molar de O_2 e do consumo de H^+ foram obtidos com os valores mais elevados de intensidade luminosa, utilizando nitrato. As frações da energia direcionada para a síntese de ATP, fixada pela célula foram superiores em culturas com uréia quando comparadas com as culturas com nitrato, que se revelou uma fonte de nitrogênio capaz de sustentar o crescimento energeticamente da *A. platensis*.

As diferentes configurações dos fotobiorreatores tubulares não influenciaram nas concentrações celulares indicando que o formato do tubo que forma o fotobiorreator, seja horizontal ou espiralado, não interferem no crescimento da *A. platensis*.

Com isso, pode-se concluir que a intensidade luminosa é uma importante variável que influencia nos parâmetros concentração celular máxima, produtividade celular, fator de conversão de nitrogênio em células, bioenergéticos e na composição química da *A. platensis*, e que o emprego do CO₂ proveniente da fermentação alcoólica juntamente com a uréia como fonte de nitrogênio pode ser uma alternativa viável para o cultivo de *A. platensis* em escala industrial, proporcionando uma redução no custo de produção.

8 Referências bibliográficas

ABELIOVICH, A.; AZOV, D. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.31, p.801–806, 1976.

ACIÉN FERNANDEZ, F.G.; FERNANDEZ SEVILLA, J.M.; SANCHEZ PEREZ, J.A.; MOLINA GRIMA, E.; CHISTI, Y. Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. **Chemical Engineering Science**, v.56, p.2721-2732, 2001.

ADIR, N.; ZER, H.; SHOCHAT, S.; OHAD, I. Photoinhibition: a historical perspective **Photosynthesis Research**, v.76, p.343–370, 2003.

AKIMOTO, M.; OHARA, T.; OHTAGUCHI, K.; KOIDE, K. Carbon dioxide fixation and α -linolenic acid production by the hot-spring alga *Cyanidium caldarium*. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v.27, n.3, p.329-333, 1994.

ANDRADE, M.R.; COSTA, J.A.V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v.264, p.30–33, 2007.

ANDREOLI, C.; SOUZA, S.P. Cana-de-acúcar: a melhor alternativa para conversão da energia solar e fóssil em etanol. **Economia e Energia**, ano X, n.59, dez.2006/jan.2007. Disponível em: http://ecen.com/eee59/eee59p/cana_melhor_conversorl.htm. Acesso em: 03 Mar. 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1998.

AQUARONE, E. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Applied Microbiology**, v.8, p.263-268, 1960.

BABADZHANOV, A.S.; ABDUSAMATOVA, N.; YUSUPOVA, F.M.; FAIZULLAEVA, N.; MEZHLUMYAN, L.G.; MALIKOVA, M.K. Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. **Chemistry of Natural Compounds**, v.40, p.276-279, 2004.

BANERJEE, A.; SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, p.245-279, 2002.

BARBER, J. Photosystem II: an enzyme of global significance. **Biochemical Society Transactions**, v.34, p.619-631, 2006.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Processos de fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H.V. **Processos de produção de álcool: controle e monitoramento**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ/FERMENTEC/ESALQ/USP, 1996. 103p.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v.8, n.7, p.1155–1163, 2008.

BECKER, E.W. **Microalgae**: biotechnology and microbiology. Cambridge, New York: Cambridge University Press, 1995. 293p. (Cambridge studies in biotechnology, 10).

BELAY, A. The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v.5, n.2, p.26-49, 2002.

BELAY, A.; OTA, Y. Production of high quality Spirulina at earthrise farms. In: PHANG, S.M.; BOROWITZKA, M.A.; WHITON, B., eds. **Algal biotechnology in the Asia-Pacific region**. Kuala Lumpur: University of Malaysia, 1994. p.92-102.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. **Journal of Applied Phycology**, v.5, n.2, p.235-241, 1993.

BELKIN, S.; BOUSSIBA, S. High internal pH conveys ammonia resistance in Spirulina platensis. **Bioresource Technology**, v.38, n.2/3, p.167-169, 1991a.

BELKIN, S.; BOUSSIBA, S. Resistance of Spirulina platensis to ammonia at high pH values. **Plant and Cell Physiology**, v.3, p.952-958, 1991b.

BERMAN, T.; CHAVA, S. Algal growth on organic compounds as nitrogen sources. **Journal of Plankton Research**, v.21, n.8, 1423-1437, 1999.

BERRY, S.; BOLYCHEVTSEVA, Y.V.; ROGNER, M.; KARAPETYAN, N.V. Photosynthetic and respiratory electron transport in the alkaliphilic cyanobacterium Arthrospira (Spirulina) platensis. **Photosynthesis Research**, v.78, p.67-76, 2003.

BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Influence of the ammonium chloride feeding time and the light intensity on the cultivation of Spirulina (Arthrospira) platensis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.100, p.297-305, 2008.

BINAGHI, L.; DEL BORGHI, A.; LODI, A.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by Spirulina platensis. **Process Biochemistry**, v.38, p.1341-1346, 2003.

BOROWITZKA M.A. Microalgae as sources of fine chemicals. **Current Microbiology**, v.3, p.372-375, 1986.

BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.70, p.313-321, 1999.

BORZANI, W. Fermentação semicontínua. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coords. **Biotechnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p.219-222

BOUSSIBA, S. Ammonia uptake in the Alkalophilic Cyanobacterium Spirulina platensis. **Plant and Cell Physiology**, v.30, n.2, p.303-308, 1989.

BOUSSIBA, S. Ammonium assimilation and its biotechnological aspects in cyanobacteria. In: RAI, A.K., ed. **Cyanobacterial nitrogen metabolism and**

environmental biotechnology. New York: Springer-Verlag; Vanarasi: Narosa Publishing House, 1997. p.36-72.

BOUSSIBA, S.; RESCH, C.M.; GIBSON, J. Ammonia uptake and retention in some cyanobacteria. **Archives of Microbiology**, v.138, p.287-392, 1984.

BRODY, M.; BRODY, S.S. Induced changes in the photosynthetic efficiency of *Porphyridium cruentum*. II. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.96, p.354-359, 1962.

CACHOT, T.; MÜLLER, M.; PONS, M. Kinetics of volatile metabolites during alcoholic fermentation of cane molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.345-454, 1991.

CAMACHO RUBIO, F.; ACIÉN FERNANDEZ, F.G.; SÁNCHEZ PÉREZ, J.A.; GARCÍA CAMACHO, F.; MOLINA GRIMA, E. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v.62, p.71-86, 1999.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O.; DOMÍNGUEZ, A.R.; CRUZ M.S.; RÍOS-LEAL, E. Chemical composition of cyanobacteria grown in diluted, aerated swine wastewater. **Bioresource Technology**, v.51, p.111-116, 1995.

CARLOZZI, P. Hydrodynamic aspects and *Arthrospira* growth in two outdoor tubular undulating row photobioreactors of photoautotrophs. **Biotechnology and Bioengineering**, v.51, p.51-60, 1996.

CARLOZZI, P. Dilution of solar radiation through "Culture" lamination in photobioreactor rows facing South–North: a way to improve the efficiency of light utilization by Cyanobacteria (*Arthrospira platensis*). **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, n.3, p.305-315, 2003.

CARLOZZI, P. Hydrodynamic aspects and *Arthrospira* growth in two outdoor tubular undulating row photobioreactors **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, p.14-22, 2000.

CARLOZZI, P.; PINZANI, E. Growth characteristics of *arthrospira platensis* cultured inside a new close-coil photobioreactor incorporating a mandrel to control culture temperature. **Biotchnology and Bioengineering**, v.90, n.6, p.675-684, 2005.

CARLOZZI, P.; TORZILLO, G. Productivity of *Spirulina* in a strongly curved outdoor tubular photobioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, n.1/2, p.18-23, 1996.

CARRIERI, D.; ANANYEV, G.; BROWN, T.; DISMUKES, G.C. *In vivo* bicarbonate requirement for water oxidation by Photosystem II in the hypercarbonate-requiring cyanobacterium *Arthrospira maxima*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.101, n.11/12, p.1865–1874, 2007.

CARVAJAL, N.; FERNANDEZ, M.; RODRIGEZ, J.P.; DONOSO, M. Urease of *Spirulina maxima*. **Phytochemistry**, v.21, p.2821-2823, 1982.

CARVALHO, J.C.M. **Contribuição ao estudo dos processos descontínuo alimentado de fermentação alcoólica**. São Paulo, 1994. 334p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E., coord. **Biotechnologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2, p.205-218.

CARVALHO, J.C.M.; FRANCISCO, F.R.; ALMEIDA, K.A.; SATO, S.; CONVERTI, A. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rates. **Journal of Phycology**, v.40, p.589-597, 2004.

CARVALHO, J.C.M.; VITOLO, M.; SATO, S.; AQUARONE, E. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* grown in sugarcane blackstrap molasses through a fed-batch process: optimization by response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.110, n.3, p.151-164, 2003.

CERÓN GARCÍA, M.C.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J.M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G.; MOLINA GRIMA, E.; GARCÍA CAMACHO, F. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. **Journal of Applied Phycology**, v.12, n.4, p.239-248, 2000.

CEZARE, E.A. **Contribuição ao estudo da produção de biomassa de *Spirulina platensis* empregando uréia como fonte de nitrogênio por meio de processo descontínuo alimentado**. São Paulo, 1998. 166p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

CHAMORRO, G.; SALAZAR, M.; ARAUJO, K.G.L.; SANTOS, C.P.; CEBALLOS, G.; CASTILLO, L.F. Actualización en la farmacología de *Spirulina* (*Arthrospira*), un alimento no convencional. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.52, n.3, p.232-240, 2002.

CHANG, E.H.; YANG, S.S. Microalgae for biofixation of carbon dioxide. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.44, p.43-52, 2003.

CHELF, P.; BROWN, L.M.; WYMAN, C.E. Aquatic biomass resources and carbon dioxide trapping. **Biomass and Bioenergy**, v.4, p.175-183, 1993.

FENG, C. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends in Biotechnology**, v.14, n.11, p.421-426, 1996.

CHEN, T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.103-107, 2006.

CHISTI, M.Y. **Airlift bioreactors**. London, New York: Elsevier Applied Science, 1989. 345p. (Elsevier Applied Biotechnology Series).

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, n.3, p.294–306, 2007. [Review].

CHITNIS, P.R. Photosystem I: Function and physiology. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.593–626, 2001.

CHOI, K.H.; CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Influence of the gas liquid separator design on hydrodynamic and mass transfer performance of split-channel airlift reactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.62, p.327–332, 1995.

CHOJNACK, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.461–465, 2004a.

CHOJNACKA, K.; MÁRQUEZ-ROCHA, F.J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v.3, n.1, p.21–32, 2004b.

CIFERRI, O. *Spirulina*, the edible microorganism. **Microbiological Reviews**, v.47, n.4, p.551–578, 1983.

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. **Annual Review of Microbiology**, v.39, n.3, p.503–526, 1985.

COGNE, G.; LEHMANN, B.; DUSSAP, C.; GROS, J. Uptake of Macrominerals and trace elements by the Cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis* PCC 8005) under photoautotrophic conditions: culture medium optimization. **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, n.5, p.588–593, 2003.

COLLIER, J.L.; BRAHAMSHA, B.; PALENIK, B. The marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7805 requires urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) to utilize urea as a nitrogen source: molecular-genetic and biochemical analysis of the enzyme. **Microbiology**, v.145, p.447–459, 1999.

CONVERTI, A.; LODI, A.; DEL BORGHI, A.; SOLISIO, C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v.32, p.13–18, 2006a.

CONVERTI, A.; SCAPAZZONI, S.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.33, p.8–16, 2006b.

CORNET, J.F.; DUSSAP, C.G.; CLUZEL, P.; DUBERTRET, G. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors. II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, n.7, p.826–834, 1992.

CORONIL, T.; LARA, C.; GUERRERO, M.G. Shift in carbon flow and stimulation of amino-acid turnover induced by nitrate and ammonium assimilation in *Anacystis nidulans*. **Planta**, v.189, n.3, p.461–467, 1993.

COSTA, J.A.V.; COZZA, K.L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.7, p.439–442, 2001.

COSTA, J.A.V.; COLLA, M.L.; DUARTE FILHO, P.F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v.92, n.3, p.237–241, 2004.

CYSEWSKI, G.R.; WILKE, C.R. Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p.1421–1444, 1978.

DANESI, E.D.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v.23, p.261-269, 2002.

DANESI, E.D.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v.26, p.329-335, 2004.

DE BEER, D.; STOODLEY, P.; LEWANDOWSKI, Z. Liquid flow in heterogeneous biofilm. **Biotechnology and Bioengineering**, v.44, p.636-364, 1994.

DORN, T. **Nitrogen source**. In: University of Nebraska-Lincoln. Disponível em: <http://lancaster.unl.edu/ag/factsheets/288.htm>. Acesso em: 26 set. 2007.

ELOFF, J.N.; STEINITZ, Y.; SHILO, M. Photooxidation of Cyanobacteria in natural conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.31, n.1, p.119-126, 1976.

ESTRADA, J.E.; BESCOS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A.M. Antioxidant activity of different fractions de *Spirulina plantesis* protean extract. **Farmaco**, v.56, p.497-500, 2001.

FACCIOTTI, M.C.R. Fermentação contínua. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p.223-246.

FAINTUCH, B.L. **Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas**. São Paulo, 1989. 192p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

FALCONE, M.; MARQUES, A.B. Estudo sobre as condições de hidrólise do HCl na dosagem de açúcares redutores totais (A.R.T.). **Tecnologia de Alimentos & Bebidas**, v.4, p.24-30, 1965.

FERRAZ, C.A.M. Produção de *Spirulina maxima*: influência de ecofatores e uso de um sub produto da indústria alcooeira. **Revista de Microbiologia**, v.17, n.1, p.70-74, 1986.

FLORES, E.; HERRERO A. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In: BRYANT, D.A., ed. **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p.487–517.

GANTT, E. Phycobilisomes. **Annual Review of Plant Physiology**, v.32, p.327–347, 1981.

GARRITY, G.M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**: the archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. 2.ed. New York: Springer, 2001. v.1, p.540-543.

GEIDER, R.J.; MACINTYRE, H.L.; KANA, T.M. Dynamic model of phytoplankton growth and acclimation: responses of the balanced growth rate and the chlorophyll a: carbon ratio to light, nutrient-limitation and temperature. **Marine Ecology Progress Series**, v.148, p.187-200, 1997.

GIOIELLI, J.A. **Modificação Industrial de óleos e gorduras**. São Paulo: Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, 1997. pag 253.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, v.32, n.3, p.582-587, 2009.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v.315, p.808-2010, 2007.

GOMBOS, Z.; WADA, H.; MURATA, N. The Recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: a mechanism of chilling tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, p.8787-8791, 1994.

GORDILLO, F.J.L.; JIMÉNEZ, C.; FIGUEROA, F.L.; XAVIER NIELL, F. Effects of increased atmospheric CO₂ and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* (Arthrospira). **Journal of Applied Phycology**, v.10, p.461–469, 1999.

GREGERSSEN, L.; JORGENSEN, S.B. Supervision of fed-batch fermentations. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.75, p.69-76, 1999.

GRIFFITHS, D.J. Chlorophyll b-containing oxygenic photosynthetic prokaryotes: oxychlorobacteria (prochlorophytes). **Botanical Review**, v.72, n.4, p.330–366, 2006.

GRUSZECKI, W.I.; WOJTOWICZ, K.; KRUPA, Z.; STRZALKA, K. A direct measurement of thermal energy dissipation in the photosynthetic apparatus during induction of fluorescence. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v.22, p.23–27, 1994.

GUERREIRO, M.A.; ANDRIETTA, S.R.; MAUGERI, F. Expert for design of an industrial fermentation plant for the production alcohol. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.68, p.163-170, 1997.

GUERRERO, M.G.; LARA, C. Assimilation of inorganic nitrogen. In: FAY, P.; VAN BAALEN, C., eds. **The cyanobacteria**. Amsterdam, New York: Elsevier, 1987. p.163–186.

HANAGATA, N.; TAKEUCHI, T.; FUKUJU, Y.; BARNES, D.J.; KARUBE, I. Tolerance of microalgae to high CO₂ and high temperature. **Phytochemistry**, v.31, p.3345-3348, 1992.

HATTORI, A.; MYERS, J. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. I. Reduction of nitrite to ammonia. **Plant Physiology**, v.41, n.6, p.1031–1036, 1966.

HAUSKA, G.; ARNALD, M. Energy transduction in the Z-scheme. In: YUNUS, M.; MOHANTY, P.; PATHRE, U, eds. **Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation**. London: Taylor & Francis; 2000. p.108-126.

HEATHCOTE, P.; JONES, M.R.; FYFE, P.K. Type I photosynthetic reaction centres: structure and function. **Philosophical Transactions of the Royal Society, B: Biological Sciences**, v.358, p.231–243, 2003.

HEBER, U.; BILGER, W.; SHUVALOV, V.A. Thermal energy dissipation in reaction centres and in the antenna of photosystem II protects desiccated poikilohydric mosses against photo-oxidation. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.12, p.2993–3006, 2006.

