

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Ana Cláudia Vieira Salla**

**Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em meio Zarrouk diluído e  
adicionado de resíduo da indústria láctea**

**Passo Fundo  
2016**



**Ana Cláudia Vieira Salla**

**Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em meio Zarrouk diluído e  
adicionado de resíduo da indústria láctea**

Dissertação apresentada para obtenção  
do título de Mestre em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Jorge Alberto Vieira  
Costa

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Luciane Maria Colla

**Passo Fundo  
2016**



**Ana Cláudia Vieira Salla**

**Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em meio Zarrouk diluído e  
adicionado de resíduo da indústria láctea**

Dissertação apresentada para obtenção  
do título de Mestre em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Jorge Alberto Vieira  
Costa

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Luciane Maria Colla

Passo Fundo, 14 de março de 2016.

Banca examinadora:

---

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa – FURG/UPF

---

Co-Orientadora: Prof. Dr. Luciane Maria Colla - UPF

---

Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião- UPF

---

Prof. Dr. Lucielen Oliveira dos Santos - FURG

CIP – Catalogação na Publicação

---

S168c Salla, Ana Cláudia Vieira  
Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em meio  
Zarrouk diluído e adicionado de resíduo da indústria  
láctea / Ana Cláudia Vieira Salla. – 2016.  
116 p. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.  
Coorientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Colla.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2016.

1. Energia da biomassa. 2. Biocombustíveis. 3. Alga -  
Cultura e meios de cultura. 4. Spirulina. I. Costa, Jorge  
Alberto Vieira, orientador. II. Colla, Luciane Maria,  
coorientadora. III. Título.

CDU: 620.91

---

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

Dedico este trabalho aos meus familiares que sempre me apoiaram, em especial a minha mãe Marilei Michel Vieira, meu pai Telmo Antônio Salla e meu irmão Cristiano Vieira Salla.



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meu reconhecimento e agradecimento a todas aquelas pessoas que contribuíram para a realização desta Dissertação. Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me dar forças e me abençoar todos os dias de realização deste trabalho.

Meu agradecimento ao Prof. Jorge Alberto Costa pela oportunidade de me orientar, mesmo que a distancia. E um agradecimento especial a Prof. Luciane Maria Colla, que como co-orientadora deste projeto, contribuiu muito para a realização deste trabalho, sempre com boa disposição, conselhos, ajudas e críticas construtivas durante todo o andamento deste trabalho. Obrigada pela sua incondicional disponibilidade e pelo exemplo que és. Obrigada queridos Orientadores, vocês fizeram a diferença neste trabalho.

Meu sincero agradecimento a todas as pessoas que me ajudaram e que não mediram esforços para me ajudar, que me acompanharam do primeiro ao último dia. Obrigada Ana Cláudia Margarites, Fábio Seibel e Luiz Carlos Holz, vocês foram demais. Ana, obrigada por todo o auxílio, paciência e ensinamentos que foram desde formatar trabalhos, gráficos, melhoria da escrita até a ensinamentos que levarei para a vida, sempre encontra o lado bom em cada dificuldade. Obrigada Fábio e Luiz, por toda a ajuda nas partes experimentais, por me acompanharem inclusive em finais de semana, e sempre com bom humor, essencial para um bom convívio. Aprendi muito com vocês. Obrigada por nunca desanimarem e confiarem neste trabalho e se dedicarem a ele tanto quanto eu.

Também devo agradecer a todos os amigos do Laboratório de Fermentações que fizeram parte da minha caminhada, tornando esta etapa da minha vida, mais leve, rindo das dificuldades, e me ajudando sem medir esforços, obrigada Grazi, Chico, Mariana, Patrícia, Gabi, Gabriel, Munise, Tati. Obrigada pela disposição em ajudar. Seja com atividades laboratoriais, com conversas, ou simplesmente pelo convívio. Agradeço também aos técnicos João e Clarice, sempre muito prestativos e dispostos a ajudar.

Obrigada também a todos os colegas da 1ª turma de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela convivência nestes dois anos. Obrigada também a todos

os meus amigos que entenderam a minha ausência e estresse em diversos momentos e que sempre me incentivaram com palavras positivas, e acreditarem que eu seria capaz.

Obrigada a FAPERGS pela bolsa concedida e que possibilitou que eu fizesse o mestrado.

E por último, obrigada minha família por me incentivar, confiar em meu potencial durante todas as minhas atividades acadêmicas. Por aguentarem os meus dias ruins e estarem comemorando comigo nos dias bons. Obrigada em especial a minha mãe Marilei Michel Vieira, por me apoiar e estar presente em todas as etapas da minha vida. Ao meu pai Telmo Antonio Salla e ao meu irmão Cristiano Vieira Salla, que apesar da distância, se fazem sempre presente. E muito obrigada Cristian Denovaro, por estar ao meu lado, me incentivando, compreendendo a minha ausência, me apoiando nestes momentos finais deste trabalho e em tantos outros aspectos da minha vida. Obrigada por estar presente em todos estes momentos.

Minha gratidão a todos aqueles, que de uma forma ou outra, colaboraram para a realização deste trabalho.

Ana Cláudia Vieira Salla

Passo Fundo, 2016

## RESUMO

A maior parte da energia consumida no mundo é derivada de fontes não renováveis, como carvão, petróleo e gás natural, as quais tendem ser esgotadas ao longo do tempo. A necessidade por uma fonte de energia renovável, para reduzir as emissões dos gases estufa, faz com que as microalgas destaquem-se por serem microrganismos fotossintéticos, com alta capacidade de sintetizar carboidratos e lipídeos, e também por não competirem com alimentos por terrenos aráveis ou águas potáveis. A microalga precisa atingir elevada produtividade em biomassa e em carboidratos associado ao uso de meios de cultivo de baixo custo para ser considerada matéria-prima com potencial para produção de bioetanol. Os cultivos mixotróficos possibilitam o uso de resíduos como fontes de carbono para os cultivos algais. Objetivou-se o acúmulo de com adição de resíduo carboidratos na microalga *Spirulina platensis* LEB 52 em cultivos da ultrafiltração e nanofiltração de soro de leite. Os cultivos da microalga foram realizados em fotobiorreatores de 1 L, a 30 °C e fotoperíodo de 12 h, com concentração celular inicial de 0, 0,15 g.L<sup>-1</sup>, sob sistema de agitação constante. Para avaliar a influencia da concentração do meio Zarrouk e a adição de resíduo foi utilizado o Planejamento Experimental Misto 2<sup>1</sup>.3<sup>1</sup>, sendo um para cada resíduo adicionado (permeado de ultrafiltração e retido da nanofiltração). Os modos de cultivo também foram estudados, nos cultivos em escala laboratorial testou-se o modo descontínuo simples e o descontínuo alimentado. O meio Zarrouk em concentração de 20% e a adicionado de 2,5% v/v de resíduo da nanofiltração atingiu elevada produtividade em carboidratos (cerca de 60 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), sendo que o montante de resíduo adicionado ao final do processo foi 10% v/v neste ensaio. Nesta mesma condição, porém adicionado de resíduo da ultrafiltração atingiu a mesma produtividade em carboidratos, no entanto, ao final do processo o montante de resíduo adicionado foi 2% v/v. Os dois ensaios (Zarrouk 20% e Zarrouk 20% com adição de permeado da ultrafiltração) que atingiram elevada produtividade em carboidratos em escala laboratorial tiveram sua condição testada em biorreatores tipo *raceways* de 10 L. O ensaio que utilizou apenas Zarrouk 30% apresentou elevada produtividade em proteína, e por isso, testou-se esta condição nos *raceways* de 10L. Todas as condições testadas nos *raceways* atingiram elevada produtividade em carboidratos (77,42 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e 76,21 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, nas condições de Zarrouk 20% e Zarrouk 20% adicionado de 2,5% de permeado da ultrafiltração, respectivamente). E ao utilizar o meio Zarrouk 30% em *raceways* também foi atingido uma produtividade em carboidratos elevada, de 66,40 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. As condições de cultivo estudadas são boas alternativas para elevar a produtividade de carboidratos na microalga *Spirulina*, sendo consideradas condições de cultivo apropriadas quando o interesse é o uso desta como matéria-prima para a produção de bioetanol, visto o elevado teor de carboidratos conduzido nestas condições.

Palavras-chave: Batelada alimentada. Bioetanol. Cultivo mixotrófico. Meio de cultivo diluído.

## ABSTRACT

The most of energy consumed in the world is derived from non-renewable sources, such as coal, oil and natural gas, which tend to be depleted over time. The necessity of a renewable source of energy, to reduce the emissions of greenhouse gases, make the microalgae are detached by being photosynthetic microorganisms, with high capability to synthesize carbohydrates and lipids, also because they don't compete for space and water with food and there is a possibility that they can be produced from waste. To use microalgae as a feedstock to bioethanol, high yields of biomass and accumulation of the compounds of interest are required, as well as the use of inexpensive culture media. The mixotrophic culture enables the use of waste such as carbon sources for algal cultivation. The aim of this study was the increase of carbohydrates in *Spirulina* with the addition of residue from ultra and nanofiltration process of whey protein. The cultures of *Spirulina platensis* LEB 52 were performed in photobioreactors of 1 L, at 30 °C and photoperiod of 12 h, with initial cell concentration of 0.15 g.L<sup>-1</sup>. In all experiments, 0%, 1.25% and 2.50% (according with the Experimental Design) of residue was added in fed batch mode. To evaluate the influence of the concentration of the Zarrouk medium and of the residue a Mixed Experimental Design 2<sup>1</sup>.3<sup>1</sup> was used. It was used the Mixed Experimental Design 2<sup>1</sup>.3<sup>1</sup> for each residue added (permeate ultrafiltration and nanofiltration retentate). The cultivation modes were also studied in crops in laboratory scale tested: the simple batch mode and fed batch mode. The detriment of nutrient in the Zarrouk medium to 20% and the addition of 2.50% of nanofiltration residue led to a high carbohydrates productivity (about 60 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) and the amount of residue added to the end of the process was 10% v/v in this assay. This same condition, but added ultrafiltration residue has reached the same productivity in carbohydrates, however, in the end of the process the amount of waste was added 2% v/v. The two assays (20% Zarrouk and Zarrouk 20% with the addition of ultrafiltration permeate) who achieved high productivity in carbohydrates in laboratory scale had their condition tested in bioreactors type raceways 10 L. The test that used only Zarrouk 30% showed high productivity protein, and therefore, this condition was tested in 10 L raceways. However, in all conditions tested in raceways reached high productivity in carbohydrates (72,42 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, and 76,21 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, in the condition using Zarrouk 20% and Zarrouk 20% added with 2,5% of ultrafiltration permeate, respectively). Even the condition that used Zarrouk 30% reached high carbohydrate productivity, about 66,40 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. The culture conditions studied are good alternatives for increasing carbohydrates productivity in *Spirulina* and are considered appropriate conditions when there is an interest of using microalgae as a feedstock in the production of bioethanol.

Keywords: Fed batch. Bioethanol. Mixotrophic cultivation culture. Culture medium diluted.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processos de conversão de energia a partir de biomassa e respectivos produtos finais. ....	22
Figura 2: Sistemas de cultivo. A) Lagoas extensivas; B) Lagoas circulares; C) <i>Raceway paddle wheel mixed open ponds</i> . ....	30
Figura 3: Fluxograma geral da metodologia utilizada.....	37
Figura 4: Tanques de cultivo tipo <i>Raceways pounds</i> .....	42
Figura 5: Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de lactose <i>versus</i> tempo para os cultivos da microalga <i>Spirulina platensis</i> realizados com adição de retido da nanofiltração (NF) de soro de leite em modo descontínuo simples. ....	52
Figura 6: Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de lactose <i>versus</i> tempo para os cultivos da microalga <i>Spirulina platensis</i> realizados com adição de permeado da ultrafiltração (UF) de soro de leite em modo descontínuo simples.....	53
Figura 7: Curvas de crescimento e consumo de lactose dos cultivos em modo descontínuo da microalga <i>Spirulina platensis</i> nos ensaios controles .....	54
Figura 8: Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de lactose <i>versus</i> tempo para os cultivos da microalga <i>Spirulina platensis</i> realizados com adição de retido da nanofiltração (NF) de soro de leite. ....	57
Figura 9: Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de lactose <i>versus</i> tempo para os cultivos da microalga <i>Spirulina platensis</i> realizados com adição de permeado da ultrafiltração (UF) de soro de leite. ....	58
Figura 10: Curvas de crescimento e consumo de lactose dos cultivos da microalga <i>Spirulina platensis</i> nos ensaios controles .....	59
Figura 11: Produtividade de carboidratos e proteínas a partir da biomassa obtida nos ensaios controles (a), nos ensaios adicionados do resíduo da nanofiltração (b) e nos ensaios adicionados do resíduo da ultrafiltração (c).....	68
Figura 12: Concentração celular <i>versus</i> tempo dos ensaios A e B realizados nos <i>raceways</i> .....	72
Figura 13: Concentração celular <i>versus</i> tempo do ensaios C realizados nos <i>raceways</i> .	73
Figura 14 - Comprovante de submissão e de aceite do artigo.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das condições de cultivo de microalgas .....	26
Tabela 2: Composição celular da microalga <i>Spirulina platensis</i> em % de matéria seca	28
Tabela 3: Composição de nutrientes das diferentes concentrações de meio Zarrouk. ...	38
Tabela 4: Matriz dos Delineamentos experimentais Fatoriais $2^2 3^1$ dos cultivos em modo descontínuo .....	40
Tabela 5: Matriz experimental dos Delineamentos $2^1 3^1$ dos ensaios em modo descontínuo alimentado .....	41
Tabela 6: Dados dos Ensaios Controles .....	41
Tabela 7: Cultivos realizados nos <i>Raceways</i> de 10 L.....	42
Tabela 8: Caracterização dos resíduos de soro de leite nanofiltrado e ultrafiltrado.....	48
Tabela 9: Velocidades específicas de crescimento, concentrações celulares máximas e duração da fase exponencial de crescimento obtido nos ensaios dos planejamentos experimentais realizados em modo descontínuo simples. ....	50
Tabela 10: Velocidades específicas de crescimento, concentrações celulares máximas obtidas nos ensaios dos planejamentos experimentais e experimentos controles dos cultivos realizados em modo descontínuo alimentado. ....	61
Tabela 11: Produtividade de carboidratos e proteínas obtidas nos ensaios dos planejamentos experimentais em modo descontínuo simples. ....	64
Tabela 12: Teor e produtividade de carboidratos e proteínas obtidas nos ensaios dos planejamentos experimentais em modo descontínuo alimentado.....	67
Tabela 13: Concentração celular e parâmetros cinéticos de crescimento .....	72
Tabela 14: Comparação da concentração celular dos ensaios em sistemas fechados e abertos.....	74
Tabela 15: Teor e produtividade de carboidratos e proteínas obtidas nos ensaios realizados em <i>raceways</i> .....	76
Tabela 16: Produtividade em carboidratos dos ensaios em sistemas fechados e abertos	76
Tabela 17: Velocidades específicas de crescimento, concentrações celulares máximas e teor de carboidratos e proteínas obtidas nos ensaios dos planejamentos experimentais em modo descontínuo simples.....	91
Tabela 18: Velocidades específicas de crescimento, concentrações celulares máximas e teor de carboidratos e proteínas obtidas nos ensaios dos planejamentos experimentais e experimentos controles dos cultivos realizados em modo descontínuo alimentado. ....	92
Tabela 19: Velocidades específicas de crescimento, concentrações celulares máximas e teor de carboidratos e proteínas obtidas nos ensaios dos planejamentos experimentais e experimentos controles dos cultivos realizados em <i>raceways</i> .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu_{\text{máx}}$ :	Velocidade específica máxima de crescimento
CHO:	Carboidratos
CPS:	Concentrado proteico de soro
IPS:	Isolado Proteico de Soro
N:	Nanofiltração
PRO:	Proteínas
U:	Ultrafiltração
$X_{\text{final}}$ :	Concentração celular final



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Biocombustíveis.....	21
2.1.1 Biocombustíveis de 1ª geração.....	22
2.1.2 Biocombustíveis de 2ª geração.....	23
2.1.3 Biocombustíveis de 3ª geração.....	24
2.2 Microalgas .....	25
2.2.1 Condições de cultivo e Cultivo mixotrófico .....	26
2.2.2 Carboidratos em microalgas.....	27
2.2.3 Microalga <i>Spirulina</i> .....	27
2.3 Sistemas de produção de microalgas .....	29
2.3.1 Formas de Operação do Cultivo.....	31
2.3.2 Recuperação da biomassa .....	32
2.4 Soro de leite .....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Microrganismo, manutenção do inóculo e meio de cultivo.....	38
3.2 Biorreatores e condições de cultivos.....	39
3.3 Determinações analíticas .....	43
3.3.1 Concentração celular .....	43
3.3.2 Parâmetros cinéticos de crescimento .....	43
3.3.3 pH.....	43
3.3.4 Lactose .....	44
3.3.5 Concentração de carboidratos intracelulares na microalga <i>Spirulina</i> LEB 5244	
3.3.6 Concentração de proteínas intracelulares na microalga <i>Spirulina</i> LEB 52....	44
3.2.7 Tratamento dos dados .....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
4.1 Caracterização do resíduo .....	47
4.2 Concentração celular e parâmetros cinéticos de crescimento.....	49
4.2.1 Cultivos em modo descontínuo simples.....	49
4.2.2 Cultivos em modo descontínuo alimentado .....	56
4.3 Teor e produtividade de carboidratos e proteínas .....	63

4.3.1 Cultivos em modo descontínuo simples.....	63
4.3.2 Cultivos em modo descontínuo alimentado .....	66
4.4. <i>Scale up</i> para <i>raceway</i> de 10 L .....	71
4.4.1 Concentração celular e parâmetros cinéticos nos <i>raceways pounds</i> .....	71
4.4.2 Teor e produtividades de carboidratos e proteínas nos <i>raceways pounds</i> .....	75
5 CONCLUSÕES.....	79
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	81
REFERÊNCIAS .....	82
APÊNDICE A –Resultados em descontínuo simples .....	91
APÊNDICE B–Resultado em descontínuo alimentado.....	92
APÊNDICE C–Resultado em <i>raceways pounds</i> de 10 L.....	93
APÊNDICE D –Gráficos concentração celular em função do tempo para os cultivos realizados em modo descontínuo simples e adicionados de retido de nanofiltração.....	94
APÊNDICE E –Gráficos concentração celular em função do tempo para os cultivos realizados em modo descontínuo simples e adicionados de permeado da ultrafiltração	96
APÊNDICE F – Gráficos concentração celular em função do tempo dos ensaios controles realizados em modo descontínuo simples.....	98
APÊNDICE G –Gráficos concentração celular em função do tempo para os cultivos realizados em modo descontínuo alimentado e adicionados de retido de nanofiltração .....	100
APÊNDICE H –Gráficos concentração celular em função do tempo para os cultivos realizados em modo descontínuo alimentado e adicionados de permeado da ultrafiltração .....	102
APÊNDICE I –Gráficos concentração celular em função do tempo para os ensaios controles realizados em modo descontínuo alimentado .....	104
APÊNDICE J – Artigo “Increase in the carbohydrate content of the microalgae <i>Spirulina</i> in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate” .....	106

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de petróleo no Brasil foi aproximadamente 392 milhões L.d<sup>-1</sup> em janeiro de 2015, e representa um aumento de 20,3% na produção de petróleo se comparado ao mesmo mês de 2014 (ANP, 2015). O abastecimento de energia primária é composto por 87% de combustíveis fósseis e apenas 1,6% são fornecidas por recursos renováveis (W.E.F., 2015). O crescimento da população mundial resultou em um aumento da demanda de energia, o que demonstra a necessidade de fontes de energia seguras. Todos os países estão preocupados com o problema para atender o aumento contínuo da demanda por combustíveis de transporte dentro dos limites de compromissos internacionais, requisitos legais, preocupações ambientais e com os recursos limitados (SUGANYA et al., 2015). Devido ao conflito entre o uso de energia e os problemas ambientais, somos obrigados a escolher um caminho diferente para um futuro sustentável e faz com que os governos estimulem o desenvolvimento de indústrias de biocombustíveis. As iniciativas incluem misturas obrigatórias, isenção de impostos, subsídios diretos, incentivos fiscais e políticas governamentais de compra, entre outros (BIOCOMBUSTÍVEIS, 2014; ONCEL, 2013). Os biocombustíveis são excelentes substitutos para o combustível convencional, porque estes combustíveis são renováveis, não-tóxicos e biodegradáveis. Além disso, os biocombustíveis são opções ideais para o uso de energia sustentável, porque eles podem substituir os combustíveis à base de petróleo, sem grandes mudanças na infraestrutura de energia (SUNGAYA et al, 2015;. TRUMBO E TONN, 2015).

As microalgas têm demonstrado potencial para contornar alguns problemas, abordando as questões de fontes alternativas de energia, aquecimento global, saúde humana e segurança alimentar. O uso de algas para a produção de biocombustíveis é potencialmente sustentável, mas a viabilidade econômica é o principal obstáculo à comercialização (PARMAR, 2011; SUNGAYA et al, 2015). Os combustíveis gerados a partir das microalgas vêm recebendo atenção, devido à ampla biodiversidade e variabilidade em sua composição bioquímica, provenientes de sua biomassa. A otimização da produção de microalgas faz-se necessária para que esta matéria-prima ganhe espaço no cenário internacional (AZEREDO, 2012) visto o seu grande potencial como fonte de biocombustíveis. O cenário desta produção agrega também a utilização de efluentes como fonte de nutrientes para o seu crescimento. A sinergia entre a produção de biocombustíveis e tratamento de efluentes através do cultivo de microalgas

vem sendo tema de diversos estudos (AZEREDO, 2012; BATISTA et al., 2015; MAHDY et al., 2015; MATAMOROS et al., 2015; POSADAS et al., 2015).

Um dos resíduos da indústria láctea, o soro de leite apresenta impactos negativos quando descartado ao meio ambiente por apresentar composição química rica em proteínas, açúcares e minerais. Diversas alternativas têm sido propostas para valorização deste subproduto, por exemplo, a transformação em concentrado proteico de soro. Porém este concentrado gera outro resíduo, rico em lactose, sais e minerais. Este resíduo pode ser utilizado como fonte de nutrientes para a microalga *Spirulina*, com a finalidade de reduzir o custo de produção da microalga e diminuir o montante de resíduo que será descartado.

A microalga *Spirulina*, tem sido utilizada no mundo todo devido aos biocompostos que podem ser extraídos de sua biomassa, principalmente por sua propriedade antioxidante (PATIL et al., 2015; ZOTTE, et al., 2014). No entanto poucos trabalhos para a obtenção de bioetanol de *Spirulina* são mencionados na literatura, embora possa ser considerada uma matéria-prima potencial para a produção de bioetanol em sistemas de biorrefinarias. O cultivo de *Spirulina* em meio Zarrouk diluído com adição de fonte de carbono orgânica provinda de resíduos dos processos de ultrafiltração e nanofiltração do soro pode ser uma alternativa para elevar a produtividade em biomassa e aumentar o teor de carboidratos na biomassa microalgal. Neste contexto, objetivou-se avaliar a utilização de resíduos do processo de filtração por membranas de soro de leite como fonte de carbono para o cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* com foco no acúmulo de carboidratos para obtenção de biomassa que possa ser utilizada para a produção de bioetanol.

Esta dissertação está incluída na linha de pesquisa “Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes” e nos projetos “Planta piloto de produção de microalgas e uso da biomassa em aquicultura, na produção de bioetanol e como antioxidante” projeto sob coordenação da Prof<sup>a</sup> Dr Luciane Maria Colla e “Valoração do soro de leite através de processos de separação por membranas e bioprocessos” projeto sob coordenação do Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Biocombustíveis**

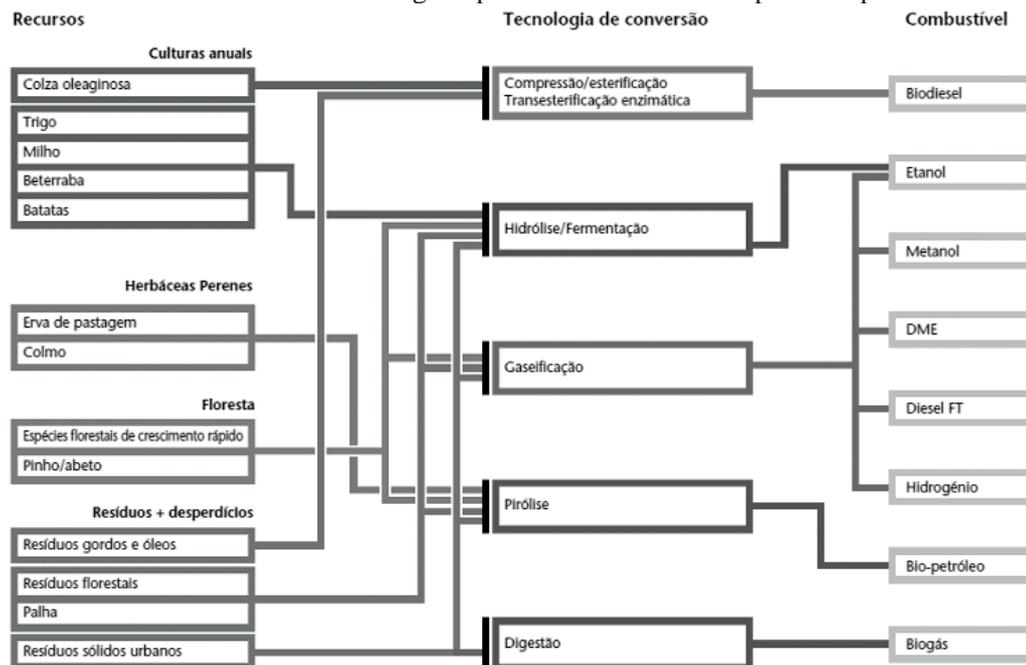
O etanol e o biodiesel são os biocombustíveis que constituem as principais fontes de energia renovável em muitos países e são os mais amplamente disponíveis. A produção de biocombustíveis pode colaborar na diminuição de algumas questões que preocupam governantes e a sociedade em todo o mundo, como reduzir a necessidade de importação de petróleo para muitos países; reduzir a dependência dos combustíveis fósseis; promover o desenvolvimento limpo e promover o desenvolvimento rural e a criação de novos empregos (AIE, 2013; KUMAR; CHAUBE; JAIN, 2012).

A busca por fontes renováveis de energia menos agressivas à saúde humana e ao meio ambiente em todo o mundo, colocou os biocombustíveis como alternativa para um novo padrão de desenvolvimento para o mundo de maneira geral e para o Brasil em particular (FERREIRA; PASSADOR, 2014). Os biocombustíveis oferecem numerosos benefícios relacionados à segurança energética em comparação aos combustíveis fósseis, ao desenvolvimento econômico e ao meio ambiente, mas ao mesmo tempo muitos desafios precisam ser superados para o alcance desses benefícios, pois estão cercados de dúvidas relacionadas à sustentabilidade de sua produção (HOEKMAN, 2009; PERIMENIS, et al. 2011).

Os combustíveis obtidos a partir de biomassa designam-se por biocombustíveis, grupo onde está inserido considerável número de diferentes produtos e formas de produção (Figura 1).

Existe uma crescente preocupação com impactos diretos e indiretos relacionados ao uso da terra e à competição com a produção de alimentos. Essas preocupações têm provocado a busca por uma certificação global de biocombustíveis a fim de assegurar que a sustentabilidade seja uma pré-condição para a sua produção (TOMEI; UPHAM, 2009). As dúvidas sobre a sustentabilidade da produção de biocombustíveis na Europa têm levado a propostas de redução do limite de uso de biocombustíveis derivados de grãos destinados à alimentação humana nos países da União Européia (AIE, 2013).

Figura 1 - Processos de conversão de energia a partir de biomassa e respectivos produtos finais.



Fonte: Adaptado de Biocombustíveis (2014)

Visando a diminuição do uso de combustíveis fósseis e para minimizar as emissões de carbono resultantes, tem-se verificado o aumento do consumo de etanol como combustível para o setor dos transportes, sendo utilizado 100% ou em misturas com gasolina (MACEDO et al., 2008). O bioetanol é produzido através do processo de fermentação de açúcar e amido, podendo-se utilizar diferentes matérias-primas como cana-de-açúcar, milho e outros grãos (HARUN, DANQUAH, 2011).

A produção de bioetanol em 2013 foi 120 bilhões de litros em todo o mundo, devendo alcançar 155 bilhões em 2020. Projeta-se que o Brasil será, em 2020, o segundo maior produtor de etanol alcançando a produção de 51 bilhões de litros, o que representará 28% da produção mundial dessa *commodity* (FAO, 2011). A transformação do etanol brasileiro em *commodity* não depende apenas de sua competitividade em preços e seu balanço energético positivo, mas de sua sustentabilidade (FERREIRA; PASSADOR, 2014).

### 2.1.1 Biocombustíveis de 1ª geração

Os biocombustíveis de 1ª geração dominam o mercado de biocombustíveis, com produção anual de 50 bilhões de litros. Os biocombustíveis de 1ª geração são

principalmente derivados de culturas alimentares ricas em sacarose (beterraba sacarina e cana de açúcar), amido (batata, milho e trigo), e/ou óleos vegetais (girassol, soja e colza), utilizando tecnologias simples e já implementadas industrialmente - hidrólise/fermentação e prensagem/esterificação (BIOCOMBUSTÍVEIS, 2014).

No Brasil, o etanol é basicamente produzido a partir da cana de açúcar (ANP, 2014). Contudo, existem preocupações de que a cana possa competir em espaço com a produção de alimentos, além da poluição devido à queima da plantação no caso da colheita manual e outras formas de poluição da água, durante o processo de lavagem da cana e lixiviação provocada pela vinhaça (LA ROVERE et al., 2011). A produção de bioetanol de 1ª geração, apesar de já implementado industrialmente, não é o processo mais sustentável de produção de combustíveis, pois provoca pressão sobre o preço dos alimentos, já que muitas destas matérias-primas também podem ser utilizadas para alimentação humana e animal, causa a degradação acelerada dos solos e consome grandes quantidades de água. Além disso, a produção de etanol de 1ª geração está sujeita à sazonalidade das culturas (MIRANDA, 2011).

### **2.1.2 Biocombustíveis de 2ª geração**

Os biocombustíveis de 2ª geração propõem outras fontes de biomassas, que não são tradicionalmente utilizadas na alimentação humana e animal, resíduos lignocelulósicos dos tipos vegetal e agroindustrial (ESCOBAR et al., 2009). A biomassa lignocelulósica apresenta na sua constituição celulose (40-50 %), hemicelulose (25-35 %) e lignina (15-20 %). A celulose é um homopolímero composto por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1-4) que tornam a estrutura compacta. A hemicelulose é um heteropolímero, cuja cadeia principal é constituída por moléculas de xilose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ (1-4) e as ramificações podem conter manose, arabinose, ramnose e galactose.

A biomassa lignocelulósica é considerada uma matéria-prima propícia para a produção do bioetanol devido a sua grande disponibilidade (BJERK, 2012). A compactação e complexidade destas matérias fazem com que a disponibilidade dos açúcares fique comprometida e, por essa razão têm de ser submetidas a pré-tratamentos rigorosos e a tecnologias de hidrólise/fermentação, gaseificação ou pirólise. Os pré-tratamentos prévios são necessários para aumentar a recuperação dos açúcares fermentescíveis durante a hidrólise (IMMAN et al, 2015). Diversas pesquisas têm sido

realizadas em busca de melhorias no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, visto que a maioria destes processos, além de serem difíceis ainda não atingiram padronização mínima e características de tecnologias plenamente desenvolvidas, e isto acarreta em custos elevados, o que faz com que a sua produção ainda não esteja implementada em larga escala.(HARUN et al., 2010b; IMMAN et al, 2015; YANG et al., 2015; CHEN et al.,2015).

### **2.1.3 Biocombustíveis de 3ª geração**

Os biocombustíveis de 3ª geração são os que utilizam microalgas como matéria-prima para sua produção. É importante encontrar uma alternativa segura de combustível para aliviar a crise de energia e para proteger o meio ambiente, logo, os microrganismos fotossintéticos têm emergido como uma das fontes promissoras para a produção de biocombustíveis (SARKAR; SHIMIZU, 2015). As microalgas se destacam pela sustentabilidade, baixo impacto ambiental e por não competir por espaço com as culturas alimentares, apresentam a possibilidade de estimulação para o acúmulo de carboidratos e/ou lipídeos, possuem uma versatilidade em relação a utilização da água, podendo ser cultivada em água doce ou salgada, mas também em efluentes e águas residuais, o que permite reduzir custos no fornecimento de nutrientes e/ou despoluir cursos de água (GODOS et al., 2010; HARUN et al., 2010a; KIM et al., 2010; KONG et al., 2010; MIRANDA, 2011; ZHU et al., 2014)

Diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de cultivar as microalgas em larga escala para a produção de biomassa para fins energéticos (AZEREDO, 2012) Boruffet al. (2015), por exemplo, realizaram estudo para identificar locais para a produção em larga escala de microalgas na Austrália através de modelagem espacial do potencial de cultivo com base em estudos de cultivo de microalgas realizados na Austrália Ocidental.

O uso de biomassa microalgal para a produção de energia engloba os mesmos processos utilizados para a biomassa terrestre. Entre os fatores que influenciam na escolha do processo de conversão incluem: o tipo e a quantidade de matérias-primas de biomassa, a forma desejada da energia e o ganho econômico desejado sobre o produto (BRENNAN; OWENDE, 2010). A *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* e *Spirulina* são exemplos de microalgas que se adaptam aos parâmetros de produção de biocombustível, além de poderem apresentar altas concentrações de

biocompostos presentes em suas composições, como carboidratos, para a produção de bioetanol e lipídeos para a produção de biodiesel (JOHN et al., 2011).

## 2.2 Microalgas

As microalgas são organismos autotróficos que se desenvolvem a partir do processo de fotossíntese e apresentam requisitos simples para seu desenvolvimento (luz, açúcares, CO<sub>2</sub>, N, P, K), podendo crescer em diversos habitats e em temperaturas extremas com diversas variações no pH. Podem produzir lipídios e carboidratos em grande quantidade e em um curto período (BRENNAN; OWENDE, 2010). Possuem capacidade de se adaptar a diversos ambientes, podendo ajustar ou alterar sua estrutura interna para excretar uma gama de compostos que podem atuar como inibidores de outros organismos. Podem assumir vários tipos de metabolismos, sendo capazes de mudanças metabólicas como respostas às mudanças das condições ambientais (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

A composição bioquímica da biomassa das microalgas depende de vários fatores, como, temperatura, intensidade de luz, nutrientes, pH e agitação, assim como da natureza de cada espécie algal (MIAO; WU, 2004). O crescimento de microalgas deriva de diversas reações biológicas e bioquímicas, portanto para a otimização do cultivo é necessária a interação entre a temperatura, intensidade luminosa, concentração de nutrientes e agitação. Em caso de cultivos em meios de cultura alternativos como resíduos industriais ou agrícolas, os fatores limitantes para a produtividade de biomassa resumem-se à luminosidade, temperatura, e agitação da cultura (DUARTE, 2001).

Em cultivos de microalgas, o carbono é considerado como o elemento mais importante, e constitui ao redor de 50% da biomassa microalgal, sendo que, comumente o crescimento de microalgas encontra-se limitado por este composto (GROBBELAR, 2004). Ainda que a principal fonte de carbono empregada nos cultivos de microalgas seja o dióxido de carbono, diversos estudos têm comprovado que as microalgas podem crescer empregando diferentes rotas nutricionais e, especialmente utilizando compostos orgânicos como glicose, acetato, lactato, aminoácidos ou outros substratos (RICHMOND, 1990b, CERON-GARCIA et al., 2005).

### 2.2.1 Condições de cultivo e Cultivo mixotrófico

O crescimento e a composição das microalgas são definidos pelas condições de cultivo, conforme a fonte de carbono empregada e a utilização ou não de energia luminosa, as principais formas são: fotoautotrófica, heterotróficos, mixotróficas e foto-heterotrófico. Na Tabela 1 encontram-se as principais características de cada condição de cultivo (CHEN et al., 2011; CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Tabela 1- Características das condições de cultivo de microalgas

<b>Condição de cultivo</b>	<b>Fonte de Energia</b>	<b>Fonte de carbono</b>
Foto-autotrófico	Luz	Inorgânico
Heterotrófico	Composto Orgânico	Orgânico
Mixotrófico	Luz e composto orgânico	Inorgânico e orgânico
Foto-heterotrófico	Luz	Orgânico

Fonte: CHEN et al., 2011

Grande parte das microalgas são fotoautotróficas, necessitam de uma fonte de luz, água e nutrientes básicos para o crescimento. Dentre estes nutrientes destacam-se o carbono (inorgânico), nitrogênio e fósforo, sendo vitais para o desenvolvimento das algas, bem como, o equilíbrio entre alguns parâmetros operacionais como: controle de dióxido de carbono, remoção de oxigênio, pH, temperatura e intensidade luminosa (MATA, MARTINS, CAETANO, 2010). A utilização simultânea de uma fonte luminosa e substrato orgânico como fonte de energia, bem como o CO<sub>2</sub> e o substrato orgânico como fontes de carbono são características do cultivo mixotrófico. Em relação ao metabolismo dos organismos, a fotossíntese é a principal fonte energética, embora o carbono orgânico e o CO<sub>2</sub> sejam essenciais (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Dependendo o tipo de cultivo desenvolvido, a taxa de crescimento, a produtividade, e especialmente a composição bioquímica da biomassa poderão sofrer intensas alterações (LEE, 2004). O emprego de fontes suplementares de carbono pode potencializar a taxa de crescimento, bem como elevadas concentrações celulares, maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados e de carboidratos (CERON-GARCIA et al., 2005). Uma vez que em cultivomixotrófico o CO<sub>2</sub> e o carbono orgânico são simultaneamente assimilados, este 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 do carbono (LEE, 2004).

### 2.2.2 Carboidratos em microalgas

A produção de carboidratos por microalgas é evidenciada por diversos autores, que relataram que a síntese de compostos extracelulares e intracelulares está associada diretamente com as condições do meio em que o microrganismo se encontra e a indução de estados de estresse metabólico (CHEN et al, 2013; DE PHILIPPIS; VINCENZINI, 1998; HO et al., 2015; MARGARITES; COSTA, 2014; MIRANDA, 2011). O estado de estresse geralmente resulta na carência de nutrientes essenciais como nitrato, fosfato e/ou sulfato, mas também pode ser devido à adição de compostos tóxicos. A maioria das microalgas é fonte de proteínas quando cultivadas em meios repletos de nutrientes. Porém, se forem submetidas a condições de estresse, como a restrição de alguns nutrientes, ou adição de diferentes fontes de carbono, elas podem ser estimuladas a produzir maior concentração de componentes desejados, alterando sua composição. Quando essas técnicas são utilizadas, a microalga deixa de sintetizar proteína e sintetiza produtos de reserva, como lipídeos e carboidratos preferencialmente (DISMUKES et al., 2008).

A microalga *Spirulina* sp. apresenta em sua composição cerca de 15% de carboidratos em base seca. Porém, diferentes condições de cultivo influenciam no teor de carboidratos de microalgas. A indução do acúmulo de produtos de alto valor está associado a condições de estresse (TORZILLO; VONSHAK, 1994). A microalga *Spirulina platensis* LEB 52, cultivada em condições mixotróficas, e com diminuição de 100% da concentração de  $\text{NaNO}_3$  e aumento de 5% na concentração de NaCl, em comparação ao meio Zarrouk padrão, foi capaz de ajustar seu metabolismo a fim de apresentar elevada concentração e produtividade de carboidratos, o que demonstrou sua potencialidade para a produção de bioetanol (MARGARITES, 2014).

### 2.2.3 Microalga *Spirulina*

A *Spirulina* é uma microalga fotossintética filamentosa de forma helicoidal e coloração verde-azulada. A divisão celular desta microalga ocorre por fissão binária. A mesma pertencente à classe das *Cyanophyceae* por conter clorofila, mas de acordo com

bacteriologistas é uma bactéria por possuir estrutura procariótica (SÁNCHEZ et al., 2003). A Tabela 2 apresenta a composição celular da microalga *Spirulina platensis* em base seca. Além destes componentes, também encontram-se vitaminas, minerais e pigmentos, como os carotenos, clorofila e ficocianina (SÁNCHEZ et al., 2003).