HEIJNEN, J.J. Stoichiometry and kinetics of microbial growth form a thermodynamic perspective. In: RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. eds. **Basic biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p.45–58.

HENDRY, G.A.F. Chlorophylls and chlorophyll derivatives. In: HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON, J.D. **Natural food colorants**. 2.ed. London: Blackil Academic and Professional, 1996. p.131-155.

HENDRY, G.A.F.; PRICE, A.H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G.A.F.; GRIME J.P., eds. **Methods in comparative plant ecology**. London: Chapman & Hall, 1993. p.148-152.

HERRERO, A.; MURO-PASTOR, A.M.; FLORES, E. Nitrogen control in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.2, p.411–425, 2001.

HERRERO, A.; FLORES, E. Nitrate metabolism. RAI, A.K., ed. **Cyanobacterial nitrogen metabolism and environmental biotechnology**. New York: Springer-Verlag; Vanarasi: Narosa Publishing House, 1997. p.1–25.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, n.30, p.11206–11210, 2006.

HIRATA, S.; TAYA, M.; TONES, S. Continuous cultures of *Spirulina platensis* under photoautotrophic conditions with change in light intensity. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v.31, n.4, p.636-639, 1998.

HOUMARD, J. Gene transcription in filamentous cyanobacteria. **Microbiology**, v.140, p.433-441, 1994.

HU, Q.; GUTERMAN, H.; RICHMOND, A. A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation from the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625 after rapid quenching of the active CO₂ transport system. **Canadian Journal of Botany**, v.75, p.981–997, 1996.

INGLEDEW, W.M. **Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae***: a yeast primer, in the alcohol textbook. 3.ed. United Kingdom: Nottingham University Press, 1999. pag 49-87.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: IAL, 1985. v.1, 226p.

JANSSEN, M.; TRAMPER, J.; MUR, L.R.; WIJFFELS, R.H. Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, n.2, p.193-210, 2003.

JEAMTON, W. **Molecular cloning and characterization of the phycocyanin genes from *Spirulina platensis* C1**. Thailand, 1997. 140p. Thesis of Master - School of Bioresources and Technology - King Mongkut's Institute of Technology Thonburi.

JHA, P.; ALI, A.; RAGHURAM, N. Nitrate-Induction of nitrate reductase and its inhibition by nitrite and ammonium ions in *Spirulina platensis*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.13, n.2, p.163-167, 2007.

JIMENEZ, C.; COSSO, B.R.; LABELLA, D.; XAVIER NIELL, F. The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. **Aquaculture**, v.217, n.1, p.179-190, 2003.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeast: the effect of environmental and other variable. **Process Biochemistry**, v.16, n.3., p.42-49, 1981.

JOSLYN, M.A. Alcoholometry. In: _____, ed. **Methods in food analysis**: physical, chemical, and instrumental methods of analysis. New York: Academic Press, 1970. p.451. (Food Science and Technology).

QIAN, K.; BOROWITZKA, M.A. Light and nitrogen deficiency effects on the growth and composition of *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.38, n.1/2, p.93-103, 1993.

KANG, R.; WANG, J.; SHI, D.; CONG, W.; CAI, Z.; OUYANG, F. Interactions between organic and inorganic carbon sources during mixotrophic cultivation of *Synechococcus* sp. **Biotechnology Letters**, v.26, p.1429–1432, 2004.

KAPLAN, A.; REINHOLD, L. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.539–570, 1999.

KARAPETYAN, N.V. Protective dissipation of excess absorbed energy by photosynthetic apparatus of cyanobacteria: role of antenna terminal emitters. **Photosynthesis Research**, v.97, n.3, p.195–204, 2008.

KHESHGI, H.S.; PRINCE, R.C. Sequestration of fermentation CO₂ from ethanol production. **Energy**, v.30, p.1865–1871, 2005.

KHOTIMCHENKO, S.V.; YAKOVLEVA, I.M. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. **Phytochemistry**, v.66, p.73–79, 2005.

KIM, C.J.; JUNG, Y.H.; OH, H.M. Factors indicating culture status during cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. **Journal of Microbiology**, v.45, n.2, p.122-127, 2007.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; YAMAGUCHI, K.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.74, p.12-20, 1992.

KOCK, J.L.F.; VENTER, P.; SMITH, D.P.; VANWYK, P.W.J.; BOTES, P.J.; COETZEE, D.J.; POHL, C.H. A novel oxylipin-associated 'ghosting' phenomenon in yeast flocculation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.77, p.401–406, 2000.

KOMMAREDDY, A.R.; ANDERSON, G.A. Mechanistic modeling of a photobioreactor system. In: ASAE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING, Tampa, 2005. **Acta**. Saint Joseph: American Society of Agricultural Engineers, 2005. 1 CD-ROM.

KOSHIMIZU, L.H.; MELO CRUZ, M.R.; VALDEOLIVAS, R.I.; BUENO NETO, C.L.; RAMOS GONÇALVES, A.R.; ROMERO DE LA IGRESIA, M.; BORZANI, W. Fermentação alcoólica em uma única dorna em escala piloto. **Brasil Açucareiro**, v.102, p.14-21, 1983.

KUMAR, D.P.; MURTHY, S.D.S. Photoinhibition induced alterations in energy transfer process in phycobilisomes of PS II in the Cyanobacterium, *Spirulina platensis*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.40, n.5, p.644-648, 2007.

LARA, C.; GUERRERO, M.G. Interactions between carbon and nitrogen metabolism. In: RAI, A.K., ed. **Cyanobacterial nitrogen metabolism and environmental biotechnology**. New York: Springer-Verlag; Vanarasi: Narosa Publishing House, 1997. p.131-148.

LAW, E.A.; BERNING, J.L. Photosynthetic efficiency optimization studies with macroalga *Gracilaria tikvahiae*: implication for CO₂ emission control from power plants. **Bioresource Technology**, v.37, p.25-33, 1991.

LAWS, E.A.; SATORU, T.; HIRATA, J.; PANG, L. Optimization of microalgae production in a shallow outdoor flume. **Biotechnology and Bioengineering**, v.32, p.140–147, 1987.

LEA, P.J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C., eds. **Plant biochemistry and molecular biology**. Chichester, New York: John Wiley, 1993. cap.7, p.155-180.

LEDUY A.; SAMSON, R. Testing of an ammonia ion selective electrode for ammonia nitrogen measurement in the methanogenic sludge. **Biotechnology Letters**, v.4, n.5, p.303-306, 1982.

LEDUY A.; ZAJIC, J.E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, p.805–810, 1973.

LEDUY, A.; THERIEN, N. An improved method for optical density measurement of the semicroscopic blue algae *Spirulina maxima*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.19, p.1219-1224, 1977.

LEE, Y.K. Algal nutrition: heterotrophic carbon nutrition. In: RICHMOND, A., ed. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p.116-124.

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

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

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 4.ed. New York: W. H. Freeman, 2004. 1158 pag.

LI, D.M.; QI, Y.Z. *Spirulina* industry in China: present status and future prospects. **Journal of Applied Phycology**, v.9, p.25–28, 1997.

LI, Y.; ZHANG, J.; XIE, J.; ZHAO, J.; JIANG, L. Temperature-induced decoupling of phycobilisomes from reaction centers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1504, n.2/3, p.229-234, 2001.

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

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIN, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, V.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, N. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Eggard Bucher, 2001. v.3, p.1-43.

LIU, X.; ZHAO, J.; WU, Q. Oxidative stress and metal ions effects on the cores of phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **FEBS Letters**, v.579, n.21, p.4571–4576, 2005.

LORENZ, R.T. **A review of *Spirulina* and *Haematococcus algae* meal as a carotenoid and vitamin supplement for poultry**. S.l.: Cyanotech Corporation, 1999. (*Spirulina Pacifica* Technical Bulletin, 53). Disponível em: <http://www.climatebabes.com/documents/Algae%20Spirulina%20food%20supplement.pdf>. Acesso em: 25 Mar. 2010.

LU, C.; VONSHAK, A. Photoinhibition in outdoor *Spirulina platensis* cultures assessed by polyphasic chlorophyll fluorescence transients. **Journal of Applied Phycology**, v.11, n.4, p.355-359, 1999.

LU, C.; ZHANG, J. Role of light in the response of PSII photochemistry to salt stress in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.346, p.911-917, 2000.

LUO, H.P.; KEMOUN, A.; AL-DAHMAN, M.H.; SEVILLA, J.M.F.; SÁNCHEZ, J.L.G.; CAMACHO, F.G.; GRIMA, E.M. Analysis of photobioreactors for culturing high-value microalgae and cyanobacteria via an advanced diagnostic technique: CARPT. **Chemical Engineering Science**, v.58, p.2519–2527, 2003.

MA, X.; CHEN, K.W.; LEE, Y.K. Growth of *Chlorella* outdoors in a changing light environment. **Journal Applied Phycology**, v.9, p.425–430, 1997.

MACINTYRE, H.L.; KANA, T.M.; ANNING, T.; GEIDER, R.J. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v.38, p.17–38, 2002.

MAGALHÃES, M.M.A. **Fermentação alcoólica do mosto de melaço**: influência da adição de fonte de nitrogênio ao mosto no teor de proteína e levedura residual. São Paulo 1978. 85p. Dissertação de Mestrado – Engenharia Química Escola Politécnica – Universidade de São Paulo.

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da “Serra gaúcha” (RS). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.3, p.453-458, 2004.

MANRIQUE REOL, E. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz. **Ecosistemas**, v.12, n.1, 2003. Disponível em: http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8958/1/ECO_12%281%29_08.pdf. Acesso em: 7 agost. 2009.

MARQUES, F. **Vias para avançar como líder do etanol**. Pesquisa FAPESP, n.149, Jul. 2008. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=3574&bd=1&pg=1>. Acesso em: 9 mar. 2010.

MARQUEZ, F.J.; NISHIO, N.; NAGAI S.; SASAKI, K. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.6, p.159–164, 1995.

MÁRQUEZ, F.J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.76, p.408-410, 1993.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 388p.

MASOJÍDEK, J.; PAPÁČEK, Š.; SERGEJEVAVÁ, M.; JIRKA, V.; ČERENÝ, J.; KUNC, J.; KOREČKO, J.; VERBOVIKOVA, O.; KOKPECKY, J.; ŠTYS, D.;

TORZILLO, G. A closed solar photo bioreactor for cultivation of microalgae under supra-high irradiance: basic design and performance. **Journal of Applied Phycology**, n.15, p.239–248, 2003.

MATA, A.M. **Engineering photosynthetic systems for bioregenerative life support**. Barcelona, 2007. 274p. Tese de Doutorado – Escola Técnica Superior de Engenharia - Universidade Autònoma de Barcelona.

MATSUNAGA, T.; SUDO, H.; TAKEMASA, H.; WACHI, Y.; NAKAMURA, N. Sulfated extracellular polysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytia* immobilized in light-diffusing optical fibers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p.24-27, 1996.

MCCARTY, R.E.; EVRON, Y.; JOHNOSON, E.A. The chloroplast ATP synthase: a rotary enzyme? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.51, p.83-109, 2000.

MCEVOY, J.P.; GASCON, J.A.; BATISTA, V.S.; BRUDVIG, G.W. The mechanism of photosynthetic water splitting. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.4, p.940–949, 2005.

MELIS, A. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? **Trends in Plant Science**, v.4, p.130–135, 1999.

MENDOZA, H.; MARTEL, A.; JIMÉNEZ DEL RÍO, M.; GARCÍA REINA, G. Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. **Journal of Applied Phycology**, v.11, n.1, p.15-19, 1999.

MERCHUK, J.C.; LADWA, N.; CAMERON, A.; BULMER, M.; BERZIN, I.; PICKETT, A.M. Liquid flow and mixing in concentric tube air-lift reactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.66, p.174-182, 1996.

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

MIRANDA, M.S.; CINTRA, R.G.; BARROS, S.B.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, n.8, p.1075-1079, 1998.

MOBLEY, H.L.T.; HAUSINGER, R.P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological Reviews**, v.53, n.1, p.85–108, 1989.

MOHANTY, P.; SCRIVASTAVA, M.; KRISHNA, K.B. The photosynthetic apparatus of *Spirulina*: electron transport and energy transfer. In: VONSHAK, A., ed. **Spirulina platensis (Arthrospira)**: physiology, cell-biology, and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997. p.17-72.

MOLINA, E.; FERNÁNDEZ, J.; ACIÉN, F.G.; CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, v.92, p.113–131, 2001.

MOLINA GRIMA, E.; SÁNCHEZ PÉREZ, J.A.; GARCÍA CAMACHO, F.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J.M.; FERNÁNDEZ, F.G.; URDA CARDONA, J. Biomass

and icosapentanoic acid productivities from an outdoor batch culture of *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 in an airlift tubular photobioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, p.658-663, 1995.

MÖLLERSTEN, K.; YAN, J.; MOREIRA, J.R. Potential market niches for biomass energy with CO₂ capture and storage: opportunities for energy supply with negative CO₂ emissions. **Biomass and Bioenergy**, v.25, p.273–285, 2003.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v.129, p.439–445, 2007b.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v.29, p.1349–1352, 2007a.

MORIST, A.; MONTESINOS, J.L.; CUSIDÓ, J.A.; GÓDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, v.37, p.535-547, 2001.

MOZZO, M.; PASSARINI, F.; BASSI, R.; VAN AMERONGEN, H.; CROCE, R. Photoprotection in higher plants: the putative quenching site is conserved in all outer light-harvesting complexes of Photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics**, v.1777, n.10, p.1263-1267, 2008.

MUGGLI, D.L.; HARRISON, P.J. Effects of nitrogen source on the physiology and metal nutrition of *Emiliana huxleyi* grown under different iron and light conditions. **Marine Ecology: Progress Series**, v.130, p.255-267, 1996.

MÜHLING, M.; BELAY, A.; WHITTON, B.A. Screening *Arthrospira* (*Spirulina*) strains for heterotrophy. **Journal of Applied Phycology**, v.17, p.129–135, 2005.

MURAKAMI, A.; KIM, S.J.; FUJITA, Y. Changes in photosystem stoichiometry in response to environmental conditions for cell growth observed with the Cyanophyte *synechocystis* PCC 6714. **Plant and Cell Physiology**, v.38, n.4, p.392-397, 1997.

MURO-PASTOR, M.I.; FLORÊNCIO, F.J. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacterium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.595–603, 2003.

NAKAJIMA, Y.; UEDA, R. Improvement of photosynthesis in dense microalgal suspension by reduction of light harvesting pigments. **Journal of Applied Phycology**, v.9, p.503–510, 1997.

NARAYAN, M.S.; MANOJ, G.P.; VATCHRAVELU, K.; BHAGYALAKSHIMI, N.; MAHADEVASWAMY, M. Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *Spirulina platensis*. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.56, n.7, p.521-528, 2005.

NELSON, N.; BEN-SHEM, A. Photosystem I reaction center: past and future **Photosynthesis Research**, v.73, p.193–206, 2002.

NELSON, N.; YOCUM, C.F. Structure and function of photosystems I and II. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.521–565, 2006.

NERANTZIS, E.T.; TZOVENIS, I.P.; STAMATIADIS, S.; GIANNAKOPOULOU, E.; MANIATIS, L. **Continuous production of *Arthrospira (=Spirulina) platensis* in a helical photobioreactor.** Disponível em: <http://www.srcosmos.gr/srcosmos/showpub.aspx?aa=8290>. Acesso em: 26 mar. 2010

NIEVA, M.; VALIENTE, E.F. Inorganic carbon transport and fixation in cells of *Anabaena variabilis* adapted to mixotrophic conditions. **Plant and Cell Physiology**, v.37, p.1–7, 1996.

OCHOA DE ALDA, J.A.G.; TAPIA, M.; LLAMA, M.J.; SERRA, J.L. Changes in photosynthetic yield, amino acids, and organic acids are induced by ammonium addition to cells of *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae). **Journal of Phycology**, v.32, p.602–608, 1996.

OGAWA, T.; TERUI, G. Studies on the growth of *Spirulina platensis* on the pure culture of *Spirulina platensis*. **Journal of Fermentation Technology**, v.48, p.361–367, 1970.

OGBONNA, J.C.; MASUI, H.; TANAKA, H. Sequential heterotrophic/ autotrophic cultivation: an efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. **Journal of Applied Phycology**, v.9, p.359–366, 1997.

OGBONNA, J.C.; TANAKA, H. Light requirement and photosynthetic cell cultivation: development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v.12, p.207–218, 2000.

OGBONNA, J.C.; TANAKA, H. Industrial-size photobioreactors. **CHEMTECH**, v.27, n.7, p.43–49, 1997.

OGBONNA, J.C.; TOMIYAMA, S.; TANAKA, H. Production of α -tocopherol by sequential heterotrophic-photoautotrophic cultivation of *Euglena gracilis*. **Journal of Biotechnology**, v.70, n.1/3, p.213–221, 1999.

OLGUÍN, E.J.; GALICIA, S.; HERNÁNDEZ, E.; ANGULO, O. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. growth on pig waste. **Bioresource Technology**, v.77, p.19–24, 2001.

OMATA, T.; OHMORI, M.; ARAI, N.; OGAWA, T. Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 defective in nitrate transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, p.6612–6616, 1989.