Tabela 2 - Composição celular da microalga *Spirulina platensis* em % de matéria seca

<b>Espécie</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Carboidratos (%)</b>	<b>Lipídeos (%)</b>	<b>Ácidos nucleicos (%)</b>
<i>Spirulina platensis</i>	60 – 71	13-16	6-7	3-4

Fonte: Adaptado de Azeredo 2012

Devido ao seu alto teor de proteínas (Tabela 2) esta microalga é largamente produzida como fonte de alimento. O uso da *Spirulina* como fonte de alimento para humanos e animais ocorre há pelo menos 700 anos (RICHMOND, 2004). A primeira planta comercial de produção de *Spirulina* surgiu na década de 70, e sua produção ocorre principalmente na Ásia e nos Estados Unidos. Até a década de 90, a produção anual era cerca de 1.000 toneladas de biomassa. Com o aumento do número de plantas de produção na China e Índia na última década, a produção cresceu para 5.000 t/a e a tonelada é vendida por US\$ 10.000 ou mais dependendo da qualidade (LUNDQUIST et al., 2010).

Além de alimento rico em proteínas, estudos demonstraram que a biomassa de *Spirulina* possui alto potencial farmacêutico. Richmond (2004) citou estudos que sugerem que a utilização da *Spirulina* como fonte de alimento pode trazer inúmeros benefícios à saúde, como, por exemplo, diminuição do colesterol, melhoramento do sistema imunológico, inibição da replicação de diversos vírus.

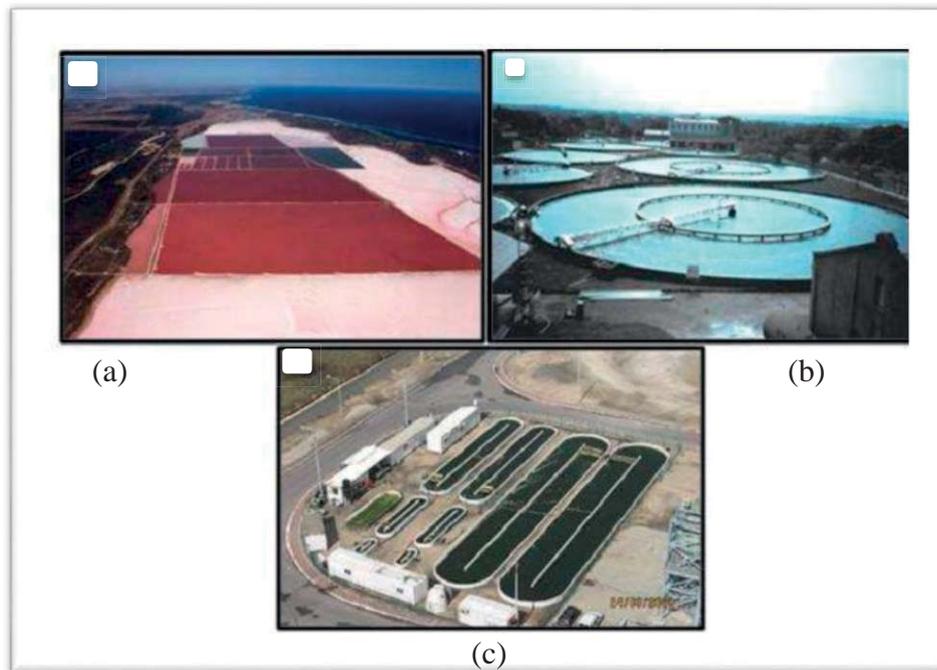
As microalgas são matérias primas que apresentam potencial e que vem sendo objeto de estudo para fins energéticos (AZEREDO, 2012; BATIST et al. 2015; CHAIKLAHAN et al. 2013; HARUN et al. 2015; MAHDY et al. 2015). A elevada produtividade das microalgas e a capacidade de acumular elevados teores de carboidratos (como é o caso da microalga *Spirulina*) torna este tipo de biomassa atrativo para servir como matéria-prima para a produção de bioetanol (MUSSATO et al, 2010).

### 2.3 Sistemas de produção de microalgas

O cultivo de microalgas pode ser executado em diversos sistemas com volumes e características diferentes, dentre os quais se destacam sistema aberto *raceway*, em águas naturais (lagos, lagoas), em lagoas artificiais, tanques, sistema *turfscrubber* ou sistemas fechados como fotobiorreatores. Algumas das vantagens do cultivo em sistema aberto é a facilidade de sua construção e operação além da facilidade e economia de sua construção em comparação aos sistemas fechados. Entretanto, alguns fatores devem ser considerados antes da escolha do sistema como: a biologia da alga, área de implantação do sistema, energia, água, nutrientes, clima e tipo de produto final desejado (BOROWITZKA, 2013; RICHMOND 2004).

A produção comercial de biomassa microalgal é limitada a poucas espécies de microalgas que podem ser cultivadas em sistemas abertos, por meio de um ambiente seletivo ou altas taxas de crescimento. A maioria das algas não pode ser mantida por muito tempo em sistemas abertos devido a riscos de contaminação por fungos, bactérias, protozoários e competição por outras microalgas que tendem a dominar a espécie original usada como inóculo (RICHMOND, 2004). Entre os diversos tipos de sistemas de lagoas abertas para a produção de biomassa de microalgas estão: lagoas abertas simples, sem nenhum aparato mecânico para realizar mistura da cultura, lagoas circulares, onde há a presença de um braço mecânico central para realizar a mistura, e os sistemas conhecidos como *high rate ponds* ou *raceway paddle wheel mixed open ponds*. Este último sistema consiste de canais independentes de circuito fechado de recirculação em que uma turbina gera um fluxo que é guiado em torno de curvas por defletores colocados no canal de fluxo - Figura 2 (AZEREDO, 2012).

Figura 2 - Sistemas de cultivo. A) Lagoas extensivas; B) Lagoas circulares; C) *Raceway paddle wheel mixed open ponds*.



Fonte: AZEREDO, 2012

Os sistemas tipo *raceway* são os mais utilizados e potencialmente os mais baratos de se construir e operar e, portanto, os mais cogitados para o cultivo de microalgas em larga escala com o intuito de fornecer matéria prima para a produção de biocombustíveis (AZEREDO, 2012).

Os sistemas fechados tendem a ser mais caros, mas levam à produção de biomassa mais controlada e de melhor qualidade. Os sistemas fechados envolvem desde sacos plásticos simples até fotobiorreatores de centenas de metros de extensão. Pode ser utilizada luz natural ou artificial, sendo que no segundo caso há mais gastos com fornecimento de energia. A decisão em utilizar luz artificial ou natural depende dos objetivos do cultivo, da qualidade esperada para a biomassa e do clima local. Em regiões de clima quente e estável, como desertos de Israel e Austrália, cultivos em fotobiorreatores expostos ao sol tem se expandido rapidamente (LOURENÇO, 2006).

Os fotobiorreatores são caracterizados pela regulação e controle de quase todos os parâmetros bióticos e abióticos importantes para o cultivo de microalgas, além de apresentarem os seguintes benefícios em relação aos sistemas abertos: reduzido risco de contaminação, não há perdas de CO<sub>2</sub> e evaporação, hidráulica e temperatura controláveis e designs técnicos flexíveis (PULZ, 1992).

Os fotobiorreatores vêm ganhando mais atenção no mundo acadêmico, onde cada vez mais este tipo de sistema de produção é utilizado em escala laboratorial e em

plantas piloto, e também comercialmente, vide as diversas empresas que utilizam os fotobiorreatores. Este fato pode estar ocorrendo devido a estes sistemas de produção apresentarem maior controle sobre os principais parâmetros que influenciam a produção de biomassa. Além disso, sistemas de produção baseados em fotobiorreatores apresentam maiores produtividades quando comparadas com os sistemas abertos. No entanto, os principais entraves para expansão plena do emprego de fotobiorreatores são os elevados custos de construção e operação (AZEREDO, 2012).

### **2.3.1 Formas de Operação do Cultivo**

Os regimes de cultivo aplicados na produção de microalgas variam de acordo com a forma de operação do sistema. De uma forma geral, os quatro tipos básicos de operação de biorreator biológico são: descontínuo, descontínuo alimentado, semi-contínuo e contínuo (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2004).

Os cultivos descontínuos são aqueles em que as células são inoculadas no meio de cultivo e nenhum outro componente é adicionado ao longo do desenvolvimento do cultivo. O conteúdo do cultivo pode ser totalmente removido em determinado momento, ou ser parcialmente retirado e aproveitado, mas o volume removido não é substituído por novo meio de cultura (LOURENÇO, 2006).

Os cultivos semicontínuos propiciam grande produção de células por intervalo de tempo. Caracteriza-se por uma parcela do meio de cultivo com as algas ser removida e substituída por meio de cultivo novo, sem células. Isso pode ser feito a qualquer momento durante o desenvolvimento do cultivo, porém, geralmente é feito após alguns dias de crescimento, quando já se formou uma biomassa relativamente grande. Não há número preestabelecido de coletas, de forma que a remoção de cultivo e a substituição por meio de cultura podem ser realizadas, em tese, sem limite. Esse procedimento acarreta curvas de crescimento com variações bruscas de densidade de células (LOURENÇO, 2006)

O processo descontínuo alimentado, também conhecido como processo por batelada alimentada, é definido como uma técnica em bioprocessos, na qual, um ou mais nutrientes são adicionados ao biorreator durante o cultivo e em que os produtos permanecem até o final da fermentação. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição pode ser de forma contínua ou intermitente. Mudanças

de volume podem ou não ocorrer, dependendo da concentração de substrato e da taxa de evaporação do sistema (SCHMIDELL et al., 2001).

O cultivo contínuo é um processo permanente de saída de cultura com as células de microalgas e entrada de meio esterilizado no recipiente de cultivo. Estabelece-se um sistema de fluxo no qual as células individuais estão suspensas em volume constante, em estado de equilíbrio dinâmico, gerado pela remoção de cultivo e adição de meio nutritivo por unidade de tempo, com tendência ao infinito. Uma vez que a constância de condições de cultivo é necessária para obter crescimento balanceado, cultivos contínuos são geralmente conduzidos com 24 horas de irradiância ao dia (LOURENÇO, 2006).

### **2.3.2 Recuperação da biomassa**

A separação das microalgas do meio de cultivo pode ser complexa, sobretudo quando a eficiência do processo tem de ser alta. Uma vez separada do meio de cultivo, não é necessário utilizar a biomassa da microalga imediatamente. Assim, procedimentos de conservação da biomassa de microalgas são desenvolvidos para viabilizar o aproveitamento destas. Esta etapa de separação das células do meio de cultura pode representar etapa laboriosa, longa ou mesmo cara, dependendo da eficiência desejada, dos materiais empregados e dos volumes envolvidos. As formas mais comuns de recuperar a biomassa são: filtração, centrifugação e floculação. E as formas de conservação: refrigeração, congelamento e secagem (LOURENÇO, 2006).

A filtração é um processo de retenção de células em membrana porosa, filtro ou tela de malha regular e controlada. É um processo eficiente e prático quando se deseja concentrar pequenos volumes de microalgas em filtros. Porém em cultivos de grande escala, a separação de maiores volumes de microalgas para posterior processamento da biomassa somente é viável se a espécie apresentar células grandes ou estrutura filamentosa (LOURENÇO, 2006). A filtração pode ser realizada através de filtro prensa ou de tambor rotativo a vácuo. Filtros prensas são comumente empregados na recuperação de biomassa de microalgas. Estes filtros têm a vantagem de funcionar em contínuo e são úteis quando a esterilidade e contenção não são rigorosas (RICHMOND, 2004).

A centrifugação é um processo simples e pode ser aplicado em qualquer tipo de microalga. A biomassa é concentrada sem a adição de produtos químicos, conservando

suas características originais. Há centrifugas de grande porte adequado para processar imensos volumes por dia. (LOURENÇO, 2006).

A floculação consiste na estimulação da agregação das células, formando flocos que podem decantar. Essa alternativa é viável para recuperar a biomassa em qualquer sistema de cultivo, entretanto geralmente é dispensada quando os volumes são pequenos, visto que há outras técnicas mais práticas, como a filtração e centrifugação. A floculação é adequada em sistemas de grande porte e pode ser espontânea ou induzida. (LOURENÇO, 2006). Células de microalgas agregadas oferecem vantagens na separação das células do meio de cultivo. Pode-se atingir a agregação de células pelo ajuste do pH ou pela adição de eletrólitos, considerado como coagulação, e a agregação como resultado da adição de polímeros é denominado floculação (RICHMOND, 2004).

## **2.4 Soro de leite**

O soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios obtido principalmente através da produção de queijos. Devido ao seu elevado valor nutricional, em média, 52% dos sólidos totais, 94% da lactose, 96% das proteínas solúveis e 38% dos minerais permanecem no soro, após a fabricação do queijo (BALDASSO, 2008) o soro pode ser utilizado na produção de bebidas lácteas, ou alimentação animal. Entretanto, por ser um produto perecível, impossibilita seu armazenamento prolongado, levando a maior parte do soro de leite produzido no Brasil a não ser aproveitada e sendo descartada como resíduo (SIQUEIRA et al., 2013). Com o aumento da produção de queijo ao longo dos anos e um controle mais rigoroso da disposição dos efluentes, o volume de soro gerado no processo de fabricação de queijo, é um dos problemas mais críticos para a indústria de laticínios.

No entanto, outras opções podem ser viáveis para o soro de leite, tornando-o um subproduto de valor na indústria. A atual alternativa tem sido destinar este volume para a produção de soro de leite em pó e compostos lácteos, bem como sua utilização como insumo para a produção de bebida láctea. O soro de leite constitui cerca de 50% das formulações de bebidas lácteas comercializadas. Contudo, segundo Baldasso et al. (2011), estima-se que somente 50% do soro é processado, sendo o restante enviado para outros destinos.

O soro lácteo é um subproduto de relevante importância, por conter em sua composição de 93% a 95% de água, 3,8% a 4,2% de lactose, 0,8% a 1% de proteínas e

0,7% a 0,8% de minerais (PAGNO et al., 2009). Para cada litro de soro desperdiçado perdem-se cerca de 50 g de lactose e 10 g de proteína com elevado valor nutricional (DOMINGUES et al., 1999). Logo, propor alternativas técnicas para um melhor aproveitamento do soro de leite é um desafio para melhorar a rentabilidade e competitividade da cadeia do leite.

A aplicação do soro em pó bruto em alimentos possui algumas limitações, pois o conteúdo de lactose e sais minerais é muito elevado. Devido a isso, a melhor alternativa para o processamento em soro é o seu fracionamento. A utilização do soro através do fracionamento e concentração dos seus componentes (lactose e proteínas principalmente) possui a vantagem de eliminar a necessidade de tratamento deste material como resíduo pela indústria e surgem novos produtos, como os concentrados de proteínas do soro (CPS) ou isolados de proteínas do soro (IPS) (CARLOS, 1997).

Os CPSs são produtos constituídos com mais de 80% de proteínas (em base seca). Estas proteínas têm alto valor biológico e possuem todos os aminoácidos essenciais para todas as faixas etárias (SGARBIERI, 2004). Deste modo, fracionar o soro de leite para separar e purificar as suas proteínas constitui excelente estratégia para valorização deste subproduto da indústria de laticínios.

Pagno et al (2009) realizaram experimentos em uma unidade piloto com o objetivo de concentrar e purificar as proteínas do soro através da ultrafiltração em duas etapas distintas, a primeira em modo batelada com a finalidade de concentração e a segunda pela diafiltração para a purificação. A membrana utilizada foi polietersulfona em módulo espiral fabricada pela *Koch Membrane Systems*, possuindo massa molecular de corte de 10 kDa. Produziram um concentrado (retido) que continha todas as proteínas do soro (CPS) e um ultrafiltrado (permeado) formado da maior parte de água, originalmente encontrada no soro, e contendo ainda, grande parte da lactose, minerais, vitaminas e outros constituintes do leite de baixo peso molecular. Este permeado é o resíduo gerado no processo de ultrafiltração e nanofiltração do soro de leite.

Tem sido realizados estudos para o reaproveitamento do soro (BALDASSO, BARROS, TESSARO, 2011; PAGNO et al, 2009; SIQUEIRA et al, 2013), porém neste estudo buscamos utilizar os nutrientes presentes no resíduo do concentrado proteico do soro de leite como fonte de nutrientes em processos biotecnológicos e a lactose presente pode ser utilizada como fonte alternativa de carbono em cultivos mixotróficos da microalga *Spirulina*. O emprego do cultivo mixotrófico pode levar as células à síntese de compostos característicos, como carboidratos e lipídeos, bem como pode

implicar em altas taxas de produção de biomassa (CERON-GARCIA et al., 2005), tornando-se uma boa alternativa quando o objetivo é a produção de bioetanol.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

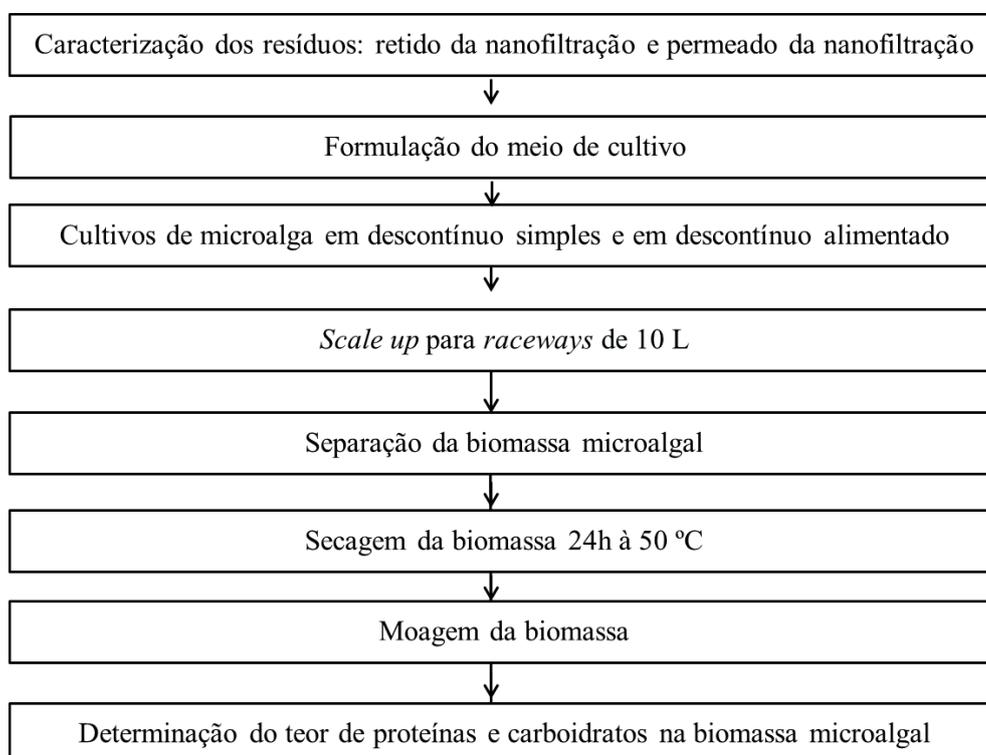
A Figura 3 apresenta o fluxograma geral da metodologia utilizada neste trabalho.

A caracterização dos resíduos do processo de ultrafiltração e nanofiltração do soro de leite foi realizada a fim de caracterizar posteriormente a influência da adição destes no meio de cultivo da microalga *Spirulina platensis*. Foram realizados experimentos em escala laboratorial em modo descontínuo e descontínuo simples para o cultivo da microalga *Spirulina platensis*.

As condições de trabalho que apresentaram melhores resultados em escala laboratorial de produção de biomassa e carboidratos intracelulares foram utilizados para o estudo do aumento de escala em mini tanques de 10 L.

As variáveis de resposta foram os parâmetros de crescimento (velocidade específica de crescimento, tempo de geração, concentração celular máxima), pH dos cultivos, bem como as composições intracelulares de proteínas e carboidratos.