ONO, E.; CUELLO, J.L. Design parameters of solar concentrating systems for CO₂-mitigating algal photobioreactors. **Energy**, v.29, p.1651–1657, 2004.

PALINSKA, K.A.; JAHNS, T.; RIPPKA, R.; TANDEAU DE MARSAC, N. *Prochlorococcus marinus* strain PCC9511, a picoplanktonic cyanobacterium, synthesizes the smallest urease. **Microbiology**, v.146, p.3099–3107, 2000.

PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI, F.L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *S. platensis*. In: CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI MICROBIOLOGIA, 17., Padova, 1975. **Atti**. Padova, 1975. p.845-853.

PELIZER, L.H.; DANESI, E.D.G.; RANGEL, C.O.; SASSANO, C.E.N.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; MORAES, I.O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.371-375, 2003.

PELIZER, L.H.; SASSANO, C.E.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; GIOELLI, L.A.; MORAIS, I.O. Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. **Revista de Farmácia e Química**, v.32, n.1, p.37-40, 1999.

PEREGO Jr., L. **Fermentação alcoólica contínua de mosto de melaço**: influência da concentração do mosto e da vazão específica de alimentação na estabilidade do sistema a 32 °C. São Paulo, 1979. 162p. Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

PIERCE, W.C.; HAENISCH, E.L. **Quantitative analysis**. 3.ed. New York: John Wiley, 1948. 497p.

PINTO, L.S.; VIERA, L.M.; PONS, M.N.; FONSECA, M.M.R.; MENEZES, J.C. Monitorização de processos biológicos. III. Análise digital de imagem. **Boletim de Biotecnologia**. Disponível em: http://dequim.ist.utl.pt/bbio/70/pdf/Analise_Digital_de_Imagem.pdf. Acesso em: 30 set. 2007.

PIORRECK, M.; BAASCH, K.H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v.23, p.207-216, 1984.

PRASANNA, R.; SOOD, A.; SURESH, A.; NAYAK, S.; KAUSHIK, B.D. Potentials and applications of algal pigments in biology and industry. **Acta Botanica Hungarica**, v.49, n.1/2, p.131-156, 2007.

PULZ, O.; SCHEIBENBOGEN, K. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.59, p.123-152, 1998.

RAFIQUL, I.M.; JALAL, K.C.A.; ALAM, M.Z. Environmental factors for optimisation of spirulina biomass in laboratory culture. **Biotechnology**, v.4, n.1, p.19-22, 2005.

RAI, A.K. Purification and properties of urease from a cyanobacterium *Anabaena doliolum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.61, n.3, p.319-322, 1989.

RAI, A.K.; SINGH, S. Urease of blue-green algae (Cyanobacteria) *Anabaena doliolum* and *Anacystis nidulans*. **Current Microbiology**, v.16, n.2, p.113-117, 1987.

RANGEL-YAGUI, C.A.; DANESI, E.D.G.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v.92, p.133-141, 2004.

RAPP, A.; VERSINI, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN IN GRAPES AND WINE, Seattle, 1991. **Proceedings**. Seattle: American Society for Enology and Viticulture, 1991. p.156-164.

RAVAGNANI, M.A.S.S.; THONERN, W.I.; CABALLERO, J.A. A mathematical model for the composition of Brazilian ethanol shares for exportation to be blended to gasoline. **Energy Policy**, v.35, n.10, p.5060–5063, 2007.

RAVEN, J.A.; KIBLER, J.E.; BEARDALL, J. Put out the light, and then put out the light. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.80, n.1, p.1-25, 2000.

REICHERT, C.C.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.23, n.1, p.23-28, 2006.

RICHMOND, A. Large scale microalgal culture and applications. **Progress in Phycological Research**, v.7, p.269–330, 1990.

RICHMOND, A. Phototrophic microalgae. In: REHM, H.J.; REED, G; KIESLICH, K.; BRAUER, H.; PAPE, H.; KENNEDY, J.F.; JACOBSON, G.K. eds. **Biotechnology**. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. v.3, p.109–143.

RICHMOND, A. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. **Journal of Applied Phycology**, v.12, p.441–451, 2000.

RICHMOND, A.; GROBBELAAR, J.U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. **Biomass**, v.10, p.253-264, 1986.

RICHMOND, T.; LICHTENBERG, B.; STAHL, B.; VONSHAK, A. Quantitative assessment of the major limitations of productivity of *Spirulina platensis* in open raceways. **Journal of Applied Phycology**, v.2, p.195-206, 1990.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.169–180, 2003.

ROMERO, J.M.; LARA, C. Photosynthetic assimilation of NO_3^- by intact cells of the Cyanobacterium *Anacystis nidulans*. **Plant Physiology**, v.83, p.208-212, 1987.

Romero. FAPESP, São Paulo: Agência Fapesp, Disponível em: <http://www.agencia.fapesp.br>. Acesso em: 19 mar. 2007.

ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses pullulan production to increase. **Process Biochemistry**, v.33, p.805-810, 1998.

CAMACHO RUBIO, F.; GARCIA CAMACHO, F.; FERNANDEZ SEVILLA, J. M.; CHISTI, Y.; MOLINA GRIMA, E. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, n.4, p.459-473, 2003.

RUSSELL, J.B. **Química geral**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1982. 897p.

SAKAMOTO, T.; BRYANT, D.A. Nitrate transport and not photoinhibition limits growth of the freshwater cyanobacterium *synechococcus* species PCC 6301 at low temperature. **Plant Physiology**, v.119, p.785–794, 1999.

SAMUELSSON, G.; LONNEBORG, A.; ROSENQVIST, E.; GUSTAFSSON, P.; OEQUIST, G. Photoinhibition and reactivation of photosynthesis in the *Cyanobacterium anacystis nidulans*. **Plant Physiology**, v.79, n.4, p.992-995, 1985.

SÁNCHEZ-LUNA, L.D.; BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Influence of pH, temperature and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: a kinetic and thermodynamic approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v.96, p.702-711, 2007.

SÁNCHEZ-LUNA, L.D.; CONVERTI, A.; TONINI, G.C.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Continuous and pulse feedings of urea as a nitrogen source in fed-batch cultivation of *Spirulina platensis*. **Aquacultural Engineering**, v.31, n.3/4, p.237-245, 2004.

SASSANO, C.E.N. **Influência da uréia no crescimento e no teor do ácido graxo γ -linolênico na biomassa de *Spirulina platensis***. São Paulo, 1999. 144p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SASSANO, C.E.N.; CARVALHO, J.C.M.; GIOIELLI, L.A.; SATO, S.; TORRE, P.; CONVERTI, A. Kinetics and bioenergetics of *Spirulina platensis* cultivation by fed-batch addition of urea as nitrogen source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.112, p.143–150, 2004.

SAWAYAMA, S.; INOUE, S.; DOTE, Y.; YOKOYAMA S.Y. CO₂ fixation and oil production through microalga. **Energy Conversion and Management**, v.36, p.729–31, 1995.

SCHENK, P.M., THOMAS-HALL, S.R.; STEPHENS, E.; MARX, U.C.; MUSSGNUG, J.H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **BioEnergy Research**, v.1, n.1, p.20–43, 2008.

SCHLÖSSER, U.G. Sammlung von algenkulturen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v.95, p.181-276, 1982.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products: properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, n.11, p.361-371, 2002.

SHIMAMATSU, H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. **Hydrobiologia**, v.512, p.39-44, 2004.

SIEGEL, M.H.; ROBINSON, C.W. Applications of airlift gas-liquidolidreactors in biotechnology. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.47, p.3215-3229, 1992.

SMITH, B.M.; MORRISSEY, P.J.; GUENTHER, J.E.; NEMSON, J.A.; HARRISON, M.A.; ALLEN, J.F.; MELIS, A. Response of the photosynthetic apparatus in *Dunaliella salina* (Green Algae) to irradiance stress. **Plant Physiology**, v.93, p.1433-1440, 1990.

SOBCZUK, T.M.; CAMACHO, F.G.; RUBIO, F.C.; FERNANDEZ, F.G.A.; GRIMA, E.M. Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.67, n.4, p.465-475, 2000.

SOLETTI, D.; BINAGHI, L.; FERRARI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M.; ZILLI, M.; CONVERTI, A. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, n.2, p.369-375, 2008.

SOLETTI, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v.243, p.217-224, 2005.

SOLOVCHENKO, A.E.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; DIDI-COHEN, S.; COHEN, Z.; MERZLYAK, M.N. Effects of light and nitrogen starvation on the content and composition of carotenoids of the green microalga *parietochloris incise*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.55, n.4, p.455-462, 2008.

SOLOVCHENKO, E.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; DIDI-COHEN, S.; COHEN, Z.; MERZLYAK, M. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. **Journal of Applied Phycology**, v.20, p.245-251, 2008.

SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.19-23, 1952.

SONOIKE, K. Photoinhibition of photosystem. I: Its physiological significance in the chilling sensitivity of plants. **Plant and Cell Physiology**, v.37, n.3, p.239-247, 1996.

SOUNDARAPANDIAN, P.; VASANTHI, B. Effects of chemical parameters on *spirulina platensis* biomass production: optimized method for phycocyanin extraction. **International Journal of Zoological Research**, v.4, n.1, p.1-11, 2008.

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

STANCA, D.; POPOVIC, E. Urea as nitrogen source in modified Zarrouk medium. **Revue Roumaine de Biologie, Serie de Biologie Vegetale**, v.41, n.1, p.25-31, 1996.

STANIER, R.Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.31, p.225-274, 1977.

STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.748-755, 2005.

SU, C.; GIRIDHAR, R.; CHEN, C.; WU, W. A novel approach for medium formulation for growth of a microalga using motile intensity. **Bioresource Technology**, v.98, p.3012–3016, 2007.

SUKENIK, A.; TCHERNOV, D.; KAPLAN, A.; HUERTAS, E.; LUBIAN, L.M.; LIVNE, A. Uptake, efflux, and photosynthetic utilization of inorganic carbon by the marine Eustigmatophyte *nannochloropsis*. **Journal of Phycology**, v.33, n.6, p.969-974, 1997.

TAKANO, H.; ARAI, T.; IRANO, M.; MATSUGANA, T. Effects of intensity and quality of light on phycocyanin production by a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 042902. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.43, p.1014-1018, 1995.

TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMARD, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v.104, n.1/2, p.119-189, 1993.

TELFER, A.; HE, W.-Z.; BARBER, J. Spectral resolution of more than one electron donor in the isolated Photosystem II reaction center. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1017, p.143-151, 1990.

TERRY, K.L. Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v.28, p.988–995, 1986.

TOKUSOGLU, Ö.; ÜNAL, M.K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. **Journal of Food Science**, v.68, n.4, p.1144-1148, 2003.

TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. In: VONSHAK, A., ed. **Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology, and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997. p.79-99.

TOMASELLI, L.; MARGHERI, M.C.; SACCHI, A. Effects of light on pigments and photosynthetic activity in a phycoerythrin-rich strain of *Spirulina* *su bsalsa*. **Aquatic Microbial Ecology**, v.9, p.27-31, 1995.

TORRE, P.; SASSANO, C.E.N.; SATO, S.; CONVERTI, A.; GIOIELLI, L.A.; CARVALHO, J.C.M. Fed-batch addition of urea for *Spirulina platensis* cultivation thermodynamics and material and energy balances. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, n.5, p.698–707, 2003.

TORZILLO, G.; SACCHI, A.; MATERASSI, R.; RICHMOND, A. Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v.3, p.103–109, 1991.

TRAVIESO, L.; HALL, D.O.; RAO, K.K.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.47, p.151–155, 2001.

TREDICI, M.R. Bioreactors, photo. In: FLICKINGER, M.C.; DREW, S.W., eds. **Encyclopedia of bioprocess technology**: fermentation, biocatalysis and bioseparation. New York: Wiley, 1999. v.1, p.395–419.

TREDICI, M.R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A., ed. **Handbook of microalgal cultures, biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell, 2004. p.178–214

TREDICI, M.R.; ZITTELLI, C.G. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.57, n.2, p.187–197, 1998.

VACHHANI, A.; VONSHAK, A. Genetics of *Spirulina*. In: VONSHAK, A., ed. **Spirulina platensis (Arthrospira)**: physiology, cell-biology, and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997. p.67–77.

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHELE, H.; DI LUCCIO, M.; JACQUES, R.A.; FÚRIGO Jr., A. 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.

VALLADARES, A.; MONTESINOS, M.L.; HERRERO, A.; FLORES, E. An ABC-type, high-affinity urea permease identified in cyanobacteria. **Molecular Microbiology**, v.43, n.3, p.703–715, 2002.

VAN EYKELENBURG, C. The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.45, n.3, p.369–390, 1979.

VERNEREY, A.; ALBIOL, J.; LASSEUR, C.; GODIA, F. Scale-up and design of a pilot-plant photobioreactor for the continuous culture of *Spirulina platensis*. **Biotechnology Progress**, v.17, n.3, p.431–438, 2001.

VOGEL, A.I. **Análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002. 462 p.

VONSHAK, A., ed. **Spirulina platensis (Arthrospira)**: physiology, cell-biology, and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997. 223p.

VONSHAK, A.; KANCHARAKSA, N.; BUNNAG, B.; TANTICHAROEN, M. Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress. **Journal Applied Phycology**, v.8, p.119–124, 1996.

VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Mass production of the blue alga *Spirulina*: an overview. **Biomass**, v.15, p.233–247, 1988.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C.Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.79, p.707–718, 2008.

WANG, Y.; LI, Y.; SHI, D.; SHEN, G.; RU, B.; ZHANG, S. Characteristics of mixotrophic growth of *Synechocystis* sp. in an enclosed photobioreactor. **Biotechnology Letters**, v.24, p.1593–1597, 2002.

WARD, O.P. **Biotecnología de la fermentación**: principios, procesos y productos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1989. 274p.

WATANABE, Y.; HALL, D.O. Photosynthetic CO₂ fixation technologies using a helical tubular bioreactor incorporating the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Energy Conversion and Management**, v.36, n.6/9, p.721-724, 1995a.

WATANABE, Y.; HALL, D.O. Photosynthetic production of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* in a cone-shaped helical tubular photobioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.44, p.693-698, 1996.

WATANABE, Y.; DE LA NOUE, J.; HALL, D.O. Photosynthetic performance of a helical tubular photobioreactor incorporating the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.47, n.2, p.261-269, 1995b.

WEN, Y.W.; CHEN, F. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentanoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.341-347, 2001.

WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v.17, p.482-487, 1999.

WHYTE, J.N.C. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. **Aquaculture**, v.60, p.231-241, 1987.

XU, N.; ZHANG, X.; FAN, X.; HAN, L.; TSENG, C.K. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (Eustigmatophyta). **Journal of Applied Phycology**, v.13, p.463-469, 2001.

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

YOUNG, E.B.; BEARDALL, J. Modulation of photosynthesis and inorganic carbon acquisition in a marine microalga by nitrogen, iron, and light availability. **Canadian Journal of Botany**, v.83, p.917-928, 2005.

YUN, Y.S.; LEE, S.B.; PARK, J.M.; LEE, C.I.; YANG, J.W. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.69, p.451-455, 1997.

ZHANG, X.W.; ZHANG, Y.M.; CHEN, F. Kinetic models for phycocyanin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga *Spirulina platensis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.283-288, 1998.

ZHANG, K.; MIYACHI, S.; KURANO, N. Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.55, p.428-433, 2001.

ANEXOS

Artigos publicados, submetidos e em fase de redação para periódicos internacionais:

ANEXO 1 - BEZERRA, R.P.; MONTOYA, E.Y.O.; SATO, S.; PEREGO, P.; CARVALHO, J.C.M.; CONVERTI, A. Effects of light intensity and dilution rate on the semicontinuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. A kinetic Monod-type approach. *Bioresource Technology* .102, p.3215 - 3219, 2011.

ANEXO 2 - BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Bioenergetic aspects. *Biomass and Bioenergy*.

ANEXO 3 - BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Carbon dioxide from alcoholic fermentation as a carbon source for the fed-batch cultivation of *Arthrospira platensis*. *Biomass and Bioenergy*

BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. . Chemical composition of the *A. platensis* biomass cultivated on CO₂ from alcoholic fermentation. Em fase de Redação

ANEXOS

Anexo 1

Bioresource Technology 102 (2011) 3215–3219

Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Effects of light intensity and dilution rate on the semicontinuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. A kinetic Monod-type approachRaquel Pedrosa Bezerra^{a,b}, Erika Yuliana Ortiz Montoya^{a,b}, Sunao Sato^a, Patrizia Perego^b, João Carlos Monteiro de Carvalho^a, Atilio Converti^{b,c,*}^a Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Arns Prates 580, B. 16, 05508-900 São Paulo-SP, Brazil^b Department of Chemical and Process Engineering "G.B. Bontino", University of Genoa, via Opera Pia 15, 16145 Genoa, Italy^c CAPES Fellowship holder, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2010

Received in revised form 31 October 2010

Accepted 1 November 2010

Available online 9 November 2010

Keywords:

Light intensity

Dilution rate

Arthrospira (Spirulina) platensis

Semicontinuous process

Cell productivity

ABSTRACT

Semicontinuous cultures were carried out at different dilution rates (D) and light intensities (I) to determine the maximum productivity of *Arthrospira platensis* cultivated in helioidial photobioreactor up to the achievement of pseudo-steady-state conditions. At $I = 108 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the semicontinuous regime ensured the highest values of maximum cell concentration ($X_{\text{max}} = 5772 \pm 113 \text{ mg L}^{-1}$) and productivity ($P_{\text{cell}} = 1319 \pm 25 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) at the lowest ($D = 0.1 \text{ day}^{-1}$) and the highest ($D = 0.3 \text{ day}^{-1}$) dilution rates, respectively. A kinetic model derived from that of Monod was proposed to determine the relationship between the product of light intensity to dilution rate (ID) and the cell productivity, which were shown to exert a combined influence on this parameter. This result put into evidence that pseudo-steady-state conditions could be modified according to circumstances, conveniently varying one or other of the two independent variables.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Photosynthetic microorganisms are one of the most promising sources of energy since they are renewable and neutral with respect to CO_2 emissions. Among the photosynthetic microorganisms with commercial importance, there are species belonging to the genus *Spirulina*, now named *Arthrospira*, that are filamentous cyanobacteria (blue-green algae) and have a long history of use as food. *Arthrospira* species and strains can achieve 60–70% protein by dry weight and are a rich source of vitamins, especially vitamin B_{12} , provitamin A (β -carotene) and minerals, especially iron. In addition, they are one of the few sources of dietary γ -linolenic acid (GLA) and also contain other phytochemicals that have potential health benefits (Belay, 2002).

In order to increase productivity and reduce costs of production, different types of processes have been developed. An interesting alternative is the semicontinuous operation that consists in periodically replacing a part of the exhaust medium with fresh medium so as to keep the culture volume constant (Huang et al., 2010). Such a mode of operation offers in general many advantages over batch and continuous cultures. Batch culture systems, which are

widely applied because of their simplicity and flexibility, are often considered the most reliable, but not necessarily the most efficient ones. On the other hand, large scale continuous cultures were not applied extensively up to now, due to the several difficulties in their control, among which higher risk of contamination, use of feeding pumps, lower yields, etc.

The semicontinuous cultures did not require any special equipment and can be implemented in almost any kind of mass culture, and if properly applied, can be as effective as the chemostat ones (Brown et al., 1993). Moreover, when operating under pseudo-steady-state conditions, the levels of components required for growth or for product formation can be always maintained at non-limiting or non-inhibitory levels along the run (Fábregas et al., 1985, 1998).

Light is the energy source driving photosynthesis and it is one of the most important factor determining the growth of photosynthetic microorganisms. These use light energy to convert CO_2 into carbohydrates, lipids and proteins, with higher areal efficiency than land plants (Jorquera et al., 2010).

In closed photobioreactors, high volumetric productivities are desired in order to reduce the photobioreactor size (Janssen et al., 2003). In a tubular photobioreactor, the light intensity is very high at the reactor wall and decreases with increasing the radial depth, owing to the absorption of light by the photosynthetic microorganism. As a consequence, the cells are exposed to light/dark cycles at high light intensities close to the reactor surface

* Corresponding author at: Department of Chemical and Process Engineering "G.B. Bontino", University of Genoa, via Opera Pia 15, 16145 Genoa, Italy. Tel.: +39 10 3532593; fax: +39 10 3532586.

E-mail address: converti@unige.it (A. Converti).

and meet a darkness zone in the interior of the photobioreactor (Molina Grima et al., 1999).

In this study, a helicoidal tubular photobioreactor was used for the cultivation of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* using different light intensities and dilutions rates with the aim of obtaining high cell concentration, once the batch cultures had reached early stationary growth phase, and high cell productivity under semicontinuous pseudo-steady-state conditions.

2. Methods

2.1. Microorganism and culture conditions

A. platensis was maintained and cultivated in the culture medium of Schlösser (1982) having the following composition (per L): 13.6 g NaHCO_3 , 4.03 g Na_2CO_3 , 0.50 g K_2HPO_4 , 2.50 g NaNO_3 , 1.00 g K_2SO_4 , 1.00 g NaCl , 0.20 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. All the nutrients were dissolved in distilled water containing (per L): 6.0 mL of metal solution (97.0 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 41.0 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5.0 mg ZnCl_2 , 2.0 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4.0 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 1.0 mL of micronutrient solution (50.0 mg Na_2EDTA , 618 mg H_3BO_3 , 19.6 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 44.0 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20.0 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 12.6 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 12.6 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and 1.0 mL of a 1.5 g L^{-1} B_{12} vitamin solution.

A schematic diagram of the helical tubular reactor is shown in Fig. 1. Such a configuration was simple to build up and maintain, being a cylindrical shaped helical photostage made of glass, with slight inclination to make the fluid flow easier, linked by PVC tubes to a 1.0 L cylinder bottle, closed with cotton cap. Based on previous results (Converti et al., 2006), circulation was granted by an airlift mechanism, in which air, mixed with the broth, uplifted the liquid. Ambient air was injected through an air pump (model AC-1000, Resun, Shenzhen, China) at the bottom of the tubes to drive the liquid from the bottom to the top of the reactor. The glass helical cylinder had a diameter of 13 cm and was 0.70 m long, the internal diameter of the photostage's tube being 1 cm, while the PVC tube had the same diameter and was 1.0 m long. The overall starting volume was 1.1 L, being the photostage volume about 0.6 L.

Cultivations were carried out at initial pH of 9.5 ± 0.2 (Sánchez-Luna et al., 2007; Tredici and Zittelli, 1998) and temperature of $30 \pm 2^\circ\text{C}$. An initial biomass concentration of 400 mg L^{-1} (Soletto et al., 2005) was always used at the start of batch cultures preceding the semicontinuous ones. Semicontinuous cultures were started, once the batch cultures had reached early stationary growth phase, by feeding the fresh medium at different dilution rates (D), specifically 0.1, 0.2 and 0.3 day^{-1} , corresponding to 10%, 20% and 30% of volume renewal per day. It was assumed that pseudo-steady-state conditions were achieved when cell concentration, which was determined daily, kept almost constant along a time period at least twice the residence time. The liquid volume was kept constant at 1.1 L during all the culture by replacing water evaporation when necessary. Three different values of the average irradiance on the surface of the tubular helicoidal photobioreactor were tested, specifically 36, 72 and $108 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. After each experimental run at different light intensity, the reactor was emptied, cleaned, and inoculated for a new run. Every run was operated non-aseptically for approximately 7 weeks without any contamination problem. Under these conditions cell concentration and biomass productivity were determined.

2.2. Analytical determinations

Biomass concentration was estimated by optical density measurements using a calibration curve relating the absorbance at 560 nm to dry biomass weight (Leduy and Therien, 1977). Light

Fig. 1. Schematic diagram of the helical photobioreactor. (1) Cylinder bottle; (2) PVC tube; (3) glass photostage; (4) air pump; (5) air lift system; (6) variable number of 40 W-fluorescent lamps.

was furnished by means of a variable number of 40 W-fluorescent lamps, and its intensity periodically determined by an illuminance meter, model TL-1 (Minolta, Osaka, Japan). Initially, light intensity was expressed in klux, and then converted to photosynthetic photon flux density (PPFD), expressed in $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, using the conversion factor ($12 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ klux}^{-1}$) proposed by McCree (1981) for white fluorescent light.

2.3. Parameters determination

The cell productivity of batch runs (P_{XB}), expressed in $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, was calculated as:

$$P_{XB} = \frac{X_m - X_i}{T} \quad (1)$$

where, X_m and X_i are the final and the initial cell concentrations, respectively, and T is the cultivation time.

On the other hand, the cell productivity in semicontinuous cultures (P_{XS} ; $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) was calculated as the product of the dilution rate (D ; day^{-1}) and the cell concentration under pseudo steady-state conditions (X_s ; mg L^{-1}):

$$P_{XS} = DX_s \quad (2)$$

3. Results and discussion

Figs. 2–4 show the results of *A. platensis* batch and semicontinuous cultivations carried out at different light intensities and dilution rates. At the end of batch cultures (after about 8 days), the maximum cell concentration (X_{m}) increased from 5200 to

5800 mg L^{-1} when the light intensity was increased from 36 to 72 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, highlighting growth limitation by light intensity within this irradiance level. On the other hand, an additional increase in light intensity up to 108 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ led only to a reduction in the cultivation time from 8 to 6 days, whereas X_{m} kept almost the same, thus resulting in a cell produc-

Fig. 2. Cell concentration of *A. platensis* during batch and semicontinuous cultures carried out at 36 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and different dilution rates (D): 0.1, 0.2 and 0.3 day^{-1} .

Fig. 3. Cell concentration of *A. platensis* during batch and semicontinuous cultures carried out at 72 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and different dilution rates (D): 0.1, 0.2 and 0.3 day^{-1} .

Fig. 4. Cell concentration of *A. platensis* during batch and semicontinuous cultures carried out at 108 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and different dilution rates (D): 0.1, 0.2 and 0.3 day^{-1} .

Table 1
Results of cell concentration and productivity obtained from semicontinuous cultivations of *A. platensis* carried out at different dilution rates and light intensities.

Run	Light intensity ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Dilution rate (day^{-1})	X_m or X_s (mg L^{-1})	Biomass productivity (P_x , $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)
Batch culture				
1	36	–	5200	562
2	72	–	5800	661
3	108	–	5900	913
Semicontinuous culture				
4	36	0.1	5313 $\pm$ 59	531 $\pm$ 5.9
5	72	0.1	5806 $\pm$ 74	581 $\pm$ 7.5
6	108	0.1	5772 $\pm$ 113	577 $\pm$ 11
7	36	0.2	4284 $\pm$ 64	857 $\pm$ 13
8	72	0.2	4839 $\pm$ 112	968 $\pm$ 22
9	108	0.2	5286 $\pm$ 82	1057 $\pm$ 16
10	36	0.3	3562 $\pm$ 75	1068 $\pm$ 23
11	72	0.3	3922 $\pm$ 100	1176 $\pm$ 30
12	108	0.3	4392 $\pm$ 83	1319 $\pm$ 25

tivity increase from 661 to 913 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (Table 1). Similar results were obtained by Danesi et al. (2004) using urea as a nitrogen source in the light intensity range of 2–5 klux. This behavior suggests that, at relatively high light intensity (108 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), cell growth was accelerated by the faster photosynthetic production of ATP and NADPH; but, when cell concentration reached 5800 mg L^{-1} , the growth stopped likely due to photosaturation or shadowing (Chojnacka and Noworyta, 2004; Hirata et al., 1998; Vonshak et al., 2000). Since the cell concentration in the saturation region depends on the light ability to penetrate the culture, the value of X_m obtained in this work is quite different from those reported for different reactor configurations such as long minitanks (1700 $\pm$ 41 mg L^{-1}) (Bezerra et al., 2008) and airlift-tubular photobioreactor (10,900 mg L^{-1}) (Converti et al., 2006).

The values of cell productivity either in batch (P_{XB}) or in semicontinuous operation (P_{XS}) are summarized in Table 1. Except for the cultures performed at the lowest dilution rate ($D = 0.1 \text{ day}^{-1}$), P_{XS} was higher than P_{XB} , because not only of the well-known elimination of any dead time typical of the batch process (Aiba et al., 1973), but also of the accumulation of any toxic metabolite and/or the depletion of some limiting micronutrient during batch growth (Fábregas et al., 1998). Additionally, in the semicontinuous cultures, a portion of cells is continuously removed, and the related increase in light availability to cell likely increased cell productivity.

As can be seen in Figs. 2–4, the semicontinuous process started at $D = 0.1 \text{ day}^{-1}$ and reached pseudo-steady-state conditions after about 6–8 days, at which cell concentration (X_s) was strongly dependent on the light intensity; after 20 days, i.e. a time equivalent to twice the residence time, the dilution rate was increased to 0.2 day^{-1} , and the cell concentration decreased until a new steady-state was attained. After additional 10 days, D was further increased up to 0.30 day^{-1} following the same criterion. Pseudo-steady-state conditions were obtained at all dilution rates and light intensities, thus demonstrating an excellent ability of *A. platensis* to maintain stable conditions during at least two residence times. This result is quite promising taking into account that large productions of this cyanobacterium are usually performed by semicontinuous operation under pseudo-steady-state conditions.

In cultures performed at $D = 0.1 \text{ day}^{-1}$, an increase in light intensity from 36 to 72 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ led to a 9% raise in X_s , while an additional increase up to 108 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ did not influence this response, which reached an average value of 5789 mg L^{-1} (Table 1). As expected by the well-known mass balances in continuous bioprocesses (Aiba et al., 1973), the highest

biomass concentration's were obtained at the lowest dilution rate ($D = 0.1 \text{ day}^{-1}$) at all light intensities studied. Nevertheless, under these conditions, lower values of productivity (P_{XS}) were obtained.

In cultures performed at $D = 0.2$ and 0.3 day^{-1} , X_s increased by around 23% when the incident irradiance was raised from 36 to 108 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. This result demonstrates that the cultures carried out at 36 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were light limited and suggests that every culture could have a cell density which is characteristic of a given illumination and a given dilution rate. Similarly, Molina Grima et al. (1996) observed in chemostat that high dilution rates must be supported by fast-growing cells, whose illumination requirements can only be met at low biomass concentrations, whereas low dilution rates give rise to cultures severely limited by self shading. In such a situation, if the irradiance supplied to the system is increased at a given dilution rate, the light availability inside the culture increases.

The values of X_s decreased with increasing D , while those of P_{XS} increased. Over the whole D range considered, the increase in light intensity from 36 to 108 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ led to a 20% increase in P_{XS} , confirming the influence of light intensity on cell growth. The highest productivity (1319 $\pm$ 25 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) was obtained in the culture carried out at $D = 0.3 \text{ day}^{-1}$ and 108 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Table 1). This value was comparable to that (1590 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) reported by Carlozzi (2003) for semicontinuous culture of *A. platensis* in tubular undulating row photobioreactor at $D = 0.318 \text{ day}^{-1}$ and higher than the one (400 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) reported by Travieso et al. (2001) for the same microorganism in helical tubular photobioreactor at $D = 0.18 \text{ day}^{-1}$. This comparison demonstrates the potential of *A. platensis* to grow quickly in helioidal photobioreactor in semicontinuous cultivation.

Taking into account that there are conditions under which the cell growth can be limited by a nutrient or light intensity (Healey, 1985), the following Monod-type empirical model was applied to the experimental data of productivity with the aim of demonstrating the relationship existing between this response and the product of light intensity and dilution rate (ID):

$$P_x = \frac{P_{X\text{MAX}}ID}{K_{ID} + ID} \quad (3)$$

where, $P_{X\text{MAX}}$ is the maximum cell productivity and K_{ID} the half-saturation constant related to ID.

As can be seen in Fig. 5, the linear Lineweaver–Burk approach applied to the results of Table 1 provided a good fit between $1/P_x$ versus $1/ID$, being the best regression ($r^2 = 0.81$) obtained without taking into account the run 6. The lack of adjustment when considering the run 6 was likely due to the fact that, at very low dilution rate ($D = 0.1 \text{ day}^{-1}$), the growth was strongly limited by

Fig. 5. Cell productivity (P_x) of the semicontinuous culture of *A. platensis* versus the product of light intensity and dilution rate (ID).

insufficient supply of any nutrient, and then no increase in cell productivity took place when I was increased from 72 to 108 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Table 1). The kinetic parameters estimated by Eq. (3) were $K_{ID} = 6.8 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{day}^{-1}$ and $P_{X \text{ MAX}} = 1471 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$. Because K_{ID} expresses the value of ID at which 50% of maximum cell productivity is obtained, it may become a guideline to regulate the values of the selected independent variables (I and D) according to the desired value of productivity. Any further productivity increase beyond the 1471 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ threshold would require excessively high increases in I or D , which could make the process unstable (washout in the case of excess D), or photoinhibited (in the case of excess I), and certainly unfeasible from the economic viewpoint.

These results put into evidence a peculiar feature of cyanobacterial cultures, whose pseudo-steady-state conditions could be modified, according to circumstances, by conveniently varying these two independent variables.

4. Conclusion

The semicontinuous mode of operation under pseudo-steady-state conditions was shown to be a feasible alternative way to perform *A. platensis* cultivation. The highest productivity ($1319 \pm 25 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) was obtained with the semicontinuous run carried out at dilution rate of 0.3 day^{-1} and light intensity of $108 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The cell productivity increased with the product of light intensity and dilution rate following a Monod-type equation, which suggests that pseudo-steady-state conditions could be modified varying one or other of the two independent variables to improve the industrial production of this cyanobacterium by semicontinuous operation.

Acknowledgements

The authors grateful acknowledge the financial support of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, Brazil, processes No. 06/54959-3 and 06/5679-2, of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, processes No. 3978/08-7 and 0350-11/2010, and of the Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR) (PRIN Prot. N. 200744HMBN and FIRB Prot. N. RBIP06993E).

References

Aiba, S., Humphrey, E., Millis, N.P., 1973. Biochemical Engineering, second ed. Academic Press, New York.