Figura 3: Fluxograma geral da metodologia utilizada



### 3.1 Microrganismo, manutenção do inóculo e meio de cultivo

A microalga utilizada neste estudo foi a *Spirulina platensis* LEB 52, disponível no Laboratório de Fermentações do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo (UPF). Os inóculos desta microalga foram mantidos em meio Zarrouk, a 30 °C, com fotoperíodo de 12 h claro/escuro.

O meio de cultivo padrão para o cultivo da microalga *Spirulina* foi o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) (Tabela 3) sendo que os inóculos foram adaptados, por 10 d em concentrações inferiores à concentração padrão (20% ou 30%)(Tabela 3) para os ensaios subsequentes.

Tabela 3 - Composição de nutrientes das diferentes concentrações de meio Zarrouk.

Componente	Concentração (padrão)* (g.L <sup>-1</sup> )	Concentração 20% (g.L <sup>-1</sup> )	Concentração 30% (g.L <sup>-1</sup> )
NaHCO <sub>3</sub>	16,8	3,36	5,04
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	0,1	0,15
NaNO <sub>3</sub>	2,5	0,5	0,75
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	0,2	0,3
NaCl	1,0	0,2	0,3
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2	0,04	0,06
CaCl <sub>2</sub>	0,04	0,008	0,012
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01	0,002	0,003
EDTA	0,08	0,016	0,024

\*Fonte: ZARROUK (1966).

O permeado da ultrafiltração e retido da nanofiltração do soro de leite foram cedidos pelo Laboratório de Operações Unitárias da UPF. Foi realizado o processo de concentração das proteínas do soro de leite em membrana de ultrafiltração, aplicando-se pressão de 2 bar. A membrana é de poliamida, configuração espiral, com peso molecular de corte de 10 kDa e área de 1,8 m<sup>2</sup> (modelo 2538-K131-VYV), do fabricante

*Koch Membrane Systems*. Durante a ultrafiltração, foram geradas duas correntes: de retido da ultrafiltração, rico em proteínas, e de permeado, rico em lactose e sais. A corrente retida foi seca em *spray-dryer*, gerando o concentrado proteico de soro de leite. O permeado passou também por processo de nanofiltração para obtenção de uma fração mais concentrada dos compostos, aplicando-se pressão de 20 bar na membrana de nanofiltração. A membrana utilizada é de poliamida, configuração espiral, com peso molecular de corte de 200 Da e área de 1,8 m<sup>2</sup> (modelo 2538-SR3D-VYV) da *Koch Membrane Systems*.

O permeado da ultrafiltração e o retido da nanofiltração são os resíduos gerados nos processos. Estes resíduos foram utilizados na composição do meio de cultivo da microalga *Spirulina platensis* LEB 52.

Os resíduos foram avaliados segundo os teores de proteínas, lactose, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio amoniacal total e sais. A determinação de proteínas foi realizada pelo método Kjehdal (AOAC, 2005), a lactose pelo método de Felhing (MAPA, 2006). O teor de sais foi determinado por secagem em estufa e mufla a 500° (AOAC, 1995). Magnésio e cálcio foram determinados por absorção atômica (AOAC, 1980). Potássio e sódio foram determinados por espectrofotômetro de chama e o teor de gorduras por espectroscopia no infravermelho próximo (APHA, 1995). A DQO e o nitrogênio amoniacal total foram determinados seguindo os métodos de colorimetria 5220 D e 4500 NH<sub>3</sub>-C, respectivamente (APHA, 1995).

O objetivo foi utilizar o resíduo associado ao meio Zarrouk para o cultivo da microalga *Spirulina platensis*. Um teste preliminar para verificar se a adição do resíduo ao meio de cultivo alterava o pH do meio Zarrouk foi realizado, uma vez que a *Spirulina* se desenvolve em pH entre 8,5 e 9,5. O pH dos resíduos é  $6,66 \pm 0,02$ , enquanto que o pH do meio Zarrouk é  $9,95 \pm 0,16$ . Ao adicionar até 50% de resíduo no meio Zarrouk 20% o pH ficou na faixa desejada, próximo a 9,5. A partir deste teste inicial foi definida a utilização de meio Zarrouk 20% e 30% e com concentração baixa de resíduo.

### **3.2 Biorreatores e condições de cultivos**

Para avaliar os efeitos das concentrações do meio Zarrouk e volumes adicionados dos resíduos (provenientes dos processos de ultrafiltração e nanofiltração

do soro de leite) no teor de carboidratos e proteínas da biomassa da microalga, foram realizados quatro Planejamentos Fatoriais  $2^13^1$ , para cada modo de condução do cultivo (descontínuo e descontínuo alimentado) e para cada tipo de resíduo (retido da nanofiltração e permeado da ultrafiltração). Os experimentos foram realizados em duplicata.

O permeado da ultrafiltração e o retido da nanofiltração constituíram a fonte de carbono orgânica dos meios de cultivo e foram adicionados, inicialmente, em modo descontínuo, seguindo delineamento experimental apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Matriz dos Delineamentos experimentais dos cultivos em modo descontínuo

<b>Ensaio</b>	<b>Zarrouk (% v/v)</b>	<b>Resíduo (% v/v)</b>
<i>Fonte de carbono: Resíduo da nanofiltração</i>		
N <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,0
N <sub>2</sub>	(+1)30	(-1) 0,0
N <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 4,0
N <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 4,0
N <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 10,0
N <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 10,0
<i>Fonte de carbono: Resíduo da ultrafiltração</i>		
U <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,0
U <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,0
U <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 4,0
U <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 4,0
U <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 10,0
U <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 10,0

Posteriormente, foram realizados os cultivos com a adição dos resíduos em modo batelada alimentada, e os volumes adicionados foram 1,25% v/v e 2,5% v/v por batelada, também seguindo o delineamento experimental (Tabela 5). A adição de resíduo foi iniciada quando a concentração celular da microalga *Spirulina* atingiu 0,30 g.L<sup>-1</sup>. A determinação de lactose foi utilizada como indicador da concentração restante de açúcares provenientes da lactose nos cultivos. O resíduo foi adicionado sempre que a concentração de açúcares resultava inferior a 0,15 g.L<sup>-1</sup> com volume definido pelo planejamento experimental.

Tabela 5- Matriz experimental dos Delineamentos  $2^1.3^1$  dos ensaios em modo descontínuo alimentado

<b>Ensaio</b>	<b>Zarrouk (% v/v)</b>	<b>Resíduo (% v/v)</b>
<i>Fonte de carbono: Permeado da nanofiltração</i>		
N <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,00
N <sub>2</sub>	(+1)30	(-1) 0,00
N <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 1,25
N <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 1,25
N <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 2,50
N <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 2,50
<i>Fonte de carbono: Retido da ultrafiltração</i>		
U <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,00
U <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,00
U <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 1,25
U <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 1,25
U <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 2,50
U <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 2,50

Cultivos controle realizados com meio Zarrouk padrão (100%) e com a adição de resíduo foram realizados (Tabela 6).

**Tabela 6:** Dados dos Ensaio Controles

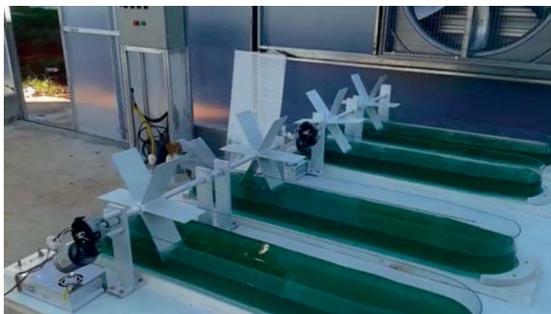
<b>Ensaio</b>	<b>Zarrouk (%)</b>	<b>Resíduo (% v/v/)</b>	<b>Fonte de carbono</b>
C <sub>1</sub>	100	0,00	-
<i>Modo batelada alimentada</i>			
C <sub>2</sub>	100	1,25	Resíduo da nanofiltração
C <sub>3</sub>	100	2,50	Resíduo da nanofiltração
C <sub>4</sub>	100	1,25	Resíduo da ultrafiltração
C <sub>5</sub>	100	2,50	Resíduo da ultrafiltração
<i>Modo descontínuo</i>			
C <sub>6</sub>	100	4,00	Resíduo da nanofiltração
C <sub>7</sub>	100	10,00	Resíduo da nanofiltração
C <sub>8</sub>	100	4,00	Resíduo da ultrafiltração
C <sub>9</sub>	100	10,00	Resíduo da ultrafiltração

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores fechados tipo erlenmeyer de 1 L e com concentração celular inicial de  $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ , com agitação constante através da aeração provida por bombas de diafragma. Os cultivos foram incubados em estufa termostatizada não estéril com fotoperíodo 12 h claro/escuro, e luminosidade de 2000 lux.

De acordo com as melhores condições experimentais definidas pelos Delineamentos Fatoriais nos fotobiorreatores de escala laboratorial, foi realizado o *scaleup* em fotobiorreatores abertos tipo *raceways pounds* de 10 L (Figura 4),

localizados em planta piloto localizada nas dependências do Parque Tecnológico Industrial da UPF.

Figura 4 - Tanques de cultivo tipo *Raceways pounds*



Nos *raceways pounds* a agitação mecânica foi realizada por meio de pás sendo a velocidade nas extremidades das pás de  $0,35 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , a qual foi definida por Magro (2015), como melhor velocidade para acúmulo de carboidratos em testes realizados anteriormente. Os cultivos foram conduzidos em estufa de filme transparente, em condições ambientais não controladas, com temperatura entre  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e a radiação solar média foi  $590,75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (sendo considerado as transmissividades da tela anti-granizo (82%) e dos plástico filme (80%)). Os ensaios A e B (Tabela 7), nos quais não houve adição de resíduo foram operados em modo descontínuo e o ensaio C, com adição do permeado da ultrafiltração, em modo descontínuo alimentado.

Tabela 7 - Cultivos realizados nos *Raceways* de 10 L

Ensaio	Zarrouk (%)	Resíduo (% v/v)	Modo de cultivo
A	20	-	Descontínuo
B	30	-	Descontínuo
C	20	2,5%	Batelada alimentada

Os cultivos foram encerrados no início da fase estacionária. A biomassa dos cultivos foi recuperada através de filtração à vácuo em tela de poliéster de 180 fios, e foi seca em estufa a  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h, sendo posteriormente utilizada para as determinações analíticas.

### 3.3 Determinações analíticas

#### 3.3.1 Concentração celular

A concentração celular foi avaliada nos cultivos a partir de relações pré-estabelecidas entre a massa seca e a absorbância dos cultivos a 670 nm. Nos cultivos em modo batelada alimentada foi determinada a cada 2 dias, e nos cultivos em modo descontínuo, a cada 24 h.

#### 3.3.2 Parâmetros cinéticos de crescimento

Curvas de concentração celular em função do tempo foram construídas, a partir das quais foram obtidas a concentração celular final ( $X_{\text{final}}$ ) e a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ) para cada experimento.

A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada a partir da integração da Equação 1, por regressão exponencial dos dados de concentração celular *versus* tempo na fase logarítmica de crescimento, resultando na Equação 2. Sendo:  $\mu_{\text{max}}$ : velocidade específica máxima de crescimento ( $d^{-1}$ );  $X_1$ : Concentração de células no início da fase exponencial de crescimento ( $g.L^{-1}$ );  $X_2$ : Concentração de células no fim da fase exponencial de crescimento ( $g.L^{-1}$ );  $\Delta t$ : tempo de duração da fase exponencial de crescimento (d)

$$\mu_{\text{max}} = \left(\frac{1}{x}\right) \cdot \left(\frac{dx}{dt}\right) \quad (1)$$

$$\mu_{\text{max}} = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{X_2}{X_1} \quad (2)$$

#### 3.3.3 pH

A cada 2 dias o pH foi determinado nos cultivos em modo batelada alimentada e a cada 24h nos cultivos em modo descontínuo, a partir de pHmetro digital previamente calibrado.

### 3.3.4 Lactose

A concentração de lactose foi determinada através do método 3,5 DNS(MILLER, 1959) e foi realizada cada 2 dias nos cultivos em batelada alimentada e a cada 24 h nos cultivos em modo descontínuo.

### 3.3.5 Concentração de carboidratos intracelulares na microalga *Spirulina* LEB 52

Após a recuperação e secagem da biomassa, foi determinada a concentração de carboidratos totais na biomassa. Na biomassa obtida dos ensaios conduzidos em modo batelada alimentada esta concentração foi determinada pelo método descrito por Margarites e Costa (2014), e na biomassa proveniente dos cultivos em modo descontínuo determinada pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956).

A produtividade em carboidratos biomassa microalgal foi determinada de acordo com a Equações 3. Sendo: CHO: teor de carboidratos na biomassa seca (%),  $X_{final}$ : concentração celular final de microalga ( $g.L^{-1}$ ) e  $\Delta t$ : tempo de cultivo até atingir  $X_{final}$  (d).

$$P(g.L^{-1}.d^{-1}) = \frac{CHO \times X_{final}}{\Delta t} \quad (3)$$

### 3.3.6 Concentração de proteínas intracelulares na microalga *Spirulina* LEB 52

O teor de proteínas na biomassa seca foi determinado pelo método Kjeldahl, utilizando como fator de conversão de 5,22, específico para cianobactérias (LOURENÇO et al., 2006), para os cultivos realizados em batelada alimentada, e pelo método proposto por Lowry et al. (1951), nos cultivos realizados modo descontínuo.

A produtividade em proteínas da biomassa microalgal foi determinada de acordo com a Equação 4. Sendo PROT: teor de proteínas na biomassa seca (%),  $X_{final}$ : concentração celular final de microalga ( $g.L^{-1}$ ) e  $\Delta t$ : tempo de cultivo até atingir  $X_{final}$  (d).

$$P(g.L^{-1}.d^{-1}) = \frac{PRO \times X_{final}}{\Delta t} \quad (4)$$

### **3.2.7 Tratamento dos dados**

As variáveis independentes foram a concentração de meio Zarrouk e a concentração de resíduo utilizado. As variáveis de resposta foram: concentração celular, velocidade específica máxima de crescimento, teor de carboidratos e proteínas, produtividade de carboidratos e proteínas. As diferenças entre as médias foram avaliadas pela Análise de Variância no nível de 95% de confiança e com posterior comparação entre estas pelo Teste de Tukey.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para viabilizar o cultivo de microalga como matéria-prima para a produção de etanol, é necessário que a microalga possua elevados teores de carboidratos, e ainda, que as condições de cultivo escolhidas permitam elevadas concentrações de biomassa, a fim de que o custo de sua produção não seja elevado.

Cultivos em modo batelada alimentada e em modo descontínuo foram realizados com a finalidade de comparação da concentração celular e produtividade em carboidratos e proteínas, considerando as vantagens e desvantagens de cada modo de operação. O modo descontínuo é mais asséptico e possui mais facilidade na sua operação. Enquanto que em batelada alimentada, a microalga tem sua fase de adaptação ao resíduo, podendo consumir maiores quantidades de resíduo.

### 4.1 Caracterização do resíduo

Para a viabilização de cultivos algais, é necessário avaliar o papel de diferentes elementos químicos no crescimento e na produtividade dos microrganismos, pois definem os componentes essenciais nos meios de cultivo. Esse aspecto é importante no caso de empreendimentos comerciais (LOURENÇO, 2006). Assim, realizou-se a caracterização dos resíduos utilizados neste estudo (Tabela 4). Observou-se que apesar de serem resíduos oriundos de processos distintos (ultrafiltração e nanofiltração) apresentaram composição química semelhante. O resíduo de nanofiltração, devido ao fato de ter sido submetido a um processo de concentração, apresentou maiores teores de lactose, cálcio e magnésio que o resíduo da ultrafiltração (Tabela 4).

Tokusoglu e Ünal (2003) determinaram o conteúdo mineral da *Spirulina platensis* e as amostras eram ricas em K (1412,9 mg), Na (929,4 mg), Ca (826,3 mg), P (750,7 mg), Mg (388,9 mg) como média. Teores médios de outros elementos minerais foram determinados, tais como Fe (95,37 mg), Mn (4,29 mg), Zn (2,68), Cu (0,31 mg), Se (0,12 mg), Cr (0,11 mg) e Cd (0,02 mg). A maioria desses minerais estão presentes nos resíduos utilizados (Tabela 5). Mg e Fe são frequentemente relatados como nutrientes limitantes, e K é considerado um nutriente importante, devido sua abundância na biomassa de microalgas (TOKUSOGLU; ÜNAL, 2003).

As membranas de nanofiltração e ultrafiltração apresentam diferentes rejeições, sendo que a membrana de ultrafiltração retém compostos até 0,05  $\mu\text{m}$ , enquanto que a

de nanofiltração retém compostos de até 0,005  $\mu\text{m}$ . Além do tamanho molecular, as membranas apresentam retenção em relação à força eletrostática das moléculas, comportamento conhecido como *Donnan Effect* (SCHAFER, RICHARD, 2005 *apud* BRIÃO et al., 2014), assim a membrana de nanofiltração apresenta boa rejeição para íons bivalentes, mas em relação aos íons monovalentes, como o sódio e potássio, a retenção é menor, isso explica as concentrações de sódio e potássio serem menores no resíduo da nanofiltração.

Tabela 8 - Caracterização dos resíduos de soro de leite nanofiltrado e ultrafiltrado.

	<b>Retido da nanofiltração</b>	<b>Permeado da ultrafiltração</b>
Sais (%)	0,33 $\pm$ 0,16	0,14 $\pm$ 0,07
Gordura (%)	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01
Proteína (%)	0,33 $\pm$ 0,19	0,25 $\pm$ 0,23
Lactose (%)	7,18 $\pm$ 2,26	3,73 $\pm$ 1,38
Sólidos Totais(%)	9,65 $\pm$ 0,63	5,49 $\pm$ 0,68
Ca (mg.L <sup>-1</sup> )	502,96 $\pm$ 9,90	325,00 $\pm$ 20,63
Mg (mg.L <sup>-1</sup> )	118,20 $\pm$ 1,41	87,05 $\pm$ 2,19
Na (mg.L <sup>-1</sup> )	267,62 $\pm$ 2,85	907,48 $\pm$ 31,30
K (mg.L <sup>-1</sup> )	779,92 $\pm$ 147,69	1646,49 $\pm$ 59,71
Nitrogênio amoniacal total (mg.L <sup>-1</sup> )	107,10 $\pm$ 4,95	66,85 $\pm$ 2,47
Demanda química de Oxigênio (DQO, g.L <sup>-1</sup> )	96,63 $\pm$ 2,65	55,65 $\pm$ 2,10

\*Média  $\pm$  desvio padrão.

Uma comparação entre o meio Zarrouk, o permeado da ultrafiltração e o retido da nanofiltração foi realizada. A principal diferença entre eles, é que o meio Zarrouk contém fontes de fosforo, potássio e nitrogênio. Estes componentes estão presentes no meio Zarrouk e ausentes nos resíduos. Além disso, ambos os resíduos fornecem uma fonte de carbono orgânico, enquanto que no meio Zarrouk há apenas carbono na forma inorgânica (NaCO<sub>3</sub>). Os resíduos possuem nitrogênio amoniacal em sua composição, enquanto que no meio Zarrouk, nitrato de sódio é a única forma de nitrogênio disponível.

O nitrogênio é o segundo elemento mais importante na composição da biomassa, e no caso de cultivos de cianobactérias para uso comercial, normalmente é adicionado na forma de nitrato de sódio. Esta escolha é realizada pela facilidade de operação e da garantia de uma concentração celular máxima. Entretanto, esta fonte de nitrogênio, em geral, possui custo elevado quando comparado a compostos de amônia. Estes últimos, em solução, liberam íons de amônia que, em soluções alcalinas, tornam-se amônia e, portanto podem ser tóxicos, se utilizados em elevadas concentrações. Por esta razão,

recomenda-se que apenas a quantidade necessária para sustentar o crescimento de células deve ser fornecido, e de preferencia adicionado diariamente em modo batelada alimentada (FERREIRA et al., 2012). Neste estudo, ambos os resíduos foram adicionados em modo descontínuo simples, e em modo descontínuo alimentado. Em modo descontínuo simples, a concentração de resíduo foi baixa (4,0% e 10,0%) e em modo alimentado foi adicionado 1,25% e 2,25% de resíduo em cada batelada. Desta maneira, a quantidade de amônia presente nos resíduos, e conseqüentemente, adicionada aos cultivos de microalgas, não causou toxicidade para as células.