Belay, A., 2002. The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J. Am. Nutraceut. Assoc.* 5, 26–49.

Bezerra, R.P., Matsudo, M.C., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M., 2008. Influence of ammonium chloride feeding time and light intensity on the cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 297–305.

Brown, M.R., Garland, C.D., Jeffrey, S.W., Jameson, L.D., LeRoit, J.M., 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semicontinuous cultures of *Ischyrus*

sp. (clone T-ISO), *Parlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.* 5, 285–296.

Carlozzi, P., 2003. Dilution of solar radiation through “culture” lamination in photobioreactor rows facing south-north: a way to improve the efficiency of light utilization by cyanobacteria (*Arthrospira platensis*). *Biotechnol. Bioeng.* 81, 305–315.

Chojnacka, K., Noworyta, A., 2004. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic culture. *Enzyme Microb. Technol.* 34, 461–465.

Converti, A., Lodi, A., Del Borghi, A., Solisio, C., 2006. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined air lift-tubular reactor system. *Biochem. Eng. J.* 32, 13–18.

Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.O., Carvalho, J.C.M., Sato, S., 2004. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioeng.* 26, 329–335.

Fábregas, J., García, D., Morales, E., Domínguez, A., Otero, A., 1998. Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 477–481.

Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B.V., Abalde, J., 1985. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* kyllin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture* 48, 231–244.

Healey, F.P., 1985. Interacting effects of light and nutrient limitation on the growth rate of *Synechococcus linearis* (Cyanophyceae). *J. Phycol.* 21, 134–146.

Hirata, S., Taya, M., Tane, S., 1998. Continuous cultures of *Spirulina platensis* under photoautotrophic conditions with change in light intensity. *J. Chem. Eng. Jpn.* 31, 636–639.

Huang, T.K., Plesha, M.A., McDonald, K.A., 2010. Semicontinuous bioreactor production of a recombinant human therapeutic protein using a chemically inducible viral amplicon expression system in transgenic plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 106, 408–421.

Janssen, M., Trammer, J., Mur, L.R., Wijffels, R.H., 2003. Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnol. Bioeng.* 81, 193–210.

Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embiruca, M., Ghirardi, M.L., 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresour. Technol.* 101, 1406–1413.

LeDuy, A., Therien, N., 1977. An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue algae *Spirulina maxima*. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 1219–1224.

McCree, K.J., 1981. Photosynthetically active radiation. In: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. (Eds.), *Physiological Plant Ecology*. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, vol. 12A. Springer-Verlag, Berlin, pp. 41–55.

Molina Grima, E., Fernández, E.G.A., Camacho, F.G., Chisti, Y., 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer and scale-up. *J. Biotechnol.* 70, 231–247.

Molina Grima, E., Fernández Sevilla, J.M., Sánchez Pérez, J.A., García Camacho, F., 1996. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *J. Biotechnol.* 45, 59–69.

Sánchez-Luna, L.D., Bezerra, R.P., Matsudo, M.C., Sato, S., Converti, A., Carvalho, J.C.M., 2007. Influence of pH, temperature, and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: a kinetic and thermodynamic approach. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 702–711.

Schlösser, U.G., 1982. Sammlung von Algenkulturen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 95, 181–276.

Soletto, D., Braghi, L., Lodi, A., Carvalho, J.C.M., Converti, A., 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture* 243, 217–224.

Travieso, L., Hall, D.O., Rao, K.K., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., 2001. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. *Int. Biodeter. Biodegr.* 47, 151–155.

Tredici, M.R., Zittelli, G.C., 1988. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 57, 187–197.

Vonshak, A., Cheung, S.M., Chen, F., 2000. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) cells to light. *J. Phycol.* 36, 675–679.

Anexo 2

Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*.

Bioenergetic aspects

Raquel Pedrosa Bezerra^{a,b}, Marcelo Chuei Matsudo^a, Sunao Sato^a, Patrizia Perego^b, Attilio Converti^{b,c}, João Carlos Monteiro de Carvalho^{a,*}

^a *Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bl. 16, 05508-900 São Paulo-SP, Brazil*

^b *Department of Chemical and Process Engineering “G.B. Bonino”, University of Genoa, via Opera Pia 15, 16145 Genoa, Italy*

^c *CAPES Fellowship holder, Brazil*

*Author for correspondence: phone: +55-11-30913695; fax: +55-11-38156386;

E-mail: jcmdcarv@usp.br

ABSTRACT

The bioenergetics of the photoautotrophic growth of the cyanobacterium *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* was investigated in different bioreactor configurations (tubular photobioreactor and open ponds) using different nitrogen sources (nitrate and urea) and under different light intensity conditions. Although an increase in the light intensity increased the Gibbs energy dissipated for cell growth and maintenance in both nitrogen sources, it did not exert any appreciable influence on the moles of photons absorbed by the system to produce one C-mol biomass. On the other hand, both bioenergetic parameters were higher in cultures with nitrate than with urea, likely because of the higher energy requirements needed to reduce the former nitrogen source to ammonia. They appreciably increased also when open ponds were substituted by the tubular photobioreactor, where a more efficient light distribution ensured a remarkably higher cell mass concentration. The estimated percentages of the energy absorbed by the cell showed that, compared with nitrate, the use of urea as nitrogen source allowed the system to address higher energy fractions to ATP production and light fixation by the photosynthetic apparatus, as well as a lower fraction released as heat. Thanks to this better bioenergetic situation, urea appears to be a quite promising low-cost, alternative nitrogen source for *A. platensis* cultures in photobioreactors.

Keywords: *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*; bioenergetics; nitrogen source; light intensity; bioreactor configuration

1. Introduction

The production of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* is increasing due to its high content of highly-valuable proteins, fundamental amino acids, vitamins, β -carotene and other pigments, mineral substances, essential fatty acids and polysaccharides, which find application in several industrial productions like those of health foods and therapeutics [1].

Environmental factors, such as light intensity and nitrogen source, are well known to influence the growth of photosynthetic microorganism. In the absence of any other limiting factor, cell concentration increases with light intensity until reaching maximum biomass concentration that is denominated “saturation level”. Light intensities higher than the saturation level provoke damage of cell photosynthetic apparatus due to a phenomenon called “photooxidation” or “photoinhibition”.

The nitrogen source is an additional environmental factor influencing cell growth, because this element is mainly used to form proteins and nucleic acids. Alternative sources of nitrogen such as urea [2,3] and ammonium salts [4] have been investigated in substitution of nitrate to reduce the cost of large-scale *A. platensis* cultivation.

Also the reactor configuration can impact on cell growth. Appropriately-designed photobioreactors can in fact reduce the cultivation area by a vertical distribution of the photosynthetic organism and enlarge the surface exposed to light, thus increasing cell concentration. Tubular reactors allow for better light distribution and then higher photosynthetic efficiency with respect to the conventional mini-ponds [5,6], where the cells are subject to full light radiation at the surface and darkness at the bottom [7].

Only a few studies emphasized the bioenergetic aspects of the growth of photosynthetic microorganisms based on Gibbs energy balances. The Gibbs energy dissipation per C-mol of biomass can be regarded as a simple thermodynamic measure of the amount of biochemical “work” required to convert the carbon source into biomass by the proper irreversible carbon-carbon coupling and oxidation/reduction reactions [8]. Up to now,

the bioenergetics of the cyanobacterium *A. platensis* were uninvestigated either in bench-scale open ponds using urea and KNO_3 as nitrogen sources [9,10] or in rectangular vessel under different light intensities [11]. To shed further light on these aspects, in this study we investigated the bioenergetics of this cyanobacterium when cultivated in tubular photobioreactor, under different light intensities and using different nitrogen sources, and compared these results with those previously obtained in open ponds [9].

2. Material and methods

2.1. Photobioreactors and culture conditions

Arthrospira (Spirulina) platensis UTEX 1926 was cultivated either in open ponds [9] on the medium of Paoletti et al. [12] or in tubular photobioreactor [13] on the medium of Schlösser [14], both containing nitrate as nitrogen source. The initial cell concentration and pH were set at 400 mg l^{-1} [15] and 9.5 [16,17], respectively.

Open ponds cultivations were carried out elsewhere in the same medium of Paoletti et al. [12] at photosynthetic photon flux density (PPFD) of $72 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ [9]. On the other hand, for tubular photobioreactor cultivations we used the medium of Schlösser [14], as well as medium in which NaNO_3 was substituted by urea. These runs were carried out at $60 \leq \text{PPFD} \leq 240 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $29 \text{ } ^\circ\text{C}$, and the pH was controlled at 9.5 ± 0.2 by pure CO_2 addition. Since the operating conditions at the lowest PPFD values were very similar, any difference in the kinetics and bioenergetics was ascribed to the different bioreactor configurations. The amount of urea to be daily added was estimated by an equation describing the experimental growth curve obtained under non-limited conditions with NaNO_3 as nitrogen source, as previously described [13]. Under these conditions, the bioenergetics of the system was investigated comparing the different nitrogen sources.

2.2. Analytical determinations

The cell concentration of *A. platensis* was determined by measuring the optical density of cultures at 560 nm using a spectrophotometer, model 600 PLUS (FEMTO, São Paulo, Brazil).

The optical density data were converted to cell dry weight by a calibration curve. The elemental composition of biomass obtained at the end of each run was determined by an elemental analyzer Flash EA1112 series (CE Instruments, Wigan, UK).

Light intensity at the culture surface was measured using a quantum sensor, model LI-190 SB (Li-Cor Inc., Lincoln NE, USA), connected to a quantum/radiometer/photometer, model LI-189 B.

2.3. Theory

The Gibbs energy dissipation for cell growth and maintenance ($1/Y_{GX}$) was estimated according to Heijnen [18] by the equation (1):

$$\frac{1}{Y_{GX}} = \frac{1}{Y_{GX}^{\max}} + \frac{m_G}{\mu} \quad (1)$$

in which $Y_{GX}^{\max}$ is the maximum biomass yield on Gibbs energy that corresponds to 986 C-mol_X. kJ⁻¹ in photoautotrophic cultivation with CO₂ as a carbon source [18].

In this equation, the specific growth rate, μ , was defined according to Leduy and Zajic [19] as:

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{X_i}{X_{i-1}}$$

(2)

where X_i and X_{i-1} are the biomass concentrations at the end and the beginning of the time interval elapsing between two consecutive measurements ($\Delta t = 1$ day), while m_G is the biomass specific rate of Gibbs energy dissipation for maintenance, corresponding to 4.5 and 7.12 kJ C-mol $_X^{-1}$ · h $^{-1}$ at 25 and 29 °C, respectively [18].

To estimate the moles of photons (Einsteins) to sustain the autotrophic growth, n_{Ph} , it was necessary to resort to the Gibbs energy balance, taking into account the energy contributions for the growth, $1/Y_{GX}$, and the absorption of 1 Einstein of photons, Δg_{Ph} , in addition to those of formation of substrates and products, Δg_{fi} , as described by the equation:

$$\Delta g_{fHCO_3^-} + \Delta g_{fN} + \Delta g_{fH_2O} + \Delta g_{fO_2} + \Delta g_{fH}^+ + \Delta g_{fX} + 1/Y_{GX} + n_{Ph} \Delta g_{Ph} = 0$$

(3)

The value of $\Delta g_{Ph} = 206.2$ kJ mol $^{-1}$ was estimated through the equation:

$$\Delta g_{Ph} = \frac{hcN_A}{\lambda}$$

(4)

being $h = 6.626 \cdot 10^{-34}$ J the Planck constant, $c = 2.99 \cdot 10^8$ m s $^{-1}$ the light velocity, $N_A = 6.022 \cdot 10^{23}$ photons Einstein $^{-1}$ the Avogadro number and $\lambda = 580$ nm the wavelength of absorbed photons [9].

According to Torre et al. [9], 2 photons at 580 nm are absorbed by the second photosystem (PSII) and used to transfer 2 electrons to the first one (PSI), releasing two photons with less energy. Therefore, knowing n_{ph} , we estimated the total molar Gibbs energy absorbed by the photosynthesis ($-\Delta G_a$):

$$\Delta G_a = n_{ph} \Delta g_{ph}$$

(5)

According to Torre et al. [9], the molar O_2 production (q_{O_2}) and H^+ consumption (q_{H^+}) were calculated by multiplying their respective stoichiometric coefficients by the cell concentration, expressed in C-mol l^{-1} using the experimental biomass elemental composition.

$-\Delta G_a$ was assumed to be the sum of the energy fixed by the system to increase its own enthalpic content (ΔH), that transformed into ATP and used for the growth and maintenance (ΔG_{ATP}) and the released heat (Q):

$$\Delta G_a + \Delta G_{ATP} + \Delta H + Q = 0$$

(6)

where ΔG_{ATP} and ΔH were calculated from n_{ph} , the Gibbs energy associated to 1 ATP mol and the average potential variation between PSI and PSII [9].

3. Results and discussion

Fig. 1 shows the growth curves of *A. platensis* using nitrate (A) or urea (B) as nitrogen sources, in open ponds [9,10] or in tubular photobioreactor, at different PPFD values. A

progressive increase in PPFD up to $240 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ favored the growth of this cyanobacterium, and a maximum cell concentration of about 3500 mg l^{-1} was obtained, almost irrespectively of the nitrogen source. These results suggest that the light intensity was the factor limiting the growth under the selected conditions, while ongoing experiments (results not shown) point out that photosaturation takes place at $\text{PPFD} \geq 240 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Such a maximum PPFD threshold is higher than those reported for Erlenmeyer flasks ($100\text{-}150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) [21], rectangular photobioreactor ($138\text{-}229 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) [22] and long open ponds ($156 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) [23]. Moreover, even at PPFD of only $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 1), the final cell concentration was more than twice that previously obtained in open pond under similar experimental conditions (25°C , $72 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) [10], which suggests a better light distribution in the tubular photobioreactor.

Fig. 2 illustrates the behavior of Gibbs energy dissipation for cell growth and maintenance, $1/Y_{GX}$, versus the time. As a general rule, this bioenergetic parameter increased with the time under all the tested conditions, as a result of the increasing biomass level that was responsible for a decrease in the specific growth rate. An increase in PPFD up to $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ favored cell growth because of photolimitation; therefore, the energy requirements mainly for maintenance remarkably increased. On the contrary, none (urea) or very little (nitrate) increase in $1/Y_{GX}$ took place in the PPFD range of $120\text{-}240 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, because of the achievement of light saturation conditions. This behavior is also consistent with lower $1/Y_{GX}$ values previously observed in open ponds [9], where the well-known shadowing effect [24] hindered the growth.

The photoautotrophic growth can be represented by an overall mass balance equation, where the nitrogen (NO_3^- or NH_4^+) and carbon (HCO_3^-) sources, H_2O , O_2 , SO_4^{2-} and H^+ are involved in the formation of 1 C-mol biomass:

$$a \text{HCO}_3^- + b \text{NO}_3^- \text{ (or } \text{NH}_4^+) + c \text{H}_2\text{O} + d \text{O}_2 + e \text{H}^+ + f \text{SO}_4^{2-} + \text{CH}_{1.650}\text{O}_{0.531}\text{N}_{0.170}\text{S}_{0.0007} = 0$$

(7)

To this purpose, we used either the elemental composition of biomass reported by Cornet et al. [25], utilized here as an example, or those experimentally determined as described in Material and methods.

To make these redox reactions between electron acceptor and donor possible, the Gibbs energy is used by the cell to enable the construction of the complex biomass molecules from the inorganic carbon source. The respective stoichiometric coefficients estimated through material balances of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur, charge and reduction degree are listed in Table 1. It should be noticed that the reduction degree of biomass (γ_X), calculated from biomass composition experimentally determined in this work, was always appreciably higher with nitrate (4.89-5.19) than with urea (3.99-4.32), as expected by the higher oxidation number of the former compound [18]. In addition, both this parameter and the nitrogen stoichiometric coefficient were appreciably lower when using the elemental composition experimentally determined in this work (Table 1), because the nitrogen content of biomass under the selected conditions was always lower than that reported by Cornet et al. [25].

The moles of photons (Einsteins) to sustain the autotrophic growth of 1 C-mol biomass (n_{ph}) were calculated by Eq. (3). Although the actual Δg_{fi} values should have been used for this calculation, Torre et al. [9] demonstrated that the Gibbs energy of formation under the actual variable conditions of a cultivation does not differ at all or differs by no more than 3% from that estimated under standard biological conditions. On the contrary, Δg_{fH^+} is by definition a function of the pH. So, this parameter was recalculated for the actual conditions by the well-known equation of Gibbs:

$$\Delta g_{f_{H^+}} = \Delta g_{f_{H^+}} + RT \ln \left[\frac{10^{-pH}}{10^{-7}} \right] \quad (8)$$

As shown in Fig. 3, the progressive decrease in the specific growth rate throughout the cultivations brought about a corresponding increase (in absolute value) in the Einsteins absorbed to produce one C-mol biomass (n_{ph}). As expected, at the highest growth rates, this parameter approached theoretical values very close to that reported by Richmond [26] to sustain growth under ideal conditions (only 8 effective Einsteins C-mol_{DM}⁻¹).