## **4.2 Concentração celular e parâmetros cinéticos de crescimento**

### **4.2.1 Cultivos em modo descontínuo simples**

Os cultivos adicionados de resíduo da nanofiltração (DN<sub>3</sub>, DN<sub>5</sub> e DN<sub>6</sub>) apresentaram concentração celular final inferior aos ensaios sem a adição do resíduo ( $p < 0,05$ ), exceto o ensaio DN<sub>4</sub> (1,75 g.L<sup>-1</sup>), que apresentou concentração celular estatisticamente igual ao ensaio DN<sub>1</sub> e DN<sub>2</sub> (2,17 g.L<sup>-1</sup> e 1,72 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente). A adição dos resíduos nas concentrações de 10% (DN<sub>5</sub> e DN<sub>6</sub>) pode ter ocasionado estresse celular, e de acordo com Schmdell et al (2002) esta uma das desvantagens citadas pela literatura para os cultivos operados em modo descontínuo. Além disso, a adição de águas residuais aos meios de cultivo resulta em diminuição da penetração da luz, e portando em redução de taxa fotossintética (DEPRAETERE et al., 2013), o que explica o fato dos cultivos sem adição de resíduo e cultivadas somente com Zarrouk 20% e 30% (DN<sub>1</sub>-2,17 gL<sup>-1</sup>; DN<sub>2</sub>- 1.72 gL<sup>-1</sup>; DU<sub>1</sub> - 3.47 gL<sup>-1</sup>; DU<sub>2</sub>, 1,95 g.L<sup>-1</sup>) obterem as maiores concentrações celulares finais.

O resíduo é uma fonte de carbono alternativa no cultivo da microalga *Spirulina*, e aliado às baixas concentrações de nutrientes utilizadas no meio Zarrouk nestas condições (DN<sub>3</sub>, DN<sub>5</sub>, DN<sub>6</sub>), ocasionou estresse na microalga, o que justifica as baixas concentrações celulares e elevadas concentrações de carboidratos obtidas neste modo de cultivo. Ao comparar estes ensaios com os ensaios controles (Figura 7), nos quais foi utilizado o meio Zarrouk padrão adicionado de 4% e 10% de resíduo da nanofiltração (DC<sub>2</sub> e DC<sub>3</sub>), nota-se que a concentração celular final nos cultivos controles foi igual estatisticamente ao cultivo sem adição de resíduo (controle DC<sub>1</sub>), o que demonstra que a adição do resíduo, mesmo na máxima concentração do meio Zarrouk, não ocasionou

interferências na concentração de células. Nos cultivos adicionados de resíduo da ultrafiltração (Tabela 9) percebe-se um comportamento similar em relação à concentração celular final, sendo que nos ensaios sem adição de resíduo (DU<sub>1</sub> e DU<sub>2</sub>) atingiram as maiores concentrações de células ao final do cultivo, em comparação com os ensaios adicionados do permeado da ultrafiltração. Essa concentração celular elevada não está relacionada somente com a concentração de nutrientes do meio de cultivo, mas também com outros fatores que influenciam no crescimento celular da microalga, tais como: intensidade luminosa, agitação, pH e temperatura (MIAO; WU, 2004).

Tabela 9 - Velocidades específicas de crescimento, concentrações celulares máximas e duração da fase exponencial de crescimento obtido nos ensaios dos planejamentos experimentais realizados em modo descontínuo simples.

Ensaio	Zarrouk (% v/v)	Resíduo (% v/v)	$\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> )	Intervalo da fase log	Duração da fase log (d)	R <sup>2</sup>	X final (g.L <sup>-1</sup> )
<b>Fonte de carbono: Retido da nanofiltração</b>							
DN <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,0	0,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	7-16	9	0,94	2,17 ± 0,34 <sup>b</sup>
DN <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,0	0,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	7-16	9	0,95	1,72 ± 0,24 <sup>b</sup>
DN <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 4,0	0,14 ± 0,00 <sup>a</sup>	5-10	5	0,66	1,11 ± 0,07 <sup>a</sup>
DN <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 4,0	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	5-12	7	0,65	1,75 ± 0,43 <sup>b</sup>
DN <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 10,0	0,16 ± 0,06 <sup>ab</sup>	6-9	3	0,60	0,35 ± 0,18 <sup>a</sup>
DN <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 10,0	0,26 ± 0,01 <sup>b</sup>	6-9	3	0,97	0,91 ± 0,04 <sup>a</sup>
<b>Fonte de carbono: Permeado da ultrafiltração</b>							
DU <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,0	0,11 ± 0,01 <sup>A</sup>	5-18	13	0,96	3,47 ± 0,25 <sup>D</sup>
DU <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,0	0,09 ± 0,01 <sup>A</sup>	7-25	18	0,96	1,95 ± 0,03 <sup>C</sup>
DU <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 4,0	0,18 ± 0,02 <sup>A</sup>	2-9	7	0,86	1,03 ± 0,08 <sup>AB</sup>
DU <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 4,0	0,23 ± 0,06 <sup>A</sup>	2-8	6	0,93	0,91 ± 0,12 <sup>AB</sup>
DU <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 10,0	0,17 ± 0,08 <sup>A</sup>	1-11	10	0,87	1,25 ± 0,23 <sup>B</sup>
DU <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 10,0	0,22 ± 0,13 <sup>A</sup>	2-6	4	0,80	0,55 ± 0,07 <sup>A</sup>
<b>Dados dos Ensaio Controles</b>							
DC <sub>1</sub>	100	0,0	0,10 ± 0,01 <sup>ab</sup>	5-19	14	0,98	1,93 ± 0,21 <sup>b</sup>
<b>Fonte de carbono: Retido da nanofiltração</b>							
DC <sub>2</sub>	100	4,0	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	8-48	40	0,91	2,64 ± 0,09 <sup>b</sup>
DC <sub>3</sub>	100	10,0	0,25 ± 0,03 <sup>c</sup>	6-8	2	0,82	1,79 ± 0,54 <sup>b</sup>
<b>Fonte de carbono: Permeado da ultrafiltração</b>							
DC <sub>4</sub>	100	4,0	0,08 ± 0,02 <sup>ab</sup>	3-22	19	0,79	2,5 ± 0,60 <sup>b</sup>
DC <sub>5</sub>	100	10,0	0,18 ± 0,00 <sup>c</sup>	1-8	7	0,74	0,56 ± 0,09 <sup>a</sup>

\*Média ± desvio padrão, (n = 2). Letras minúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios que utilizaram o resíduo da nanofiltração. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios que utilizaram o resíduo da ultrafiltração. Letras minúsculas e em negrito iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança nos ensaios controles.

Ao comparar os ensaios adicionados de resíduo da ultrafiltração e os ensaios controles adicionados deste mesmo resíduo, percebe-se que o crescimento celular final foi maior nos cultivos onde foi adicionado menor teor de resíduo e com meio de cultivo

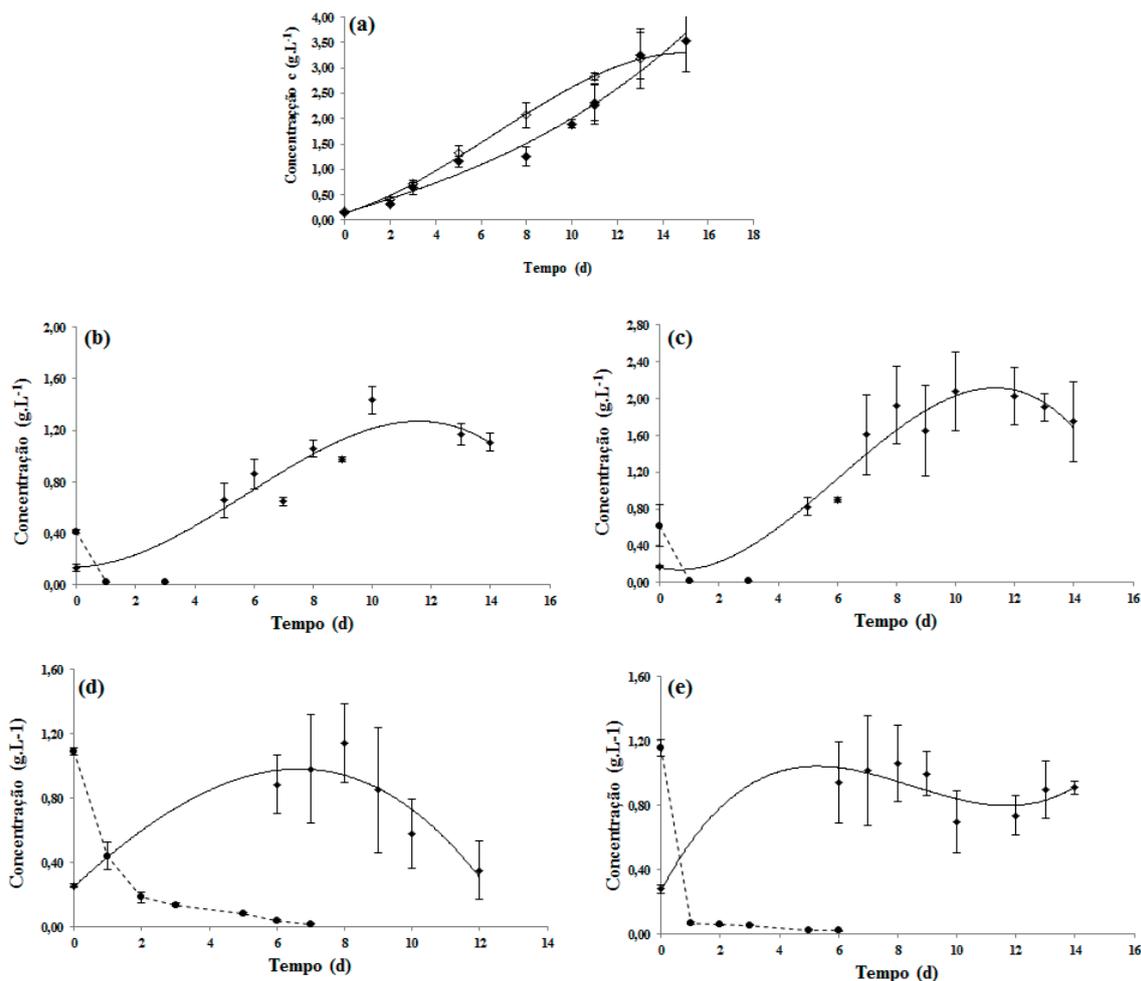
padrão (DU<sub>3</sub>, DU<sub>4</sub>, DC<sub>4</sub>). O permeado da ultrafiltração fornece uma fonte adicional de nitrogênio à microalga, na forma de nitrogênio amoniacal. No entanto, no meio Zarrouk padrão o nitrogênio é disponibilizado na forma de nitrato de sódio. Este nitrogênio amoniacal, em soluções alcalinas e em concentrações elevadas pode sofrer alterações e liberar íons de amônia, causando toxicidade às células. Isto explica, porque a concentração celular final do ensaio DC<sub>4</sub> foi maior que do ensaio DC<sub>5</sub>. No ensaio DC<sub>4</sub>, a concentração de resíduo, e conseqüentemente, a concentração de nitrogênio amoniacal, fez com que a microalga aumentasse sua concentração celular. Enquanto que ao adicionar 10% do resíduo (DC<sub>5</sub>), esta concentração de nitrogênio amoniacal disponível causou toxicidade às células, e por isso atingiram concentrações celulares finais inferiores. O mesmo vale para os ensaios DN<sub>6</sub> e DU<sub>6</sub>, que obtiveram 0,91 g.L<sup>-1</sup> e 0,55 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 9).

Nas Figuras 5 e 6 estão apresentados os gráficos de concentração celular *versus* o tempo de cultivo dos ensaios em modo descontínuo simples. O intervalo da fase exponencial apresentou elevada variação entre os ensaios, inclusive nos cultivos controles, o que também indica o estresse da microalga ao se adaptar a fonte de carbono alternativa adicionada (os resíduos da nanofiltração e resíduo da ultrafiltração). Nos ensaios DN<sub>5</sub> e DN<sub>6</sub>, que foram adicionados de 10% de resíduo da nanofiltração, a duração da fase exponencial de crescimento foi apenas 3 dias. Este fato deve-se, possivelmente ao elevado teor de resíduo adicionado no meio de cultivo. O resíduo da nanofiltração possui maiores teores de cálcio e magnésio do que o resíduo da ultrafiltração, e esta característica influenciou o tempo que a microalga permaneceu na fase exponencial, sendo que esta foi maior nos ensaios adicionados de resíduo da ultrafiltração (DU<sub>5</sub> e DU<sub>6</sub>).

As velocidades específicas máximas de crescimento foram estatisticamente maiores nos ensaios realizados com maiores concentrações de resíduo da nanofiltração (10%) (DN<sub>5</sub> e DN<sub>6</sub>) (Tabela 9). Nos ensaios adicionados de resíduo da ultrafiltração as velocidades específicas máximas de crescimento não apresentaram diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ). Entre os ensaios controles realizados, foram obtidas as maiores velocidades máximas de crescimento nos ensaios que utilizaram 10% de resíduo, tanto para o permeado da ultrafiltração, quanto para o retido da nanofiltração. A velocidade específica máxima de crescimento pode variar em função da intensidade de luz, e a intensidade de luz não é uniforme em todo o biorreator (LEE, ERICSON E YANG; 1986).

Na Figura 5 percebe-se que a microalga consumiu o retido da nanofiltração em poucos dias, sendo que este substrato foi consumido em 3 d nos ensaios DN<sub>3</sub> e DN<sub>4</sub> (Zarrouk 20%, 4,00% de retido da NF e Zarrouk 30%; 4,00% de retido da NF, respectivamente), enquanto que nos ensaios DN<sub>5</sub>(Zarrouk 20%, 10,0% de retido da NF) e DN<sub>6</sub> (Zarrouk 30%, 10,0% de retido da NF), o resíduo foi consumido pela microalga em 7 e 6 d respectivamente. Quanto maior a concentração de resíduo adicionada, maior foi o tempo necessário para a microalga consumir estes nutrientes. Nos ensaios controles realizados DC<sub>2</sub> e DC<sub>3</sub>, com meio Zarrouk padrão e adição de 4,0% e 10,0%, respectivamente o tempo de consumo do substrato foi de 5 e 3 dias.

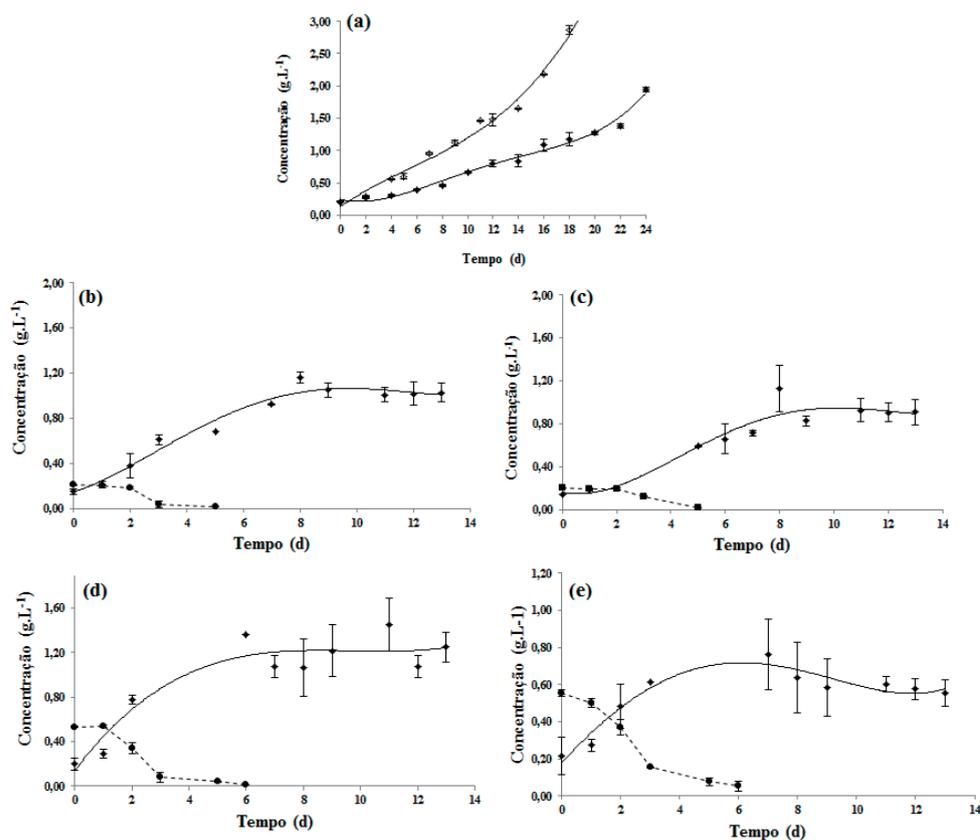
Figura 5 - Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de lactose em função tempo para os cultivos da microalga *Spirulina platensis* realizados com adição de retido da nanofiltração (NF) de soro de leite em modo descontínuo simples.



Ensaios DN<sub>1</sub> (Zarrouk 20%;  $\diamond$ ) e DN<sub>2</sub> (Zarrouk 30%;  $\blacklozenge$ ) - (a); ensaio DN<sub>3</sub> (Zarrouk 20%, 4,00% de retido da NF) - (b); ensaio DN<sub>4</sub> (Zarrouk 30%; 4,00% de retido da NF) - (c); ensaio DN<sub>5</sub> (Zarrouk 20%, 10,0% de retido da NF) - (d); ensaio DN<sub>6</sub> (Zarrouk 30%, 10,0% de retido da NF) - (e); sendo ( $\blacklozenge, \diamond$ ) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e ( $\bullet$ ) concentração de lactose.

A microalga consumiu o permeado da ultrafiltração em poucos dias (Figura 6), porém este substrato foi consumido mais lentamente se comparado com o retido da nanofiltração (Figura 5). O permeado da ultrafiltração foi absorvido pela microalga em 5 dias nos ensaios DU<sub>3</sub>, DU<sub>4</sub> e DC<sub>4</sub>, sendo que todos estes ensaios foram adicionados de 4,0% deste resíduo. Os ensaios DU<sub>5</sub> e DC<sub>5</sub>, apresentaram tempo de consumo de 5 d, enquanto que no ensaio DU<sub>6</sub>, o tempo total de consumo do permeado da ultrafiltração foi de 8 d.

Figura 6 - Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de lactose em função tempo para os cultivos da microalga *Spirulina platensis* realizados com adição de permeado da ultrafiltração (UF) de soro de leite em modo descontínuo simples.

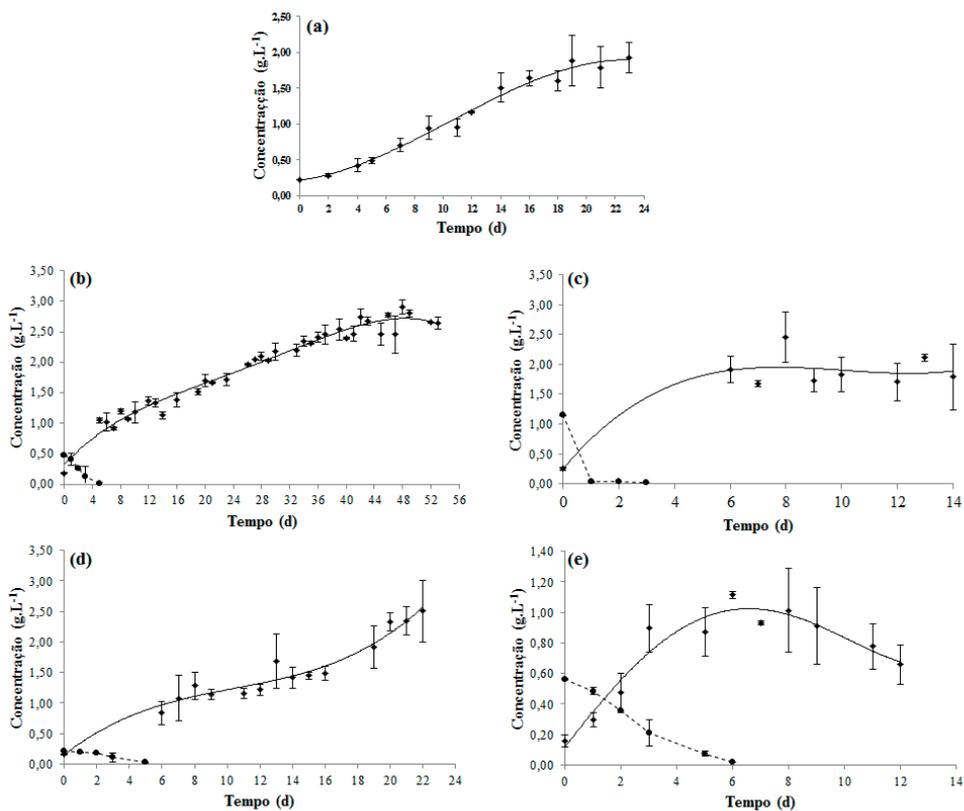


Ensaios DU<sub>1</sub> (Zarrouk 20%;  $\diamond$ ) e DU<sub>2</sub> (Zarrouk 30%;  $\blacklozenge$ ) - (a); ensaio DU<sub>3</sub> (Zarrouk 20%, 4,00% de retido da NF) - (b); ensaio DU<sub>4</sub> (Zarrouk 30%; 4,00% de retido da NF) - (c); ensaio DU<sub>5</sub> (Zarrouk 20%, 10,0% de retido da NF) - (d); ensaio DU<sub>6</sub> (Zarrouk 30%, 10,0% de retido da NF) - (e); sendo ( $\blacklozenge, \diamond$ ) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e ( $\bullet$ ) concentração de lactose.