During the light reactions of photosynthesis, the free energy carried by photons is in fact captured by pigments (ex., chlorophyll) held in large protein complexes called “reaction centers”. When a special chlorophyll molecule of PSII absorbs the energy of a photon ($h\nu$), an electron gains higher energy level. Because this state of an electron is very unstable, it is transferred from one to another molecule creating a chain of redox reactions, referred to as Electron Transport Chain (ETC). The electron flow goes from PSII to cytochrome b₆f of PSI, where the electron gets the energy from another photon. The final electron acceptor is NADP⁺, which produces NADPH. A minimum of 8 photons is then required to transfer 4 electrons from 2 H₂O molecules to produce 2 NADPH molecules, according to the equation:

Subsequently, the electrons are transferred from NADPH to CO₂ through the Calvin cycle to produce biomass constituents [27].

As already observed in previous work [9], the additional energy requirement with respect to the ideal situation of 8 effective Einsteins C-mol_{DM}⁻¹ is negligible at the beginning

of cultivations (high specific growth rates) and then considerably increases during the stationary phase. This suggests that, under conditions likely limited by shadowing, biomass uses energy preferentially for maintenance rather than for growth. Although the behavior of n_{Ph} was qualitatively similar for cultivations performed in open ponds and in tubular photobioreactor (Fig. 3), the excess light requirements in the latter configuration were certainly due to the higher levels of biomass ensured by more effective distribution. As expected, a progressive increase in the light intensity did not exert any appreciable influence on this n_{Ph} (Einstein C-mol_{DM}⁻¹).

In addition, the cultures with nitrate needed highest n_{Ph} values to sustain the autotrophic growth compared to those with urea, even though the cell concentration was similar at all the PPFD values (Fig. 1). Thus, the additional photon requirement was likely utilized to reduce nitrate to ammonia [28], which is the preferential nitrogen form assimilated by *A. platensis* [29]. This effect was also observed by Torre et al. [9] in open ponds. It should also be noticed that the use, in the above bioenergetic model, of the coefficients reported by Cornet et al. [25] for *A. platensis* biomass composition (CH_{1.650}O_{0.531}N_{0.170}S_{0.0007}) led to results practically coincident to those obtained using the experimental ones determined in this work (Fig. 3). This observation demonstrates that biomass composition has a negligible impact on the predictions by the model, and then it could be used as a general tool to elaborate data from the literature without any determination of biomass composition.

Fig. 4 shows the time behaviors of molar development of O₂ and consumption of H⁺ during the cultivations performed either in open pond or in the tubular photobioreactor at variable PPFD. These trends clearly demonstrate that both activities faithfully followed cell growth, being biomass the final product of the photosynthetic metabolism, and were lower in the open pond compared with the tubular photobioreactor, consistently with the better light distribution in the latter reactor configuration. Moreover, their progressive increase with PPFD confirms that the light intensity was the factor actually limiting the growth and that the

system never reached photoinhibition conditions. This behavior was qualitatively similar in the cultures using nitrate as nitrogen source (data not shown). As expected by the above-mentioned need of reducing nitrate to ammonia, as an obligatory intermediate to utilize any nitrogen source [30], both parameters were higher using nitrate than urea.

As is well known, the energy from flow of electrons between PSII and NADPH drives protons across the plasma membrane, creating a proton-motive force that provides the energy for ATP synthesis by ATP synthase [31]. Therefore, it was assumed that a portion of molar Gibbs energy absorbed by the two photosystems was used to convert ADP to ATP. As shown in Fig. 5, the highest $-\Delta G_a$ and ΔG_{ATP} values were obtained at end of cultivation, due to unfavorable environmental conditions such as the lack of nutrients or release of cell metabolites. As far as the influence of light intensity is concerned, the highest energy requirements were observed for cultures performed at PPFD up to $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, which ensured the highest cell concentration (Fig. 1). As previously mentioned, the $-\Delta G_a$ and ΔG_{ATP} values did not increase (urea) or increased very little (nitrate) in the PPFD range of $120 - 240 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, because of light saturation conditions. A qualitatively similar behavior was observed for cultures using nitrate in tubular photobioreactor (results not shown). Moreover, at the lowest PPFD values, both parameters showed similar behaviors in open pond and in tubular photobioreactor, which means that the reactor configuration had negligible influence on them.

Fig. 6 shows the results of the energy fixed by photosynthesis ($-\Delta H$) and that released as heat (Q) under different conditions of light intensity, nitrogen source and reactor configuration. It can be seen that, at the end of cultivations, both parameters increased with light intensity. Almost coincident results were also obtained using nitrate as nitrogen source (results not shown). As is well known, under excess light conditions, part of the absorbed energy is thermally dissipated via a mechanism called Non-Photochemical Quenching (NPQ) [32], and a significant quantity of free energy is lost as heat during the biochemical reactions

between light absorption and carbohydrate formation [33]. Such a result has been ascribed to a certain physiological mechanism to protect the photosynthetic apparatus against photodestruction [34,35], where a fundamental role is played by the antenna complexes of photosynthetic apparatus, which would switch from a light harvesting form to an efficient thermal dissipation form [32].

As expected by the fact that both the ATP synthesis and the formation of NADPH implied in the biosynthetic pathways are resulting from the activity of the same photosynthetic apparatus [33], the ΔH behavior was quite similar to that observed for ΔG_{ATP} .

Fig. 7 shows the percentage distribution of the light energy absorbed versus time at the lowest PPFD chosen as an example, but qualitatively similar results were observed at higher PPFD values. As expected by the additional energy requirements of nitrate-to-ammonia reduction, cultures with urea, compared with those with nitrate, exhibited higher energy fractions stored as ATP (η_{ATP}) and fixed by the system to increase its enthalpic content (η_{F}) and lower fraction released as heat (η_{Q}). Moreover, in all the experiments, both η_{ATP} and η_{F} decreased along the time, whereas η_{Q} increased.

The highest η_{ATP} and η_{F} values were around 12% and 23–27% in cultures with nitrate and 15% and 31–34% in those with urea, respectively. In cultures performed at the highest PPFD values (120 and 240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), η_{F} decreased more sharply than at the lowest ones (results not shown) because of the highest cell concentrations (Fig. 1) that reduced the light availability to the cell (shading effect). The nutrient availability is another important environmental factor influencing the composition of cyanobacterial photosynthetic apparatus. Murakami et al. [36] have shown that the responses to CO_2 , Na^+ and light stresses in *Synechocystis* sp. cause alterations in the redox state of intersystem electron transport components. Likewise, the decrease in the availability of some nutrient at the end of our *A. platensis* cultivations may have contributed to lower η_{F} . As expected, η_{Q} showed an opposite behavior, progressively increasing from minimum values at the beginning of cultures (60-

66% with nitrate and 49-54% with urea) to around 90% at the end. This means that at the end of any cultivation most of the energy absorbed is released as heat.

Similar behaviors were observed using either open ponds with nitrate or the tubular photobioreactor with both nitrogen sources, which means that the energy distribution was not appreciably influenced by the reactor configuration.

4. Conclusions

The results of the current study indicate that the bioenergetic parameters of the blue-green cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis* were influenced by bioreactor configuration, nitrogen source and photosynthetic photon flux density (PPFD). In particular, the highest values of the Gibbs energy dissipation for cell growth and maintenance were obtained at 120-240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, irrespective of the selected nitrogen source, while the number of photons moles absorbed by the cell to produce one C-mol biomass was higher in the cultures with nitrate, irrespective of light intensity. The highest values of the molar production of O_2 and consumption of H^+ were obtained at the highest PPFD values, using nitrate as a nitrogen source and the tubular photobioreactor. Contrarily, the bioreactor configuration did not exert any appreciable influence on the fractions of the absorbed energy addressed to the synthesis of ATP, fixed by the cell and released as heat. The first two fractions were higher in cultures performed with urea, which proved a nitrogen source able to energetically sustain *A. platensis* growth.

Acknowledgements

The authors grateful acknowledge the financial support of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, Brazil, (process no. 06/54959-3 and

06/56976-2), of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, (process no. 3978/08-7 and Prof. A. Converti Fellowship, no. 0350-11/2010), of the Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR) (PRIN Prot.N. 200744HMBN and FIRB Prot. N. RBIP06993E) and of the Vigoni Program (Deutsch-Italienisches Hochschulzentrum)

REFERENCES

- [1] Blinkova LP, Gorobets OB, Baturo AP. Biological activity of *Spirulina*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2001;2:114-8.
- [2] Danesi EDG, Rangel-Yagui CO, Carvalho JCM, Sato S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. Biomass Bioenerg 2002;23:261-9.
- [3] Matsudo MC, Bezerra RP, Sunao S, Perego P, Converti A, Carvalho JCM. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. Biochem Eng J 2009;43:52–7.
- [4] Carvalho JCM, Francisco FR, Almeida KA, Sato S, Converti A. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rate. J Phycol 2004;40:589-97.
- [5] Converti A, Lodi A, Del Borghi A, Solisio C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. Biochem Eng J 2006;32:13–8.
- [6] Torzillo G, Pushparaj B, Bocci F, Balloni W, Materassi R, Florenzano G. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. Biomass 1986;11:61-74.
- [7] Bezerra RP, Matsudo MC, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Specific growth rate and photosynthetic efficiency of *Arthrospira platensis* cultivations at different times of ammonium chloride feeding and light intensities. In: XVII Simpósio Nacional de

Bioprocessos (ISBN 978-85-98130-02-8), August 02-05, 2009. Natal-RN, Brazil, Section P6, n. 81.

[8] Heijnen JJ, Van Dijken JP. In search of a thermodynamic description of biomass yields for the chemotrophic growth of microorganisms. *Biotechnol Bioeng* 1991;39:833-58.

[9] Torre P, Sassano CEN, Sato S, Converti A, Gioielli, LA, Carvalho JCM. Fed-batch addition of urea for *Spirulina platensis* cultivation. Thermodynamics and material and energy balances. *Enzyme Microb Technol* 2003;33:698–707.

[10] Sassano CEN, Carvalho JCM, Gioielli LA, Sato S, Torre P, Converti A. Kinetics and bioenergetics of *Spirulina platensis* cultivation by fed-batch addition of urea as nitrogen source. *Appl Biochem Biotechnol* 2004;112:143–50.

[11] Lee HY, Erickson LE, Yang SS. Kinetics and bioenergetics of light-limited photoautotrophic growth of *Spirulina platensis*. *Biotechnol Bioeng* 1987;29:832–43.

[12] Paoletti C, Pushparaj B, Tomaselli L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. *Atti XVII Congr. Naz. Soc. Ital. Microbiol*, vol. 2, Italian Society of Microbiology, Padova, 1975. p. 833–9.

- [13] Ferreira LS, Rodrigues MS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Fed-Batch supply of ammonium sulphate in *Arthrospira platensis* cultivation in tubular photobioreactor. *Biotechnol Progr*, in stamp.
- [14] Schlösser UG. Sammlung von Algenkulturen. *Ber Deutsch Bot Ges* 1982;95:181–276.
- [15] Soletto D, Binaghi L, Lodi A, Carvalho JCM, Converti A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture* 2005;243:217–24.
- [16] Sánchez-Luna LD, Bezerra RP, Matsudo MC, Sato S, Converti A, Carvalho JCM. Influence of pH, temperature, and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: a kinetic and thermodynamic approach. *Biotechnol Bioeng* 2007;96:702–11.
- [17] Tredici MR, Zittelli CG. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnol Bioeng* 1998;57:187–97.
- [18] Heijnen JJ. Stoichiometry and kinetics of microbial growth from a thermodynamic perspective. In: Ratledge C, Kristiansen B, editors. *Basic biotechnology*, Cambridge: Cambridge University Press; 2001, p. 45–58.
- [19] Leduy A, Zajic JE. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point applied to growth and product formation. *Biotechnol Bioeng* 1973;25:805–10.
- [20] Zhang H, Whitelegge JP, Cramer WA. Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b6f complex. *J Biol Chem* 2001;276(41):38159–65.
- [21] Vonshak A, Cheung SM, Chen F. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) cells to light. *J Phycol* 2000;6:675–9.
- [22] Chojnacka K, Noworyta A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme Microb Technol* 2004;34:461–5.

- [23] Bezerra RP, Matsudo MC, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Influence of ammonium chloride feeding time and light intensity on the cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis* Biotechnol Bioeng 2008;100:297-305.
- [24] Danesi EDG, Rangel-Yagui CO, Carvalho JCM, Sato S. Effect of reducing the light intensity in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. Biomass Bioenerg, 2004;26:329-35.
- [25] Cornet JF, Dussap, CG, Cluzel P, Dubertret G. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. Biotechnol Bioeng 1992;40:826–34.
- [26] Richmond A. Phototrophic microalgae. In: Rehm HJ, Reed G, editors. Biotechnology, vol. 3. Dellweg H, vol. editor, Weinheim, Germany: Verlag Chemie; 1983, p. 109–43.
- [27] Raven JA, Kibler JE, Beardall J. Put out the light, and then put out the light. J Mar Biol Assoc UK 2000;80:1-25.
- [28] Hatori A, Myers J. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. Part I. Reduction of nitrite to ammonia. J Plant Physiol 1966;41:1031-36.
- [29] Boussiba S, Resch CM, Gibson J. Ammonia uptake and retention in some cyanobacteria. Arch Microbiol 1984;138:287-92.
- [30] Boussiba, S. Ammonium assimilation and its biotechnological aspects in cyanobacteria. In: Rai, AK, editor. Cyanobacterial nitrogen metabolism and environmental biotechnology, New Delhi: Narosa Publishing House; 1997, p. 36-72.
- [31] Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of biochemistry. 4th ed. New York: Worth Publishers; 2004.
- [32] Mozzo M, Passarini F, Bassi R, Amerongen H, Croce R. Photoprotection in higher plants: the putative quenching site is conserved in all outer light-harvesting complexes of Photosystem II. BBA-Bioenergetics 2008;1777(10):1263-7.

- [33] Hauska G, Arnald M. Energy transduction in the Z-scheme. In: Yunus M, Mohanty P, Pathre U, editors. Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation, Hardcover: Taylor & Francis; 2000, p. 108-26.
- [34] Karapetyan NV. Protective dissipation of excess absorbed energy by photosynthetic apparatus of cyanobacteria: role of antenna terminal emitters. *Photosynth Res* 2008;97:195–204.
- [35] Heber U, Bilger W, Shuvalov VA. Thermal energy dissipation in reaction centres and in the antenna of photosystem II protects desiccated poikilohydric mosses against photo-oxidation. *J Exp Bot* 2006;57:2993–3006.
- [36] Murakami A, Kim SJ, Fujita Y. Changes in photosystem stoichiometry in response to conditions for cell growth observed with the cyanophyte *Synechocystis* PCC 6714. *Plant Cell Physiol* 1997;38:392–7.

Caption of Figures

Fig. 1. Growth of *A. platensis* using nitrate (A) and urea (B) as nitrogen sources at different PPFD values ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Tubular photobioreactor: (■) 60; (▲) 120 and (◆) 240. Open ponds [10]: 72 (×).

Fig. 2. Dependence of Gibbs energy dissipation for *A. platensis* growth and maintenance ($1/Y_{GX}$) on PPFD ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Tubular photobioreactor: (□, ■) 60, (△, ▲) 120, (◇, ◆) 240. Open ponds [10]: 72 (×). Nitrogen source: nitrate (open symbols or ×), urea (full symbols).

Fig. 3. Influence of *A. platensis* specific growth rate (μ) on the moles of photons absorbed to produce one C-mol biomass (n_{Ph}) under different culture conditions. Tubular photobioreactor: (○) elemental biomass composition reported by Cornet et al. [25], PPFD = 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; elemental biomass composition experimentally determined in this work, PPFD ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$): (□, ■) 60, (△, ▲) 120, (◇, ◆) 240. (×) Open ponds [10]: elemental biomass composition reported by Cornet et al. [25], PPFD = 72 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Nitrogen source: nitrate (open symbols or ×), urea (full symbols).

Fig. 4. Time behaviors of molar development of O_2 (full symbols) and consumption of H^+ (open symbols) under different culture conditions. Tubular photobioreactor, PPFD ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$): (□, ■) 60, (△, ▲) 120, (◇, ◆) 240. Open ponds [10], PPFD = 72 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (●, ○). Nitrogen source: nitrate (dashed line), urea (continuous lines).

Fig. 5. Total Gibbs energy absorbed by the photosynthetic apparatus (full symbols) ($-\Delta G_a$) and energy transformed into ATP (open symbols) (ΔG_{ATP}) during *A. platensis* cultivations.

Tubular photobioreactor with urea, PPFD ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$): ($\square, \blacksquare$) 60, ($\blacktriangle, \triangle$) 120, ($\diamond, \blacklozenge$) 240. Open ponds with nitrate [10], PPFD = $72 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\bullet, \circ$).

Fig. 6. Energy fixed by the photosynthetic apparatus (full symbols) ($-\Delta H$) and energy released as heat (open symbols) (Q) during *A. platensis* cultivations. Tubular photobioreactor with urea, PPFD ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$): ($\square, \blacksquare$) 60, ($\blacktriangle, \triangle$) 120, ($\diamond, \blacklozenge$) 240. Open ponds with nitrate [10], PPFD = $72 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\bullet, \circ$).