Na Figura 7 estão apresentados os gráficos de concentração celular *versus* o tempo de cultivo dos ensaios controles em modo descontínuo simples. O ensaio controle

C<sub>1</sub>, no qual foi adicionado apenas meio Zarrouk padrão, atingiu a fase estacionária aos 24 dias de cultivo e concentração celular de 1,93 g.L<sup>-1</sup>. O cultivo controle DC<sub>2</sub>, atingiu a fase estacionária em 56 dias, e concentração celular de 2,64 g.L<sup>-1</sup>. Entre os ensaios controles o DC<sub>2</sub> foi o que atingiu a maior concentração celular ( $p > 0,05$ ) e permaneceu por mais tempo na fase exponencial de crescimento (40d). Os demais ensaios controles apresentaram concentrações celulares estatisticamente iguais. O consumo do substrato, tanto o resíduo da nanofiltração (DC<sub>2</sub> e DC<sub>3</sub>), quanto o permeado da ultrafiltração (DC<sub>4</sub> e DC<sub>5</sub>), foi realizado nos primeiros dias de cultivo. Isto indica que mesmo em meio repleto de nutrientes, a microalga consumiu a fonte orgânica de carbono preferencialmente.

Figura 7 - Curvas de crescimento e consumo de lactose dos cultivos em modo descontínuo da microalga *Spirulina platensis* nos ensaios controles



Ensaio DC<sub>1</sub> (Zarrouk 100%) - (a); ensaio DC<sub>2</sub> (Zarrouk 100%, 4,0% de retido da NF) - (b); ensaio DC<sub>3</sub> (Zarrouk 100%, 10,0% de retido da NF) - (c); ensaio DC<sub>4</sub> (Zarrouk 100%, 4,0% de permeado da UF) - (d); ensaio DC<sub>5</sub> (Zarrouk 100%, 10,0% de permeado da UF) (e), sendo (●) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e (◆) concentração de lactose. As figuras (b) e (c) referem-se aos ensaios controles adicionados de resíduo da nanofiltração, e as figuras (d) e (e) aos ensaios controles adicionados do resíduo da ultrafiltração.

Ao comparar os ensaios controles, DC<sub>2</sub> e DC<sub>4</sub>, com os ensaios do Planejamento (Zarrouk padrão e 4% de resíduo da nanofiltração e ultrafiltração, respectivamente), com os controles DN<sub>3</sub> e DN<sub>4</sub> (Zarrouk 20% e Zarrouk 30% e 4% de resíduo da NF, respectivamente) e DU<sub>3</sub> e DU<sub>4</sub> (Zarrouk 20% e Zarrouk 30% e 4% de resíduo da UF, respectivamente), percebe-se que os ensaios controle (DC<sub>2</sub> e DC<sub>4</sub>), apresentaram as maiores concentrações celulares finais (2,64 g.L<sup>-1</sup> e 1,79 g.L<sup>-1</sup>). E em relação à velocidade específica máxima de crescimento, o ensaio DC<sub>2</sub>, apresentou 0,02 d<sup>-1</sup>, enquanto que os ensaios DN<sub>3</sub> e DN<sub>4</sub>, apresentaram velocidade específica máxima de crescimento 0,14 d<sup>-1</sup>.

Santos et al. (2016) explicam que a presença de carbono orgânico no cultivo heterotrófico pode aumentar a velocidade específica de crescimento durante a fase exponencial, mas a associação entre a luz e o fornecimento de carbono orgânico em cultivos mixotróficos melhora o desempenho, e aumenta a concentração de biomassa na fase estacionária de crescimento. A elevada concentração celular nos ensaios controles deve-se ao fato que estes cultivos tiveram maiores concentrações de nutrientes e por isso, também, tiveram um tempo de cultivo maior. A velocidade específica máxima de crescimento foi maior nos ensaios do planejamento, justamente por apresentarem menor concentração de células, o que pode ter permitido maior incidência de luz nos cultivos. A sinergia entre a luminosidade e a fonte adicional de carbono dos ensaios DN<sub>3</sub> e DN<sub>4</sub>, ocasionaram a microalga maior velocidade específica máxima, quando comparada ao ensaio controle DC<sub>2</sub>.

A condição utilizada no ensaio DN<sub>4</sub> com o meio Zarrouk 30% e adição de 4,0% atingiu elevada concentração celular. Realizou-se o teste Anova a 95% de confiança entre o ensaio DN<sub>4</sub> e os controles, sem adição de resíduo (C<sub>1</sub>), e com os controles adicionados de 4,0% e 10,0% de resíduo da nanofiltração (DC<sub>2</sub> e DC<sub>3</sub>, respectivamente) e há diferença estatística em relação a concentração celular ( $p < 0,05$ ). A maior concentração celular foi obtida no ensaio DC<sub>2</sub>, enquanto que as menores concentrações celulares foram nos ensaios DN<sub>4</sub> e DC<sub>3</sub> (iguais estatisticamente), e C<sub>1</sub>. A adição de resíduo da nanofiltração causou efeito negativo sobre a concentração celular, quando utilizado o meio Zarrouk padrão. Visto que quando adicionado 4,0% de resíduo a microalga atingiu a maior concentração celular, e ao adicionar 10,0% de resíduo da nanofiltração a concentração celular diminuiu.

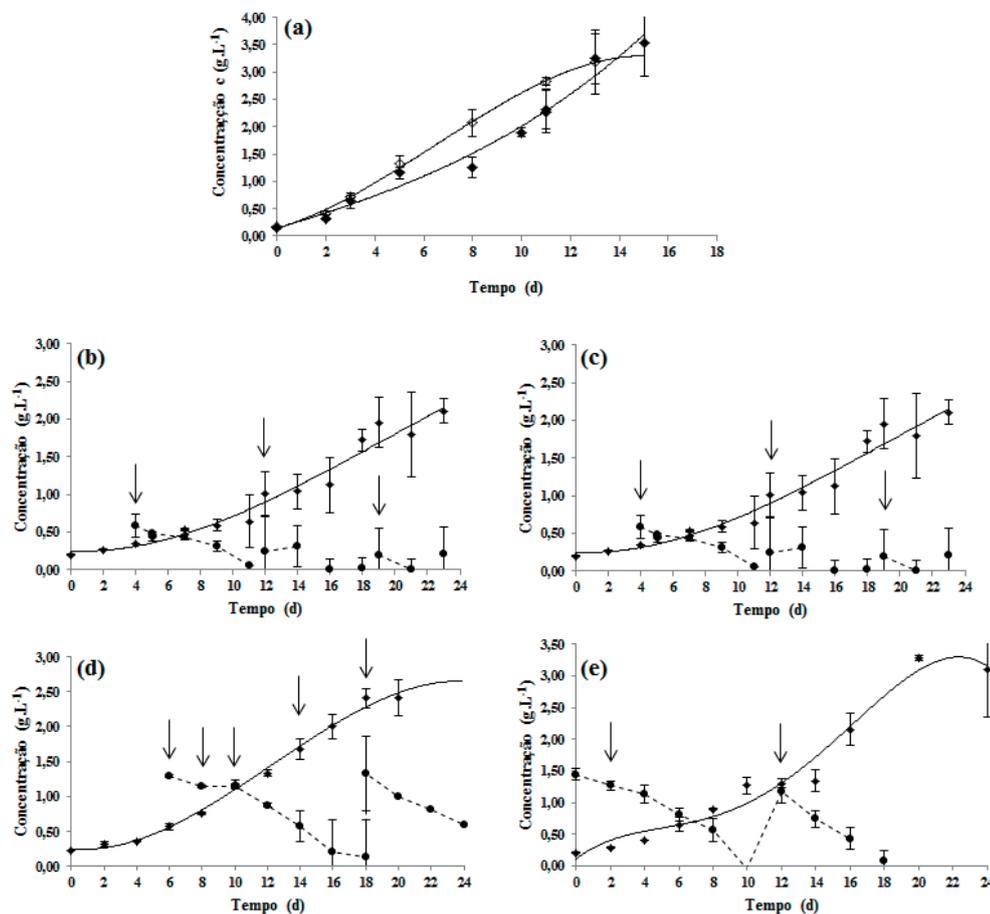
Ao realizar o teste Anova a 95% de confiança entre os ensaios DU<sub>4</sub>, e o controle sem adição de resíduo (C<sub>1</sub>) e com adição de resíduo (DC<sub>4</sub> e DC<sub>5</sub>), os ensaios C<sub>1</sub> e DC<sub>4</sub> foram iguais estatisticamente, e os ensaios DU<sub>4</sub> e DC<sub>5</sub> não apresentaram diferença significativa em relação a concentração celular. Entretanto os ensaios C<sub>1</sub> e DC<sub>4</sub> obtiveram uma maior concentração celular do que os ensaios DU<sub>4</sub> e DC<sub>5</sub>.

#### **4.2.2 Cultivos em modo descontínuo alimentado**

As Figuras 8 e 9 apresentam as curvas de crescimento da microalga em função do tempo de cultivo, bem como o consumo de substrato. As setas indicam os momentos em que foi realizada a adição de resíduo dos processos de ultra e nanofiltração. Os cultivos foram mantidos até o início da fase estacionária de crescimento, pois nesta fase ocorre o acúmulo de carboidratos na biomassa microalgal (MOURA et al, 2006). Em algumas curvas de crescimento não foi possível verificar a fase estacionária, pois a microalga entrou em declínio celular rapidamente, como exemplo a Figura 7 (h). Além dos cultivos serem mantidos até o início da fase estacionária, o meio de cultivo utilizado apresentou restrição de nutrientes e adição de fonte orgânica de carbono. As microalgas podem acumular carboidratos e outros biocompostos não nitrogenados quando os meios são adicionados de fontes de carbono orgânica ou restrição da fonte de nitrogênio (DISMUKES et al. 2008).

No ensaio N<sub>5</sub> (Figura 8d), foram realizados 6 adições de resíduo em 16 dias, totalizando 10% (v/v) do resíduo adicionado ao longo do processo. Nos demais ensaios utilizando o resíduo da nanofiltração a frequência da adição de resíduo foi menor, 4 adições em 12 dias no ensaio N<sub>3</sub>, 5 adições em 20 dias no ensaio N<sub>4</sub> e 3 adições em 18 dias no ensaio N<sub>6</sub>, e ao final do processo nestes ensaios o total de resíduo adicionado foi de 4% (v/v) (Figura 8b, 8c e 8e). O meio Zarrouk 20% permitiu maior adição de resíduo, quando comparado ao meio Zarrouk 30%, provavelmente devido à carência de nutrientes no meio Zarrouk 20% ser maior.

Figura 8 - Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de lactose *versus* tempo para os cultivos da microalga *Spirulina platensis* realizados com adição de retido da nanofiltração (NF) de soro de leite.

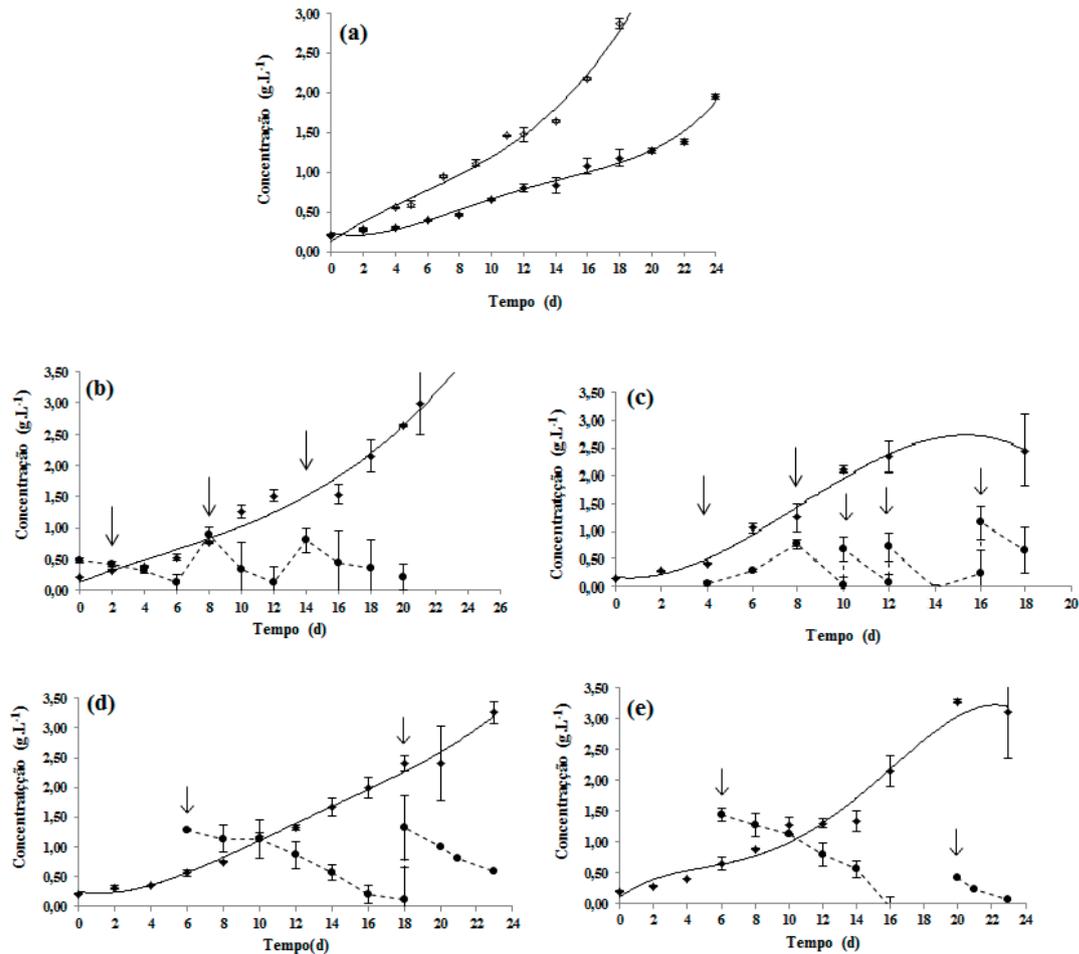


Ensaio N<sub>1</sub> (Zarrouk 20%;  $\diamond$ ) e N<sub>2</sub> (Zarrouk 30%;  $\blacklozenge$ ) - (a); ensaio N<sub>3</sub> (Zarrouk 20%, 1,25% de retido da NF) - (b); ensaio N<sub>4</sub>, (Zarrouk 30%; 1,25% de retido da NF) - (c); ensaio N<sub>5</sub> (Zarrouk 20%, 2,5% de retido da NF) - (d); ensaio N<sub>6</sub> (Zarrouk 30%, 1,25% de retido da NF) - (e); sendo ( $\blacklozenge, \diamond$ ) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e ( $\bullet$ ) concentração de lactose. As setas indicam a concentração de lactose após a adição de resíduo.

Nos ensaios com o resíduo da ultrafiltração (Figura 9), a frequência de adição de resíduo foi menor se comparado aos ensaios adicionados de resíduo da nanofiltração, sendo que nos ensaios U<sub>3</sub> e U<sub>5</sub> e U<sub>6</sub> foram realizados apenas 2 adições durante o processo (Figura 9g, 9i e 9j), enquanto que no ensaio U<sub>4</sub> (Figura 9h) foram realizados 5 adições de resíduo durante o período de 20 dias. A microalga consumiu maior volume de resíduo da nanofiltração (10% do volume do cultivo), e isto está relacionado a limitação de nutrientes do meio Zarrouk 20% e também as características físico-química

dos resíduos, visto que no resíduo da nanofiltração há menores concentrações de sódio e potássio que no resíduo da ultrafiltração (Tabela 10).

Figura 9 - Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de lactose *versus* tempo para os cultivos da microalga *Spirulina platensis* realizados com adição de permeado da ultrafiltração (UF) de soro de leite.

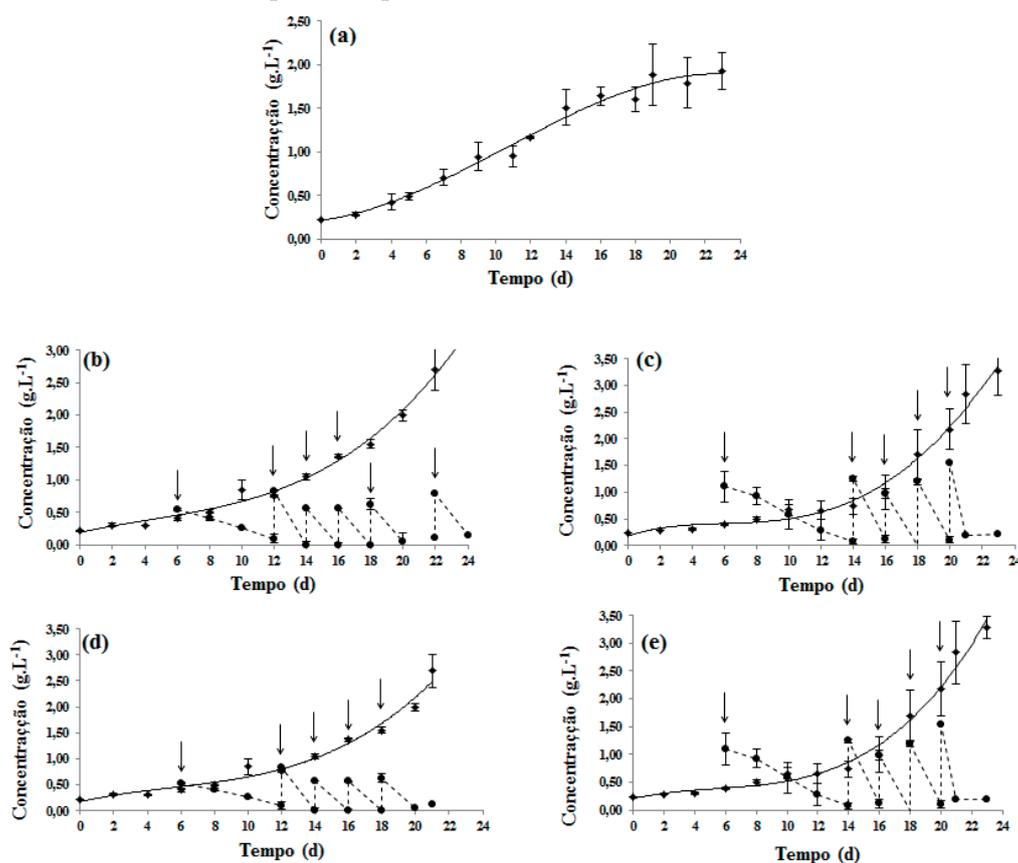


Ensaios U<sub>1</sub> (Zarrouk 20%;  $\diamond$ ) e U<sub>2</sub> (Zarrouk 30%;  $\blacklozenge$ ) - (a); ensaio U<sub>3</sub> (Zarrouk 20%, 1,25% de permeado da UF) - (b); ensaio U<sub>4</sub> (Zarrouk 30%; 1,25% de permeado da UF) - (c); ensaio U<sub>5</sub> (Zarrouk 20%, 2,5% de permeado da UF) - (d); ensaio U<sub>6</sub> (Zarrouk 30%, 1,25% de permeado da UF) - (e); sendo ( $\blacklozenge, \diamond$ ) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e ( $\bullet$ ) concentração de lactose. As setas indicam a concentração de lactose após a adição de resíduo.