Fig. 7. Percentage distribution of the light energy absorbed during *A. platensis* cultivations using nitrate (full symbols) and urea (open symbols) as nitrogen sources. Tubular photobioreactor, PPFD = $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (continuous lines). Open ponds [10], PPFD = $72 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (dashed lines). Energy fixed by the photosynthesis ($\diamond, \blacklozenge$), energy transformed into ATP ($\square, \blacksquare$), energy released as heat ($\blacktriangle, \triangle$).

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

Table 1. Stoichiometric coefficients estimated through material balances of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur, charge and reduction degree for biomass cultivated either in open ponds or in tubular photobioreactor, using nitrate or urea as nitrogen sources.

		HCO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺ ^a	H ₂ O	O ₂	H ⁺	SO ₄ ⁻²	Biomass
	Δg_{r_i} (kJ mol ⁻¹)	-587.2	-111.4	-79.4	-237.3	0	-39.9	-744.6	-67.0
Stoichiometric coefficients (mol C-mol _{DM} ⁻¹)									
Run	PPFD (μ mol photons m ⁻² s ⁻¹)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	γ_X^b
1 ^c	72	-1	-0.20	-	0.20	1.45	-1.20	-	5.80
2 ^d	60	-1	-0.20	-	0.20	1.45	-1.20	-	5.80
2 ^e	60	-1	-0.11	-	0.32	1.30	-1.11	0.00	5.19
3 ^e	60	-1	-	-0.07	0.24	1.00	-0.93	0.00	3.99
4 ^e	120	-1	-0.11	-	0.23	1.22	-1.11	0.00	4.89
5 ^e	120	-1	-	-0.08	0.42	1.03	-0.92	0.00	4.11
6 ^e	240	-1	-0.10	-	0.23	1.27	-1.10	0.00	5.09
7 ^e	240	-1	-	-0.08	0.34	1.08	-0.92	0.00	4.32

^a NH₄⁺ is the result of urea hydrolysis.

^b Reduction degree of biomass.

^c Minipond, considering the elemental biomass composition reported by Cornet et al [25].

^d Tubular photobioreactor, considering the elemental biomass composition reported by Cornet et al [25].

^e Tubular photobioreactor, elemental biomass composition experimentally determined.

Anexo 3

Carbon dioxide from alcoholic fermentation as a carbon source for the fed-batch cultivation of *Arthrospira platensis*

Raquel Pedrosa Bezerra^{a,b}, Marcelo Chuei Matsudo^a, Sunao Sato^a, Attilio Converti^{b,c}, João Carlos Monteiro de Carvalho^{a,*}

^a *Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bl. 16, 05508-900 São Paulo-SP, Brazil*

^b *Department of Chemical and Process Engineering “G.B. Bonino”, University of Genoa, via Opera Pia 15, 16145 Genoa, Italy*

^c *CAPES Fellowship holder, Brazil*

*Author for correspondence: phone: +55-11-30913695; fax: +55-11-38156386;

E-mail: jcmdcarv@usp.br

Abstract

It was evaluated the *Arthrospira platensis* cultivation using CO₂ from alcoholic fermentation and either urea or nitrate as nitrogen source at different light intensities ($60 \leq I \leq 240 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Whereas the CO₂ source (pure CO₂ or from alcoholic fermentation) did not influence the maximum cell concentration (X_m), cell productivity (P_X) and nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$), the use of urea instead of nitrate led to higher $Y_{X/N}$ values. X_m and P_X increased when I was increased from 60 to 120-240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Using CO₂ from alcoholic fermentation, the best performance ($X_m = 2952 \pm 35 \text{ mg L}^{-1}$, $P_X = 425 \pm 5.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and $Y_{X/N} = 15 \pm 0.20 \text{ mg mg}^{-1}$) was obtained at $I = 120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ with urea. The results obtained in this work demonstrate that urea and CO₂ from alcoholic fermentation could be simultaneously used in large-scale cultivations to reduce the environmental impact associated to the release of this greenhouse gas as well as the production cost of cyanobacteria.

Keywords:

Arthrospira (Spirulina) platensis; CO₂; alcoholic fermentation; fed-batch cultivation; urea; light intensity.

1 Introduction

Renewable energy sources such as ethanol have been seen as a promising alternative to fossil fuel consumption, providing environmental benefits by reduction in greenhouse gas emissions, and the national security benefits by less dependency on volatile crude oil imports (Tyner and Taheripour, 2007). Brazil is the world's largest exporter of bioethanol and second-largest producer after the United States (Balat and Balat, 2009). Considering the increasing demand for this fuel and the fact that alcoholic fermentation is responsible for a CO₂ release,

on weight basis, almost coincident with ethanol production, it would be of great concern developing a process for CO₂ fixation able to turn it into a useful product. Photosynthetic microorganisms can fix CO₂ efficiently from different sources, including the atmosphere, industrial exhaust gases, and soluble carbonate salts (Wang et al., 2008). Moreover, CO₂ biofixation by microalgae leads to higher yield of biomass per hectare in comparison with terrestrial plants (Packer, 2009). It has been shown that the cost of CO₂ in large-scale algal cultures is of primary importance to the total economics (Tapie and Bernard, 1988). Since 45–50% of the dry algal mass is made up of carbon (Cornet et al., 1992), 1.65– 1.83 g CO₂ would theoretically be needed for the biosynthesis of 1 g (DW) of algal biomass. Thus, CO₂ biofixation by microalgae has the potential not only to offset carbon emissions, but also to reduce the costs of culture media on an industrial scale (Hughes and Benemann, 1997). Combination of CO₂ fixation and production of biomass containing high-value bioactive products may provide a very promising alternative to current CO₂ mitigation strategies.

Nowadays, there are numerous commercial applications of *A. platensis* such as the enhancement of the nutritional value of foods and animal feed, feed in aquaculture, bioremediation, use in cosmetics and others applications (Spolaore et al., 2006). Besides the CO₂ source, the nitrogen source is an additional important factor in the cultivation of photosynthetic microorganisms, since this element is used mainly to provide proteins and nucleic acids, which are essential for cell maintenance and growth (Watanabe and Hall, 1996). Salts of nitrate are largely used as nitrogen source for *A. platensis* culture, but urea (Danesi et al., 2004) and ammonium salts (Bezerra et al., 2008) have recently been proposed as alternative, cheap nitrogen sources.

Compared to open ponds, appropriately designed closed photobioreactors are able to minimize the loss of ammonia nitrogen sources by off gassing, reducing the amount of this nutrient necessary in a large-scale process. Additionally, these reactors can reduce the

cultivation area by distributing the photosynthetic organisms vertically and increase the CO₂ residence time, thereby improving its utilization efficiency (Ono and Cuello, 2004).

The aim of this study was to check if the combined use of CO₂ released from alcoholic fermentation and urea in tubular photobioreactor could be a feasible and cheap alternative way to cultivate *A. platensis*. For this purpose, fed-batch cultivations were carried out at variable light intensity using two different sources either of nitrogen (sodium nitrate or urea) or of carbon (pure CO₂ from cylinder or gaseous emissions from alcoholic fermentation), the latter to simultaneously control the pH and maintain the desired carbon level. The results obtained were finally compared by means of analysis of variance to identify the statistically significant effects of the above independent variables (light intensity, nitrogen source and carbon source) on the selected responses, namely the maximum cell concentration, cell productivity and nitrogen-to-cell conversion factor.

2 Materials and methods

2.1 Microorganism and culture medium

Arthrospira (Spirulina) platensis UTEX 1926 was maintained in the culture medium of Schlösser (1982) having the following composition (per liter): 13.6 g NaHCO₃, 4.03 g Na₂CO₃, 0.50 g K₂HPO₄, 2.50 g NaNO₃, 1.00 g K₂SO₄, 1.00 g NaCl, 0.20 g MgSO₄·7H₂O, 0.04 g CaCl₂·2H₂O. All the nutrients were dissolved in distilled water containing (per liter): 6.0 mL of metal solution (97.0 mg FeCl₃·6H₂O, 41.0 mg MnCl₂·4H₂O, 5.0 mg ZnCl₂, 2.0 mg, CoCl₂·6H₂O, 4.0 mg Na₂MoO₄·2H₂O), 1.0 mL of micronutrient solution (50.0 mg Na₂EDTA, 618 mg H₃BO₃, 19.6 mg CuSO₄·5H₂O, 44.0 mg ZnSO₄·7H₂O, 20.0 mg CoCl₂·6H₂O, 12.6 mg MnCl₂·4 H₂O, 12.6 mg Na₂MoO₄ ·2H₂O) and 1.0 mL 1.5 g L⁻¹ B₁₂ vitamin solution.

Fed-batch runs were carried out either using the above medium containing NaNO₃ as the nitrogen source or after substituting in it NaNO₃ with urea.

2.2 Cultivation

The bench-scale tubular photobioreactor (Fig. 1) utilized in this study was developed at the Fermentation Technology Laboratory of the Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology of São Paulo University (Ferreira et al., 2010). It was made up of transparent glass tubes (1.0 m length, 1.0 cm internal diameter, 0.5 cm wall thickness) with inclination of 2% (1.15°) to make the fluid flow easier. PVC tubes were used to connect the glass tubes. The reactor was illuminated by 20 W fluorescent lamps. Ambient air was injected at the bottom of the tubes to drive the liquid from the bottom to the top of the reactor. A degassing bottle provided with magnetic stirrer ensured efficient medium homogeneity. The total and illuminated volumes of the reactor were 3.50 and 2.12 L, respectively.

Cultivations were carried out with initial biomass concentration of 400 mg L⁻¹ (Ferreira et al., 2010) in tubular photobioreactor (PBR) and temperature of 29 °C. The pH was set and maintained at 9.5 ± 0.2 (Sánchez-Luna et al., 2007) by addition of pure CO₂ from cylinder or CO₂ from continuous alcoholic fermentation under steady-state conditions, using a pH controller (Mettler Toledo, Barueri, SP, Brazil) coupled to a solenoid valve. In experiments with NaNO₃, nitrate concentration was maintained above 1 g L⁻¹ (Faintuch, 1989) to avoid growth limitation by this nutrient. When urea was used as nitrogen source, its amount to be daily added was estimated as suggested by Ferreira et al. (2010). Briefly, from the curve of cell concentration versus time of each standard run with nitrate (Fig. 2), we obtained an interpolated curve described by a third order-polynomial equation. By derivation of this equation, it was possible to obtain the second order equation of cell productivity, and from that the equation expressing the amount of urea to be daily added to sustain the expected cell growth, taking into account that the dry mass of *A. platensis* contains about 7% of nitrogen (Bezerra et al., 2008). The light intensity, expressed as photosynthetic photon flux density (PPFD), was varied in the range of 60-240 μmol photons m⁻² s⁻¹. Table 1 show the

different conditions adopted in this work for cultivations. All experiments were carried out in duplicate.

2.2.1. *CO₂ sources*

Pure CO₂ of analytical grade (99.9%) was obtained from a cylinder (Oxylumen, São Paulo, SP, Brazil).

CO₂ from alcoholic fermentation was produced continuously by *Saccharomyces cerevisiae* CCT7150 (Fundação Tropical André Tosello Culture Collection, Campinas, SP, Brazil) cultivated in a glass bioreactor (Infors-HT, Bottmingen, Switzerland), containing 10 L of diluted sugarcane blackstrap molasses, at temperature of 30 ± 1 °C (Kock et al., 2000), impeller speed of 500 rpm and dilution rate of 0.025 h^{-1} . Sugar concentration in the feed, expressed as total reducing sugars (TRS), was 170 g L^{-1} (Guerreiro et al., 1997). Urea (0.5 g L^{-1}) was added to the mash. After adjustment of pH at 4.5-5.0 by addition of H₂SO₄, it was controlled at 4.5 ± 0.1 (Jones et al., 1981) by addition of 1.5 N NaOH solution. Penicillin (500 u.i L^{-1}) was added to prevent contamination (Carvalho et al., 2003). Continuous feeding was started after 12 h of batch fermentation.

2.3 Analytical techniques

2.3.1 *A. platensis cultivation*

Cell concentration was determined by optical density (OD) measurements at 560 nm using a calibration curve (Leduy and Therien, 1977). The liquid phase of the medium was used to determinate the concentrations of total carbonate (Pierce and Haenisch, 1948), nitrate (Vogel, 2002) and volatile organic compounds (Joslyn, 1970). The concentration of total ammonia was determined immediately before the daily addition of urea on cell-free medium samples, using a potentiometer and selective ammonia ion electrode, model 95-12 (Orion, Cambridge, MA, USA) (Leduy and Samson, 1982). The residual urea level was determined

by the same way, after previous hydrolysis with H_2SO_4 at 200 °C (Cezare, 1998). Incident photon flux density of photosynthetically active radiation (400-700 nm) was measured by means of an integrating quantum/radiometer/photometer, model LI-190 SB (Li-Cor, Lincoln, NE, USA), provided with a LI-190 SB quantum sensor cell.

2.3.2 Alcoholic fermentation

Cell concentration was measured by filtering 5.0 mL samples through Millipore membranes with 1.2 μm pore diameter, washing with 50 mL of distilled water and drying at 105-110 °C until constant weigh (Carvalho et al., 2003). The total reducing sugars (TRS) concentration was expressed as glucose and determined according to Somogy (1952) after acid hydrolysis of samples (Falcone et al., 1959).

Ethanol concentration was determined by the micro-dichromate method (Joslyn, 1970). The effluent gas was qualitatively analyzed by a gas chromatograph coupled to mass spectrometer, model GCMS-QP5050A (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with CP Sil PONA CB column (100 m x 0.25 mm x 0.5 μm). Helium was used as a carrier gas at flow rate of 1 mL min⁻¹. Samples (1 mL) were injected in the column at a split ratio of 1:100. Injector and detector temperatures were 200 and 250 °C, respectively. The column temperature was initially set at 40 °C and then increased at a rate of 2 °C min⁻¹ up to 100 °C and subsequently at 10 °C min⁻¹ up to 250 °C.

2.4 Calculation of *A. platensis* cultivation parameters

The cell productivity (P_X , mg L⁻¹ d⁻¹) was calculated by dividing the difference between maximum and initial cell concentration ($X_m - X_i$) by the cultivation time corresponding to X_m . The nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$, mg mg⁻¹) was calculated as the mass ratio of dried produced cells and nitrogen added.

2.4 Statistical analysis

Maximum cell concentration (X_m , mg L⁻¹), maximum cell productivity (P_X , mg L⁻¹ d⁻¹) and nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$, mg mg⁻¹) were evaluated by the analysis of variance (ANOVA, General Linear Model) and the Tukey test to compare the mean values at a significance level of 5% ($p < 0.05$) using the MINITAB 15 statistical software.

3 Results and discussion

3.1 Continuous alcoholic fermentation

The mean results of continuous alcoholic fermentation of blackstrap molasses under steady state conditions were the following: cell concentration of 6.09 ± 0.54 g_{DW} L⁻¹ (dry weight), TRS of 53.2 ± 5.67 g L⁻¹ and ethanol concentration of 55.3 ± 7.57 g L⁻¹, corresponding to a fermentation yield of 64%. Such a process yield was of the same order of magnitude as those previously obtained with the same carbon source (Carvalho et al., 2003) and ensured the release of a CO₂ flux suitable to maintain the pH of *A. platensis* culture at the desired value (9.5 ± 0.2).

3.2 Effects of carbon dioxide and nitrogen sources and light intensity on *A. platensis* growth

Figs. 2 to 4 show that the use of pure CO₂ or CO₂ from alcoholic fermentation led to almost coincident cell concentration profiles and X_m values, which points out no significant influence of the CO₂ source on *A. platensis* growth. These findings, which were confirmed by ANOVA ($p > 0.05$; Table 2), highlight the feasibility of using such a by-product from industrial bioethanol production as carbon source for cyanobacteria cultivation.

It is well known that, when bicarbonate is used for the photosynthetic growth of microalgae, there is a progressive release of OH⁻ in the medium (Goldman et al., 1982); thus,

the pH control is fundamental in processes leading to high cell concentrations. As stressed by Watanabe et al. (1995), high alkalinity ($\text{pH} > 11.0$) restricts the productivity in the air-lift photobioreactors using air not supplemented with CO_2 . In cultivations having high demand of carbon due to high cell concentrations, the addition of CO_2 can ensure, at the same time, control of pH and suited supply of the carbon source. This has been done in the present work, where the culture pH was maintained at 9.5 ± 0.2 (Sánchez-Luna et al., 2007) by addition of CO_2 either from a cylinder or from alcoholic fermentation, so that the CO_2 consumed by the microorganism was permanently replaced. Such a control also allowed maintaining the carbon source level along the cultivations at a value (around 12.08 g L^{-1} of total carbonate) practically coincident with that of the medium of Schlösser (1982), thus avoiding any carbon source limitation or accumulation and reducing its cost.