A Figura 10 apresenta os gráficos de crescimento celular e do consumo de lactose dos ensaios controles, realizados com Zarrouk padrão sem adição de resíduo (C<sub>1</sub>), e adicionados de resíduos da nanofiltração (C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>) e de resíduos da ultrafiltração (C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>). No ensaio C<sub>2</sub> realizou-se 7 adições em 24 dias, no ensaio C<sub>3</sub> foi realizado 5 adições em 26 dias, totalizando ao final 4% e 8% do volume de resíduo adicionado durante o processo. Os ensaios controles tiveram período de cultivo maior, entre 24 e 26

dias (Figura 10), enquanto que os ensaios com Zarrouk 20% e 30% o tempo de cultivo variou entre 12 e 24 dias (Figura 9). O período de cultivo pode estar relacionado com a quantidade de nutrientes ser maior nos ensaios controles, pois nestes o meio de cultivo utilizado foi o meio Zarrouk padrão, enquanto que no meio Zarrouk diluído há uma restrição de nutrientes. O ensaio N<sub>3</sub> (Figura 8b), utilizou a menor concentração de Zarrouk (20%) e o menor volume de resíduo da nanofiltração (1,25 v/v) e teve tempo de duração de apenas 12 dias, provavelmente devido a quantidade de nutrientes ser inferior nesta condição. E ao utilizar a mesma concentração de Zarrouk (20%) e 2,5% de resíduo da nanofiltração (ensaio N<sub>5</sub>), o experimento teve duração de 18 dias. A adição de maior concentração de resíduo ao meio Zarrouk diluído pode ser favorável para o crescimento da biomassa microalgal, visto que a concentração celular e o período de cultivo foi maior no ensaio N<sub>5</sub> (3,22g.L<sup>-1</sup>), do que no ensaio N<sub>3</sub> (2,32g.L<sup>-1</sup>).

Figura 10 - Curvas de crescimento e consumo de lactose dos cultivos da microalga *Spirulina platensis* nos ensaios controles



Ensaio C<sub>1</sub> (Zarrouk 100%) - (a); ensaio C<sub>2</sub> (Zarrouk 100%, 1,25% de retido da NF) - (b); ensaio C<sub>3</sub> (Zarrouk 100%, 2,5% de retido da NF) - (c); ensaio C<sub>4</sub> (Zarrouk 100%, 1,25% de permeado da UF) - (d); ensaio C<sub>5</sub> (Zarrouk 100%, 2,5% de permeado da UF) (e), sendo (●) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e (◆) concentração de lactose. As figuras (b) e (c) referem-se aos ensaios controles adicionados de resíduo da nanofiltração, e as figuras (d) e (e) aos ensaios controles adicionados do resíduo da ultrafiltração. As setas indicam a concentração de lactose após a adição de resíduo.

Ao utilizar o resíduo da ultrafiltração, o consumo de açúcares do resíduo pela microalga foi menor durante o processo (Figura 9), sendo que a mesma consumiu 2%, 5%, 2% e 1% v/v nos ensaios U<sub>3</sub>, U<sub>4</sub>, U<sub>5</sub> e U<sub>6</sub>, respectivamente. Já o consumo dos açúcares do resíduo da nanofiltração foi 4%, 4%, 10% e 4% v/v nos ensaios N<sub>3</sub>, N<sub>4</sub>, N<sub>5</sub> e N<sub>6</sub>, respectivamente (Figura 8). A microalga consumiu maior volume de resíduo da nanofiltração e isto pode estar relacionado ao fato que o resíduo da nanofiltração possui teores maiores de magnésio e cálcio do que no resíduo do processo da ultrafiltração. Elevadas concentrações de cálcio pode provocar aumento na biomassa de microalgas e o alto teor de magnésio pode acarretar em maior eficiência fotossintética das microalgas (RUTHES, 2003; BECKER, 2004). Ao observar os ensaios N<sub>5</sub> e U<sub>5</sub>, nota-se que a concentração celular é maior no ensaio N<sub>5</sub> (Tabela 10), o qual foi adicionado de resíduo da nanofiltração, e este por sua vez apresenta teores maiores de cálcio e magnésio em sua composição físico-química (Tabela 4).

Nos ensaios controles (Figura 10), o consumo de resíduo da nanofiltração durante o processo foi 4% e 8% nos ensaios C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>, respectivamente. Enquanto que o consumo do resíduo da ultrafiltração foi 6% e 10% nos ensaios C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub> e todos os experimentos tiveram a duração de 24 dias nos ensaios controles.

O modo de cultivo em batelada alimentada é uma ferramenta bem sucedida para uso de águas residuais ricas em amônia, para o tratamento simultâneo com a produção de biomassa de *Spirulina platensis* (MARKOU, 2015). O modo de cultivo descontínuo alimentado foi também bem sucedido neste estudo, usando o resíduo a partir de ultrafiltração e nanofiltração de proteína de soro de leite, que era rico em lactose, Mg, Ca, K e Na. Ao utilizar o modo descontínuo simples a adição de 10% de retido da nanofiltração ocasionou um estresse à microalga inibindo seu crescimento, a qual obteve concentração celular de 0,35 g.L<sup>-1</sup> (Ensaio DN<sub>5</sub>), enquanto em que ao adicionar o resíduo em batelada alimentada permitiu a adição de 10% deste mesmo resíduo e atingindo 3,22 g.L<sup>-1</sup> de concentração celular final (Ensaio N<sub>5</sub>). Geralmente, em cultivos mixotróficos, o crescimento microalgal é superior no modo descontínuo alimentado em comparação a cultivos realizados em modo descontínuo simples, porém ambos têm suas limitações em sistemas de aumento de escala. A principal desvantagem é a necessidade de impedir a contaminação durante a inoculação inicial e na fase de adaptação do microrganismo devido à baixa concentração celular inicial. Especialmente quando se trata de efluentes, a contaminação é mais possível. No entanto, estes dois modos

possuem vantagens em relação a sua simplicidade e flexibilidade, sendo muito utilizados (MARKOU, 2015).

A Tabela 10 apresenta os resultados de velocidade específica máxima de crescimento, intervalo da fase exponencial, tempo de duração da fase exponencial e o  $R^2$  da curva exponencial de crescimento da microalga, concentração celular final, obtidos nos experimentos do Planejamento Experimental  $2^2.3^1$  e os ensaios controles realizados. O ensaio N<sub>5</sub> apresentou a maior concentração celular ( $3,22\text{g.L}^{-1}$ ), entre os ensaios adicionados do resíduo da nanofiltração. Este ensaio foi realizado com 20% de Zarrouk e 2,5% v/v de resíduo. Entre os ensaios adicionados do resíduo da ultrafiltração, apenas o ensaio U<sub>2</sub> apresentou diferença estatística em relação aos outros ensaios (U<sub>1</sub>, U<sub>3</sub>, U<sub>4</sub> e U<sub>5</sub>), sendo que atingiu a menor concentração celular ( $1,95\text{g.L}^{-1}$ ).

Tabela 10 - Velocidades específicas de crescimento, concentrações celulares máximas obtidas nos ensaios dos planejamentos experimentais e experimentos controles dos cultivos realizados em modo descontínuo alimentado.

Ensaio	Zarrouk (% v/v)	Resíduo (% v/v)	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{d}^{-1}$ )	Interva lo da fase log	Duração da fase log (d)	$R^2$	X final ( $\text{g.L}^{-1}$ )
<b>Fonte de carbono: Resíduo da nanofiltração</b>							
N <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,00	$0,125 \pm 0,02^a$	7-16	9	0,94	$2,17 \pm 0,34^a$
N <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,00	$0,104 \pm 0,02^a$	7-16	9	0,95	$1,72 \pm 0,24^{ab}$
N <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 1,25	$0,123 \pm 0,01^a$	5-16	11	0,96	$2,32 \pm 0,01^a$
N <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 1,25	$0,109 \pm 0,01^a$	5-18	13	0,94	$1,96 \pm 0,17^{ab}$
N <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 2,50	$0,135 \pm 0,01^a$	5-18	13	0,99	$3,22 \pm 0,19^c$
N <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 2,50	$0,146 \pm 0,05^a$	7-14	7	0,95	$1,33 \pm 0,07^b$
<b>Fonte de carbono: Resíduo da ultrafiltração</b>							
U <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,00	$0,108 \pm 0,01^A$	5-18	13	0,96	$3,47 \pm 0,25^B$
U <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,00	$0,091 \pm 0,01^D$	7-25	18	0,96	$1,95 \pm 0,03^A$
U <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 1,25	$0,136 \pm 0,01^C$	5-21	16	0,99	$2,64 \pm 0,03^{AB}$
U <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 1,25	$0,109 \pm 0,02^A$	7-16	9	0,94	$2,10 \pm 0,16^{AB}$
U <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 2,50	$0,126 \pm 0,01^{BC}$	7-19	12	0,97	$2,85 \pm 0,31^{AB}$
U <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 2,50	$0,116 \pm 0,01^A$	7-21	14	0,96	$3,10 \pm 0,75^{AB}$
<b>Dados dos Ensaios Controles</b>							
C <sub>1</sub>	100	0,00	$0,097 \pm 0,01^a$	5-19	14	0,98	$1,93 \pm 0,21^a$
<b>Fonte de carbono: Resíduo da nanofiltração</b>							
C <sub>2</sub>	100	1,25	$0,122 \pm 0,01^{ab}$	5-19	14	0,98	$2,70 \pm 0,32^a$
C <sub>3</sub>	100	2,50	$0,132 \pm 0,01^b$	5-19	14	0,98	$3,28 \pm 0,47^a$
<b>Fonte de carbono: Resíduo da ultrafiltração</b>							
C <sub>4</sub>	100	1,25	$0,105 \pm 0,01^{ab}$	10-23	13	0,99	$2,48 \pm 0,38^a$
C <sub>5</sub>	100	2,50	$0,131 \pm 0,01^{ab}$	10-25	15	0,96	$2,56 \pm 0,27^a$

\*Média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios que utilizaram o resíduo da nanofiltração. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios que utilizaram o resíduo da ultrafiltração. Letras minúsculas e em negrito iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança nos ensaios controles.

Os ensaios com a menor concentração de Zarrouk (20%) e com a maior adição de resíduo (2,5%), N<sub>5</sub> e U<sub>5</sub>, não apresentaram diferença significativa em relação a concentração celular ( $p > 0,05$ ). Entre os ensaios utilizando o resíduo da nanofiltração, o N<sub>5</sub>, apresentou a maior concentração celular (3,22 g.L<sup>-1</sup>), e foi comparado aos ensaios controles. Os ensaios controles foram realizados com Zarrouk padrão, sem adição de resíduo (C<sub>1</sub>) e com a adição de resíduo da nanofiltração (C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>), sendo que no ensaio C<sub>2</sub>, foi adicionado 1,5% de resíduo e no ensaio C<sub>3</sub> foi adicionado 2,5% de resíduo da nanofiltração. Ao realizar o teste anova a 95% de confiança entre o ensaio N<sub>5</sub> e os controles C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Isto significa que a concentração celular final ao utilizar o meio Zarrouk diluído e ao utilizar o meio Zarrouk padrão foram iguais, portanto a substituição do meio Zarrouk padrão pelo meio Zarrouk diluído e adicionado de fontes residuais pode ser realizado, visto que a microalga atingiu valores estatisticamente iguais de concentração celular. A microalga *Spirulina platensis* LEB 52 se desenvolveu com a mesma capacidade com meio de cultivo padrão e quando submetida a uma condição de estresse causada pela restrição de nutrientes e pela adição de uma fonte alternativa de carbono.

Esta condição utilizada no ensaio N<sub>5</sub> com o meio Zarrouk 20% e adição de 2,5% de resíduo é considerada uma boa condição para o propósito do trabalho, pois reduz os custos com reagentes comerciais do meio de cultivo e pode-se adicionar o maior volume de resíduo, diminuindo assim o montante que seria descartado ao ambiente, ou que seria destinado ao corpo hídrico.

Realizou-se o teste Anova a 95% de confiança entre o ensaio U<sub>5</sub>, e os controles, sem adição de resíduo (C<sub>1</sub>), e com os controles adicionados de 1,5% e 2,5% de resíduo da nanofiltração (C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>, respectivamente) e não há diferença estatística em relação a concentração celular ( $p > 0,05$ ). As concentrações celulares obtidas nos ensaios adicionados dos resíduos da ultrafiltração e da nanofiltração (U<sub>5</sub> e N<sub>5</sub>) foram iguais estatisticamente ao dos controles. Assim demonstramos que a substituição do meio Zarrouk padrão para o meio Zarrouk diluído e adicionado de fontes residuais pode ser realizada, pois estas alterações no meio de cultivo não influenciam na concentração celular da microalga *Spirulina platensis* LEB 52.

### 4.3 Teor e produtividade de carboidratos e proteínas

#### 4.3.1 Cultivos em modo descontínuo simples

Os ensaios realizados em modo descontínuo simples (Tabela 13) apresentaram elevados teores de carboidratos em determinadas condições, sendo que os cultivos realizados sem adição de resíduo e com concentração do meio Zarrouk 20% obtiveram os maiores teores de carboidratos (58,17%, e 45, 40%, ensaios DN<sub>1</sub> e DU<sub>1</sub>, respectivamente). Entre os ensaios que foram adicionados de retido da nanofiltração o maior teor de carboidrato foi 57,11% na condição de Zarrouk 20% com a adição de 4% de resíduo da nanofiltração (DN<sub>3</sub>), sendo os ensaios DN<sub>1</sub> e DN<sub>3</sub> iguais estatisticamente em relação ao teor de carboidratos intracelulares. Estes ensaios (DN<sub>1</sub> e DN<sub>3</sub>) apresentaram também as maiores produtividades em carboidratos. A produtividade em carboidratos do ensaio DN<sub>4</sub> foi igual estatisticamente aos ensaios DN<sub>1</sub>, DN<sub>3</sub> e DN<sub>4</sub>. No entanto o ensaio DN<sub>4</sub>, apresentou teor de carboidratos estatisticamente menor, e ao comparar as produtividades, este é igual estatisticamente aos ensaios DN<sub>1</sub> e DN<sub>3</sub>. Isto está relacionado ao fato que no ensaio DN<sub>4</sub> (Zarrouk 30%; retido de NF 4%), foi obtido concentração celular final maior do que no ensaio DN<sub>3</sub>, visto que a produtividade relaciona concentração celular, concentração de carboidratos e tempo de cultivo em seu conceito.

Nos ensaios adicionados de permeado da ultrafiltração, o maior teor de carboidratos foi 33,99% no ensaio DU<sub>5</sub>, ensaio realizado com menor concentração de meio Zarrouk (20%) e maior concentração de resíduo adicionado (10%). Nesta mesma condição, porém com adição de 10% de retido da nanofiltração, não foi possível determinar os teores de proteínas e carboidratos na microalga devido à baixa concentração celular final de biomassa obtida (0,35 g.L<sup>-1</sup>). Em relação à produtividade em carboidratos, os ensaios DU<sub>1</sub> e DU<sub>5</sub> obtiveram as maiores produtividades, de 63,01 mg.L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e 30,49 mg.L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> (p<0,05), respectivamente (Tabela 13).

Apesar das concentrações dos nutrientes do retido da nanofiltração e da ultrafiltração serem similares, estes diferem no teor de magnésio, cálcio, sódio, potássio e no teor de nitrogênio amoniacal total e na demanda química de oxigênio (DQO) (Tabela 8). Isto justifica o fato da microalga ter se adaptado a 10% de permeado da ultrafiltração e não ter se adaptado ao retido da nanofiltração, que possui teores maiores de cálcio, magnésio e carga orgânica (DQO) maior do que no permeado da

ultrafiltração. O fato do resíduo ser adicionado em modo descontínuo pode ter ocasionado uma concentração elevada destes componentes no meio de cultivo, ocasionando estresse por concentração de substrato elevado.

Tabela 11 - Produtividade de carboidratos e proteínas obtidas nos ensaios dos planejamentos experimentais em modo descontínuo simples.

Ensaio	Zarrouk (% v/v)	Resíduo (% v/v)	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Produtividade de carboidratos (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Produtividade de proteínas (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
<b>Fonte de carbono: Retido da nanofiltração</b>						
DN <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,0	58,17 ± 3,7 <sup>c</sup>	31,64 ± 5,98 <sup>a</sup>	63,29 ± 14,16 <sup>c</sup>	24,03 ± 1,34 <sup>a</sup>
DN <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,0	14,94 ± 3,20 <sup>a</sup>	41,53 ± 1,40 <sup>b</sup>	13,01 ± 4,62 <sup>ab</sup>	43,40 ± 4,99 <sup>b</sup>
DN <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 4,0	57,11 ± 1,5 <sup>c</sup>	22,65 ± 2,08 <sup>a</sup>	45,17 ± 3,67 <sup>bc</sup>	17,85 ± 0,52 <sup>a</sup>
DN <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 4,0	39,08 ± 6,04 <sup>b</sup>	17,17 ± 1,65 <sup>a</sup>	52,70 ± 15,38 <sup>c</sup>	21,18 ± 3,23 <sup>a</sup>
DN <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 10,0	ND	ND	ND	ND
DN <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 10,0	14,34 ± 2,92 <sup>a</sup>	25,01 ± 5,34 <sup>a</sup>	9,38 ± 2,33 <sup>a</sup>	16,17 ± 2,70 <sup>a</sup>
<b>Fonte de carbono: Permeado da ultrafiltração</b>						
DU <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,0	45,40 ± 0,10 <sup>D</sup>	27,25 ± 6,05 <sup>A</sup>	63,01 ± 4,49 <sup>D</sup>	37,87 ± 4,30 <sup>B</sup>
DU <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,0	17,16 ± 0,61 <sup>AB</sup>	40,80 ± 9,41 <sup>B</sup>	14,52 ± 0,78 <sup>AB</sup>	39,17 ± 2,09 <sup>B</sup>
DU <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 4,0	22,29 ± 0,21 <sup>B</sup>	63,09 ± 1,78 <sup>C</sup>	17,62 ± 1,59 <sup>B</sup>	49,80 ± 2,63 <sup>B</sup>
DU <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 4,0	21,05 ± 3,57 <sup>B</sup>	60,08 ± 5,67 <sup>C</sup>	15,90 ± 0,08 <sup>B</sup>	41,71 ± 1,63 <sup>B</sup>
DU <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 10,0	33,99 ± 4,09 <sup>C</sup>	37,85 ± 2,87 <sup>AB</sup>	30,49 ± 2,19 <sup>C</sup>	36,62 ± 9,54 <sup>B</sup>
DU <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 10,0	14,05 ± 0,89 <sup>A</sup>	38,57 ± 4,43 <sup>AB</sup>	5,96 ± 0,41 <sup>A</sup>	16,54 ± 4,06 <sup>A</sup>
<b>Dados dos Ensaio Controles</b>						
C <sub>1</sub>	100	0,0	20,60 ± 4,32 <sup>a</sup>	45,40 ± 3,28 <sup>a</sup>	17,09 ± 1,72 <sup>a</sup>	37,06 ± 5,26 <sup>a</sup>
<b>Fonte de carbono: Retido da nanofiltração</b>						
DC <sub>2</sub>	100	4,0	52,21 ± 8,17 <sup>b</sup>	42,15 ± 1,40 <sup>a</sup>	25,98 ± 3,17 <sup>a</sup>	21,05 ± 1,43 <sup>a</sup>
DC <sub>3</sub>	100	10,0	7,52 ± 0,80 <sup>a</sup>	47,67 ± 3,15 <sup>a</sup>	9,75 ± 3,9 <sup>a</sup>	61,39 ± 22,55 <sup>a</sup>
<b>Fonte de carbono: Permeado da ultrafiltração</b>						
DC <sub>4</sub>	100	4,0	26,43 ± 7,07 <sup>a</sup>	50,03 ± 6,79 <sup>a</sup>	30,85 ± 14,97 <sup>a</sup>	57,52 ± 20,87 <sup>a</sup>
DC <sub>5</sub>	100	10,0	18,98 ± 1,52 <sup>a</sup>	40,24 ± 0,82 <sup>a</sup>	8,16 ± 1,99 <sup>a</sup>	17,15 ± 2,49 <sup>a</sup>

\*Média ± desvio padrão, (n = 2). Letras minúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios que utilizaram o resíduo da nanofiltração. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios que utilizaram o resíduo da ultrafiltração. Letras minúsculas e em negrito iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança nos ensaios controles. ND: Não determinado.