In experiments carried out with CO_2 from alcoholic fermentation, the analysis of effluent gas by headspace gas chromatography revealed it was mainly made up of CO_2 with only small contents of ethanol and acetaldehyde. Despite of this, it was not detected any appreciable concentration of organic volatile compounds in the medium, likely because this microorganism has the enzymes needed to metabolize ethanol or even due to their condensation in the pipe, and consequently no influence of these compounds on *A. platensis* growth was observed. In addition, the use of CO_2 from alcoholic fermentation did not lead to any precipitation of salts or flocculation like those observed by Ferraz et al. (1985) for *A. maxima* cultivations in open-ponds using a semi-synthetic medium constituted by malt and yeast extracts, peptone and sucrose.

As far as the influence of the nitrogen source on *A. platensis* growth is concerned, urea, a classical fertilizer, was chosen to substitute the conventional nitrogen sources (KNO_3 , NaNO_3) because of its low cost and because it has been recognized as a promising alternative nitrogen source in the cultivation of *A. platensis* (Danesi et al., 2004; Sassano et al., 2007).

For a given light intensity and CO₂ source, no significant difference in growth curves of cultivations carried out with nitrate (Fig. 2) or urea (Figs. 3 and 4) as nitrogen source was observed, and the X_m values obtained with both nitrogen sources were statistically coincident ($p > 0.05$, Table 2). These results point out the success of the approach of using standard curves obtained with NaNO₃ under non-limited conditions (Fig. 2) to foresee the nitrogen demand of fed-batch *A. platensis* cultivations with urea and confirm the feasibility of using this cheap nitrogen source.

Ammonia and residual urea concentrations during the cultivation ($< 10^{-4}$ M) were always much lower than those considered toxic (10 mM) or even inhibitory for cyanobacteria growth (1.7 mM to 2 mM) (Abeliovich and Azov, 1976), thereby demonstrating that there was no accumulation either of ammonia or urea in the medium. Since the pH of the culture (9.5 ± 0.2) was higher than the pK_a of the ammonium (9.3), this compound was likely assimilated by simple diffusion and then trapped within the cell cytoplasm by protonation (Boussiba et al., 1984).

Light is the energy source that drives photosynthesis; therefore, its intensity is an additional important growth factor, which has been often associated with shifts in metabolic activity (Vonshak et al., 2000).

During photoautotrophic growth, the amount of light energy received by the photosynthetic apparatuses determines the amounts of inorganic carbon fixed. X_m was significantly increased ($p < 0.05$, Table 2) by an increase in the light intensity from 60 to 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figs. 2 to 4), whereas it reached a plateau in the range 120-240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Table 3). This result is consistent with the typical behavior of the autotrophic growth of *A. platensis* (Vonshak et al., 2000), which can be, depending on I , (i) light limited, (ii) light saturated, or (iii) light inhibited, and whose specific growth rate initially increases linearly with light intensity, then reaches a plateau, and, finally falls.

The highest X_m value found in this work was higher than those reported for *A. platensis* cultivations in minipond (1.5 g L^{-1}) (Binaghi et al., 2003) and conical tubular photobioreactor (1.3 g L^{-1}) (Watanabe and Hall, 1996).

3.3 Cell productivity

Table 2 shows that cell productivity (P_X) was not statistically affected either by the nitrogen or the CO_2 source ($p > 0.05$). Indeed, the almost coincident P_X values obtained in cultures with urea and nitrate were expected by the fact that the amounts employed of the former nitrogen source under every conditions were always based on the results of the corresponding runs with nitrate. As for X_m , also the use of different CO_2 sources did not influence the productivity ($p > 0.05$, Table 2) as well the cultivation time.

On the other hand, P_X increased by about 45% when increasing the light intensity from 60 to $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, while X_m increased by only 7%. Since the higher the light intensity, the higher the biomass concentration in the middle of runs (Figs. 2 to 4), it is likely that the effect of I is more marked when the overall culture conditions are favorable and there is some shadowing effect (Vonshak et al., 2000). In fact, the higher the light intensity, the larger the amount of energy converted into ATP to be utilized for cell growth and maintenance, and then the cells reach more quickly the maximum cell concentration (Vonshak et al., 2000).

This behavior was also observed by Danesi et al. (2004) and Rangel-Yagui et al. (2004) in *A. platensis* cultures carried out in miniponds with KNO_3 or urea as nitrogen sources. On the other hand, the similar P_X values obtained at 120 and $240 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Table 3) were the likely result of photosaturation or shadowing (Chojnacka and Noworyta, 2004; Vonshak et al., 2000) as described earlier for X_m .

Therefore, the highest cell productivities were obtained at the highest light intensities (443 ± 20 and $463 \pm 16 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ at $I = 120$ and $240 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectively), irrespective of the nitrogen or CO_2 sources used (Table 3). These values are close to that ($510 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) obtained by Watanabe et al. (1995), who investigated the *A. platensis* growth in conical helical photobioreactor at $118 \text{ } \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Other studies showed that this parameter reached maximum values of $92 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in a cylindrical glass tank using urea at $108 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Sassano et al., 2007) and $96 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in long minitanks using ammonium chloride at 13 klux ($156 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Bezerra et al., 2008). Since these light intensity thresholds are close to that obtained in this study, the remarkably higher values of P_X shown here demonstrate the excellent performance of the tubular photobioreactor configuration.

3.4 Nitrogen-to-cell conversion factor

The ANOVA statistical analysis indicates a significant effect of the nitrogen source ($p < 0.05$, Table 2) on the nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$), whose highest mean values were achieved in cultures using urea (Table 1). Indeed, in these cultures, the nitrogen amount added daily was based on the actual needs for cell growth and maintenance, and then its residual concentration was always $< 10^{-4} \text{ M}$; therefore, there was no limitation or excess of nitrogen during cultivation. On the other hand, in cultures with nitrate, its concentration was always maintained above 1 g L^{-1} to avoid any growth limitation (Faintuch, 1989), thus resulting in a $Y_{X/N}$ decrease.

Contrarily, no significant effects of CO_2 sources and light intensities on $Y_{X/N}$ ($p > 0.05$; Table 2) were observed. Taking into account that $Y_{X/N}$ is the ratio between the masses of dry cell produced and nitrogen added, such an observation had to be expected by the fact that the amount of nitrogen added to the culture is associated to cell growth, as stressed above. These results apparently disagree with those obtained by Bezerra et al. (2008) and Danesi et al.

(2004), who observed a $Y_{X/N}$ increase with light intensity. However, since those experiments were carried out using the same amount of nitrogen regardless of the light intensity, $Y_{X/N}$ was only a function of X_m , which was in turn an increasing function of I .

The highest $Y_{X/N}$ value found in this study ($13.8 \pm 0.90 \text{ mg mg}^{-1}$) was remarkably higher than those reported for urea ($7.4\text{--}8.5 \text{ mg mg}^{-1}$) (Rangel-Yagui et al., 2004) and ammonium chloride ($5.7 \pm 0.17 \text{ mg mg}^{-1}$) (Bezerra et al., 2008) as nitrogen sources in miniponds, because the use in this study of a closed tubular photobioreactor certainly reduced the nitrogen loss as ammonia by off gassing (Ferreira et al., 2010).

4 Conclusions

The results of this work showed that the simultaneous use of two low cost or even no-cost nutrients (CO_2 from alcoholic fermentation and urea) could be an interesting alternative for *A. platensis* cultivation in tubular photobioreactor. The fed-batch cultivation of this cyanobacterium at $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ using these nutrients as carbon and nitrogen sources, respectively, did in fact provide a maximum cell concentration of $2960 \pm 35 \text{ mg L}^{-1}$ and a cell productivity of $425 \pm 5.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. The production of *A. platensis* biomass, which is a source of valuable compounds, using as carbon source the CO_2 -rich gaseous emissions from the alcohol industry, may contribute to reduce the release of such a greenhouse gas into the atmosphere.

Acknowledgements

The authors grateful acknowledge the financial support of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, Brazil, (process no. 06/54959-3 and 06/5679-2) and of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, (processes n. 3978/08-7 and 0350-11/2010).

References

- Abeliovich, A., Azov, D., 1976. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 801–806.
- Balat, M., Balat, H., 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Appl. Energy* 86, 2273-2282.
- Hughes, E., Benemann, J.R., 1997. Biological fossil CO₂ mitigation. *Energy Conv. Manag.* 38, S467–S473.
- Bezerra, R.P., Matsudo, M.C., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M., 2008. Influence of ammonium chloride feeding time and light intensity on the cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 297-305.
- Binaghi, L., Del Borghi, A., Lodi, A., Converti, A., Del Borghi, M., 2003. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. *Process Biochem.* 38, 1341-1346.
- Boussiba, S., Resch, C.M., Gibson, J., 1984. Ammonia uptake and retention in some cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 138, 287-292.
- Carvalho, J.C.M., Vitolo, M., Sato, S., Aquarone, E., 2003. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* grown in sugarcane blackstrap molasses through a fed-batch process: optimization by response surface methodology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 110, 151-164.
- Cezare, E.A., 1998. Contribuição ao estudo da produção de biomassa de *S. platensis* empregando uréia como fonte de nitrogênio por meio de processo descontínuo alimentado, Master Thesis, University of São Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo, SP, Brazil.

- Chojnacka, K., Noworyta, A., 2004. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 34, 461–465.
- Cornet, J.F., Dussap, C.G., Cluzel, P., Dubertret, G., 1992. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 826–834.
- Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.O., Carvalho, J.C.M., Sato, S., 2004. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenerg.* 26, 329-335.
- Faintuch, B.L., 1989. Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas. Master Thesis, University of São Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo, SP, Brazil.
- Falcone, M., Vairo, M.L.R., Borzani, W., 1959. Processo simplificado para a dosagem de açúcares redutores totais em melaços de cana. *Anais Farm Quím.* 10, 69-72.
- Ferraz, C.A.M., Aquarone, E., Florenzano, G., Balloni, W., Tredici, M., 1985. Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina máxima*. Parte I – Emprego do anidrido carbônico. *Rev. Microbiol.* 16, 179-187.
- Ferreira, L.S., Rodrigues, M.S., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M., 2010. A new approach to ammonium sulphate feeding for fed-batch *Arthrospira platensis* cultivation in tubular photobioreactor. *Biotechnol. Prog.* 26, 1271-1277.
- Goldman, J.C., Dennett, M.R., Riley, C.B., 1982. Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO₂ supply in intensive microalgal cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 619-631.

- Guerreiro, M.A., Andrietta, S.R., Maugeri, F. 1997. Expert system for the design of an industrial fermentation plant for the production of alcohol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 68, 163-200.
- Jones, R.P., Pamment, N., Greenfield, D.P.F., 1981. Alcohol fermentation by yeast. The effect of environmental and other variables. *Process Biochem.* 16, 42-49.
- Joslyn, M.A., 1970. Alcoholometry, in: Joslyn, M.A. (Ed.), *Methods in Food Analysis: Physical, Chemical and Instrumental Methods of Analysis*. Academic Press, New York, pp. 447-474.
- Kock, J.L.F., Venter, P., Smith, D.P., Van Wyk, P.W.J., Botes, P.J., Coetzee, D.J., Pohl, C.H., Botha, A., Riedel, K-H., Nigam, S., 2000. A novel oxylipin-associated ‘ghosting’ phenomenon in yeast flocculation. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 401–406.
- Leduy, A., Samson, R., 1982. Testing of an ammonia ion selective electrode for ammonia nitrogen measurement in the methanogenic sludge. *Biotechnol. Lett.* 4, 303-306.
- Leduy, A., Therien, N., 1977. An improved method for optical density measurement of the semicroscopic blue algae *Spirulina maxima*. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 1219-1224.
- Ono, E., Cuello, J.L., 2004. Design parameters of solar concentrating systems for CO₂-mitigating algal photobioreactors. *Energy* 29, 1651–1657.
- Packer, M., 2009. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. *Energy Policy* 37, 3428-3437.
- Pierce, W.C., Haenisch, E.L. 1948. *Quantitative Analysis*, third ed. John Wiley & Sons, New York.

- Rangel-Yagui, C.O., Danesi, E.D.G., Carvalho, J.C.M., Sato, S., 2004. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresour. Technol.* 92, 133-141.
- Sánchez-Luna, L.D., Bezerra, R.P., Matsudo, M.C., Sato, S., Converti, A., Carvalho, J.C.M., 2007. Influence of pH, temperature, and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: a kinetic and thermodynamic approach. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 702-711.
- Sassano, C.E.N., Gioielli, L.A., Almeida, K.A., Sato, S., Perego, P., Converti, A., Carvalho, J.C.M., 2007. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass Bioenerg.* 31, 593-598.
- Schlösser, U.G., 1982. Sammlung von Algenkulturen. *Ber. Deutsch Bot. Ges.* 95, 181-276.
- Somogy, M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19-23.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87-96.
- Tapie, P., Bernard, A., 1988. Microalgae production: technical and economic evaluations. *Biotechnol. Bioeng.* 32, 873-885.
- Tyner, W., Taheripour, F., 2007. Renewable energy policy alternatives for the future. *Amer. J. Agr. Econ.* 89, 1303-1310.
- Vogel, A.I., 2002. *Análise Química Quantitativa*. Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro.
- Vonshak, A., Cheung, S.M., Chen, F., 2000. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanobacteria) cells to light. *J. Phycol.* 36, 675-679.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 707-718.

Watanabe, Y., Hall, D.O., 1996. Photosynthetic production of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* in a cone-shaped helical tubular photobioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, 693-698.

Watanabe, Y., de la Noüe, J., Hall, D.O., 1995. Photosynthetic performance of a helical tubular photobioreactor incorporating the cyanobacterium *Spirulina platensis*. Biotechnol. Bioeng. 47, 261-269.

Caption of Figures

Figure 1. Scheme of the photobioreactor employed for fed-batch cultivations of *A. platensis*.

(1): Degasser; (2): Condenser tube; (3): Air pump; (4): Rotameter; (5): Magnetic stirrer; (6): 20W Fluorescent lamps; (7): Airlift system.

Figure 2. Cell concentration (X , mg L⁻¹) versus time during fed-batch *A. platensis* cultivations carried out using nitrate and A) CO₂ from cylinder or B) gaseous emissions from alcoholic fermentation at different light intensities (μmol photons m⁻² s⁻¹): 60 (♦); 120 (×) and 240 (+). The estimated curves are drawn as continuous lines.

Figure 3. A) Cell concentration (X , mg L⁻¹) (open symbols) and B) daily urea addition (mM d⁻¹) (full symbols) versus time during fed-batch *A. platensis* cultivations carried out using CO₂ from cylinder at different light intensities (μmol photons m⁻² s⁻¹): Triangle, 60; Square, 120; Circle, 240.

Figure 4. A) Cell concentration (X , mg L⁻¹) (open symbols) and B) daily urea addition (mM d⁻¹) (full symbols) versus time during fed-batch *A. platensis* cultivations carried out using CO₂ from alcoholic fermentation at different light intensities (μmol photons m⁻² s⁻¹): Triangle, 60; Square, 120; Circle, 240.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Table 1. Maximum cell concentration (X_m), cell productivity (P_X) and nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$) obtained in fed-batch *A. platensis* cultures carried out at different light intensities and using different CO₂ and nitrogen sources.

run	I ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ^a	CO ₂ source	Nitrogen source	X_m (mg L ⁻¹) ^b	P_X (mg L ⁻¹ d ⁻¹) ^b	$Y_{X/N}$ (mg mg ⁻¹) ^b
1	60	C ^c	NaNO ₃	2899±17	250±1.7	4.2±0.03
2	60	C	Urea	2847±10	245±0.0	14±0.00
3	60	A ^d	NaNO ₃	2789±82	299±10	4.0±0.14
4	60	A	Urea	2867±28	308±3.5	14±0.17
5	120	C	NaNO ₃	3209±109	454±18	4.5±0.18
6	120	C	Urea	2980±103	408±17	11±0.50
7	120	A	NaNO ₃	2968±24	428±4.0	4.3±0.04
8	120	A	Urea	2952±35	425±5.9	15±0.20
9	240	C	NaNO ₃	3291±206	482±34	5.4±0.38
10	240	C	Urea	3236±72	473±12	13±0.34
11	240	A	NaNO ₃	3102±130	450±22	5.0±0.24
12	240	A	Urea	3070±112	445±19	14±0.56

^a I = light intensity

^b Values represent means of two experiments and its standard error

^c C = cylinder

^d A = alcoholic fermentation

Table 2. Values of the descriptive level (p) for the maximum cell concentration (X_m), cell productivity (P_X) and nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$) at different light intensities (60, 120 or 240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and using different sources of CO_2 (cylinder or alcoholic fermentation) and nitrogen (nitrate or urea).

Factors	X_m	P_X	$Y_{X/N}$
CO ₂	0.225	0.256	0.351
Light intensity	0.000	0.000	0.700
Nitrogen	0.922	0.947	0.000

Table 3. Means values of maximum cell concentration (X_m) and cell productivity (P_x) obtained in fed-batch *A. platensis* cultivations carried out at variable light intensity.

Light intensity ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	X_m (mg L^{-1})*	P_x ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)*
60	2851 $\pm$ 54 ^a	306 $\pm$ 7 ^a
120	3056 $\pm$ 115 ^b	443 $\pm$ 20 ^b
240	3180 $\pm$ 96 ^b	463 $\pm$ 16 ^b

*Values with the same superscript are not significantly different according to the Tukey test ($p > 0.05$).