Ao avaliar o teor de carboidratos dentre os controles, o maior estatisticamente foi no ensaio DC<sub>2</sub>, no qual foi adicionado 4% de retido da nanofiltração, atingindo aproximadamente 52% de carboidratos. Isto indica que o aumento do teor de cálcio e magnésio no meio de cultivo padrão da microalga em um cultivo mixotrófico pode influenciar a síntese de carboidratos, e faz com que o microrganismo atinja teores maiores de carboidratos intracelulares. Estudos mostram que ao aumentar a concentração de cálcio no meio de cultivo propicia aumento na biomassa de microalgas, enquanto que o alto teor de magnésio acarreta maior eficiência fotossintética (RUTHES,

2003). Quanto maior a eficiência fotossintética da microalga, maior é sua capacidade de acumular carboidratos intracelulares.

O maior teor de proteína entre os ensaios realizados com o retido da nanofiltração foi obtido no ensaio DN<sub>2</sub> (43,40%), no qual não foi adicionado resíduo e a concentração do meio Zarrouk utilizada foi 30%, sendo que os demais ensaios foram iguais estatisticamente ( $p > 0,05$ ). No ensaio DN<sub>2</sub> foi obtido também, a maior produtividade em proteínas (aproximadamente 43,40 mg.L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) e é diferente estatisticamente em relação a todos os outros ensaios do planejamento em que foi adicionado este resíduo. Este resultado (43,40%) é igual estatisticamente ( $p > 0,05$ ) ao controle C1, que utilizou apenas o meio Zarrouk padrão e também aos demais ensaios controles realizados (DC<sub>2</sub>, DC<sub>3</sub>, DC<sub>4</sub>, DC<sub>5</sub>). Cultivos de *Spirulina* em meio Zarrouk 30% resultaram em biomassa com elevada produtividade em proteínas. Este fato pode colaborar com a diminuição dos custos de produção de cultivos realizados com a finalidade de biomassa rica em proteínas, devido a diminuição da quantidade de nutrientes do meio Zarrouk.

Entre os ensaios adicionados de permeado da ultrafiltração, os ensaios DU<sub>3</sub> e DU<sub>4</sub> apresentaram teores elevados de proteínas 49,80% e 41,71%, respectivamente, sendo que são diferentes estatisticamente aos demais ensaios realizados com este resíduo (DU<sub>1</sub>, DU<sub>2</sub>, DU<sub>5</sub>, DU<sub>6</sub>), que apresentaram teores de proteínas iguais estatisticamente entre si. Isto indica que ao adicionar 4% do resíduo da ultrafiltração, os teores de sódio e potássio podem ter ocasionado aumento na síntese de proteínas intracelulares da microalga, enquanto que ao adicionar 10% não favoreceram a síntese de proteínas da microalga, mas sim a síntese de carboidratos, o que explica o elevado teor de carboidrato atingido no ensaio DU<sub>5</sub> (30,49%). Ao avaliar a produtividade em proteínas dos ensaios adicionados do permeado da ultrafiltração, os ensaios DU<sub>1</sub>, DU<sub>2</sub>, DU<sub>3</sub>, DU<sub>4</sub> e DU<sub>5</sub>, foram iguais estatisticamente ( $p > 0,05$  – Tabela 12). A menor produtividade em proteínas foi no ensaio DU<sub>6</sub>, e que por sua vez, também apresentou a menor produtividade em carboidratos, o que é justificado pela baixa concentração celular final obtida, 0,5 g.L<sup>-1</sup>. Os 10% de resíduo adicionado neste ensaio (DU<sub>6</sub>), ocasionou estresse metabólico na microalga fazendo com que esta apresentasse baixa concentração celular em um meio repleto de nutrientes .

O teor e a produtividade de proteínas entre os ensaios controles dos cultivos realizados em modo descontínuo não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ), e tampouco a produtividade em carboidratos nos ensaios controles, apresentou

diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Ao utilizar o meio Zarrouk padrão (100%), os diferentes volumes de resíduos adicionados não influenciaram na síntese de proteínas (Tabela 12).

#### 4.3.2 Cultivos em modo descontínuo alimentado

Ao modificar a concentração de meio Zarrouk para 20% ( $N_1$  e  $U_1$ ) foi conseguido um acúmulo no teor de carboidratos da microalga *Spirulina platensis* (58,17% e 45,40%, respectivamente). Esta microalga, se cultivada em meio Zarrouk padrão possui cerca de 14% de carboidratos intracelulares (TORZILLO, VONSHAK, 1994). Ao reduzir as concentrações do meio padrão foi possível acumular cerca de 4 vezes mais carboidratos do que quando cultivada em meio Zarrouk padrão. Poucos estudos relatam a produção de bioetanol a partir da biomassa da *Spirulina*. Esta microalga é mundialmente conhecida e estudada devido as suas propriedades antioxidantes (COSTA, MORAIS, 2011). No entanto, esta biomassa pode acumular elevados teores de carboidratos, sendo uma nova alternativa para a produção de bioetanol, principalmente em sistemas de biorrefinarias, Markou et al. (2013) utilizaram a biomassa *Spirulina* que com 55% de carboidratos e conseguiram uma produtividade de etanol de 16,3% ( $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{biomassa}}$ ). Neste estudo, a microalga *Spirulina* acumulou 57% de carboidratos intracelulares, o que permite sua utilização para a produção de bioetanol.

Entre os ensaios adicionados de retido da nanofiltração, o ensaio  $N_6$  (Zarrouk 30% e adição de 2,5% de resíduo) obteve concentração de carboidratos igual estatisticamente ao ensaio  $N_1$  (Zarrouk 20%, sem adição de resíduo) (Tabela 14). Enquanto que entre os ensaios adicionados de permeado da ultrafiltração o teor de carboidratos não apresentou diferença significativa a 95% de confiança entre os ensaios  $U_1$ ,  $U_3$  e  $U_5$ , sendo que estes três ensaios foram cultivados com meio Zarrouk 20%, sem adição de resíduo, com adição de 1,25% de resíduo e de 2,5% de resíduo, respectivamente.

Tabela 12 - Teor e produtividade de carboidratos e proteínas obtidas nos ensaios dos planejamentos experimentais em modo descontínuo alimentado.

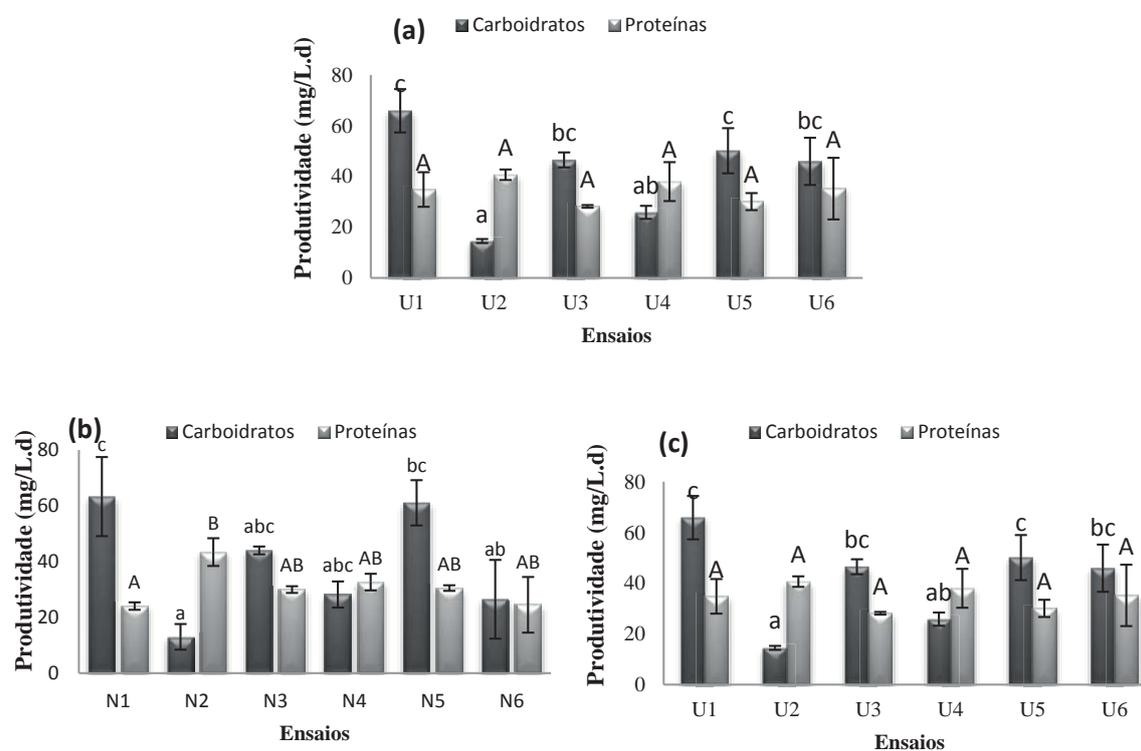
Ensaio	Zarrouk (% v/v)	Resíduo (% v/v)	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Produtividade de carboidratos (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Produtividade de proteínas (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
<b>Fonte de carbono: Retido da nanofiltração</b>						
N <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,00	58,17 ± 3,7 <sup>c</sup>	22,30 ± 2,3 <sup>a</sup>	63,30 ± 14,16 <sup>c</sup>	24,03 ± 1,34 <sup>a</sup>
N <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,00	14,94 ± 3,20 <sup>a</sup>	50,70 ± 1,4 <sup>c</sup>	13,01 ± 4,62 <sup>a</sup>	43,40 ± 4,99 <sup>b</sup>
N <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 1,25	37,94 ± 1,20 <sup>b</sup>	25,85 ± 1,03 <sup>ab</sup>	44,02 ± 1,39 <sup>abc</sup>	29,99 ± 1,20 <sup>ab</sup>
N <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 1,25	28,68 ± 2,28 <sup>b</sup>	33,60 ± 6,00 <sup>b</sup>	28,19 ± 4,70 <sup>abc</sup>	32,65 ± 3,00 <sup>ab</sup>
N <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 2,50	37,84 ± 2,73 <sup>b</sup>	18,96 ± 0,53 <sup>b</sup>	61,06 ± 8,14 <sup>bc</sup>	30,51 ± 1,02 <sup>ab</sup>
N <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 2,50	39,43 ± 18,99 <sup>c</sup>	37,23 ± 16,89 <sup>ab</sup>	26,49 ± 14,12 <sup>ab</sup>	24,50 ± 9,99 <sup>ab</sup>
<b>Fonte de carbono: Permeado da ultrafiltração</b>						
U <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,00	45,40 ± 0,10 <sup>AB</sup>	30,75 ± 6,05 <sup>A</sup>	68,55 ± 8,55 <sup>C</sup>	34,83 ± 6,81 <sup>A</sup>
U <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,00	17,16 ± 0,61 <sup>C</sup>	40,81 ± 9,41 <sup>B</sup>	14,52 ± 0,78 <sup>A</sup>	40,65 ± 2,09 <sup>A</sup>
U <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 1,25	44,02 ± 2,32 <sup>AB</sup>	26,68 ± 0,81 <sup>A</sup>	46,50 ± 2,95 <sup>BC</sup>	28,17 ± 0,55 <sup>A</sup>
U <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 1,25	21,82 ± 8,36 <sup>D</sup>	41,30 ± 5,19 <sup>B</sup>	25,83 ± 2,59 <sup>AB</sup>	37,98 ± 7,67 <sup>A</sup>
U <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 2,50	43,81 ± 3,02 <sup>AB</sup>	26,38 ± 0,08 <sup>A</sup>	50,13 ± 8,89 <sup>C</sup>	30,08 ± 3,37 <sup>A</sup>
U <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 2,50	37,25 ± 1,50 <sup>A</sup>	28,02 ± 3,01 <sup>A</sup>	45,96 ± 9,31 <sup>BC</sup>	35,20 ± 12,13 <sup>A</sup>
<b>Dados dos Ensaio Controles</b>						
C <sub>1</sub>	100	0,00	20,60 ± 4,32 <sup>a</sup>	45,40 ± 3,28 <sup>a</sup>	38,10 ± 2,75 <sup>a</sup>	17,29 ± 3,62 <sup>a</sup>
<b>Fonte de carbono: Retido da nanofiltração</b>						
C <sub>2</sub>	100	1,25	20,171 ± 0,57 <sup>ab</sup>	31,13 ± 0,35 <sup>a</sup>	36,54 ± 0,41 <sup>a</sup>	23,68 ± 0,67 <sup>ab</sup>
C <sub>3</sub>	100	2,50	23,23 ± 7,17 <sup>b</sup>	32,22 ± 0,38 <sup>a</sup>	45,95 ± 0,54 <sup>a</sup>	33,13 ± 0,54 <sup>b</sup>
<b>Fonte de carbono: Permeado da ultrafiltração</b>						
4	100	1,25	15,30 ± 0,21 <sup>a</sup>	35,47 ± 0,54 <sup>a</sup>	38,25 ± 0,58 <sup>a</sup>	16,50 ± 0,58 <sup>a</sup>
C <sub>5</sub>	100	2,50	17,22 ± 2,78 <sup>a</sup>	33,32 ± 2,74 <sup>a</sup>	37,09 ± 3,05 <sup>a</sup>	19,17 ± 3,05 <sup>a</sup>

Além da influência do uso de fontes de carbono e sais provenientes de resíduos sobre as concentrações celulares, é importante a avaliação da influência destas sobre a composição química da microalga, visto ser esta que norteia a aplicação da biomassa. Assim, as produtividades em carboidratos e proteínas a partir da biomassa obtida em cada experimento estão apresentadas na Figura 13.

A adição de resíduos oriundos os processos de ultrafiltração e nanofiltração, não influenciou na produtividade em carboidratos da microalga, quando a mesma foi cultivada em meio Zarrouk padrão (Figura 6a). Os teores de carboidratos e proteínas verificados no ensaio C<sub>1</sub>, que utilizou meio Zarrouk padrão sem adição de resíduo, foram próximos aos resultados encontrados por Madkour et al., (2012), que determinaram 52,95 ± 0,53% de proteínas e 13,20 ± 0,57% de carboidratos na microalga *S. platensis*, cultivada em meio Zarrouk padrão. Embora a produtividade seja igual, ao adicionar os resíduos e o meio Zarrouk em concentrações inferiores há um ganho econômico, visto que são utilizados menos compostos do meio Zarrouk.

Nos ensaios controles, cultivados com o meio Zarrouk padrão, a produtividade em proteínas foi maior que a produtividade em carboidratos, conforme o esperado nesta condição de cultivo, pois nos ensaios controles não há uma condição de estresse ou de restrição de nutrientes. Ao realizar ensaios com meio de cultivo diluído e adicionado de resíduos da ultrafiltração e nanofiltração (ensaios N<sub>1</sub>, N<sub>5</sub> e U<sub>1</sub> e U<sub>5</sub>) a produtividade em carboidratos foi superior que a produtividade em proteínas.

Figura 11- Produtividade de carboidratos e proteínas a partir da biomassa obtida nos ensaios controles (a), nos ensaios adicionados do resíduo da nanofiltração (b) e nos ensaios adicionados do resíduo da ultrafiltração (c)



\*Letras minúsculas iguais entre as barras indicam que não há diferença significativa na produtividade em carboidratos e letras maiúsculas iguais entre as barras indicam que não há diferença significativa entre as produtividades de proteínas em um intervalo de confiança de 95%

As produtividades em proteínas nos ensaios controles, da microalga *Spirulina*, não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 6a). Entretanto, em relação à produtividade de carboidratos, o ensaio C<sub>3</sub> é diferente estatisticamente dos ensaios C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>. No ensaio C<sub>3</sub> foi adicionado o maior volume do resíduo da nanofiltração do soro de leite (2,5% v/v) e atingiu aproximadamente  $30 \text{mg}_{\text{carboidratos}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  e consumiu 8% de resíduo da nanofiltração, e o ensaio C<sub>2</sub> não apresentou diferença estatística em

relação a produtividade em carboidratos em relação ao ensaio C<sub>3</sub>, que consumiu 8% de resíduo.

Nos ensaios U<sub>1</sub> e N<sub>1</sub> atingiu-se produtividade de 60 mg<sub>carboidratos</sub>L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, os ensaios e U<sub>1</sub>, N<sub>1</sub> e U<sub>5</sub> e N<sub>5</sub> não apresentam diferença significativa entre si (p<0,005) (Figura 6b e 6c). Ao utilizar o meio Zarrouk 20%, adicionado ou não de resíduos, atingiu-se elevada produtividade em carboidratos. Portanto as condições experimentais investigadas nos ensaios U<sub>1</sub>, N<sub>1</sub> e U<sub>5</sub> e N<sub>5</sub> são consideradas apropriadas para a produção da biomassa microalgal da *Spirulina* quando o interesse é que esta biomassa seja utilizada como matéria-prima para a produção de bioetanol.

Indiferente do tipo do resíduo utilizado percebe-se que nos ensaios utilizando Zarrouk 30% adicionado de 2,5% de resíduo (Figura 6c) obteve-se a maior produtividade em carboidratos quando comparado aos ensaios com a mesma concentração de Zarrouk (30%), porém, sem a adição de resíduo. A produtividade em carboidratos no ensaio U<sub>6</sub> foi aproximadamente 3 vezes maior que no ensaio U<sub>2</sub>, e ambos foram cultivados com Zarrouk 30%, porém o ensaio U<sub>2</sub> não foi adicionado de resíduo. Assim pode-se afirmar que a adição de resíduo no meio Zarrouk 30% causou efeito positivo na produtividade em carboidratos, sendo que quanto maior a adição de resíduo, maior foi a produtividade em carboidratos.

Quanto à produtividade em proteínas apenas os ensaios N<sub>1</sub> e N<sub>2</sub> diferiram estatisticamente (p<0,05) (24 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e 43 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente), demonstrando que quanto menor a concentração de Zarrouk, menor o teor e a produtividade em proteínas (Figura 6b). A microalga cultivada em meio Zarrouk padrão apresentou elevada produtividade em proteínas (45 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), e ao utilizar o meio Zarrouk 30% a produtividade em proteínas foi maior do que quando cultivada em meio Zarrouk 20%. No entanto, ao adicionar o resíduo do processo de nanofiltração do soro de leite em concentrações de 1,25% e 2,50%, a produtividade em proteínas não sofreu alterações significativas. No planejamento utilizando o resíduo da ultrafiltração (Figura 6c) não houve diferença significativa entre nenhum ensaio do planejamento em relação à produtividade de proteínas.

O crescimento celular, a produtividade e a composição bioquímica podem sofrer intensas alterações de acordo com o tipo de cultivo desenvolvido (LEE, 2004). As condições de cultivo empregadas no ensaio N<sub>5</sub>, utilizando o resíduo da nanofiltração, são apropriadas para o cultivo da microalga *Spirulina* quando o produto de interesse é o bioetanol, devido a quantidade de resíduo adicionado (10%), a elevada concentração

celular final ( $3,22 \text{ g.L}^{-1}$ ), alto teor de carboidratos (aprox. 40%) e com isso, alta produtividade em carboidratos ( $60 \text{ mg}_{\text{carboidratos}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Porém no ensaio U<sub>5</sub>, utilizando o resíduo da ultrafiltração, estes parâmetros são estatisticamente iguais ao ensaio N<sub>5</sub> adicionado de resíduo da nanofiltração. Ambos ensaios foram realizados com Zarrouk 20% adicionado de 2,5% de resíduo. Como o resíduo foi adicionado em modo batelada alimentada, o volume total de resíduo adicionado varia em cada ensaio. E no ensaio utilizando o resíduo da nanofiltração (N<sub>5</sub>) o volume final foi de 10% do volume do cultivo, enquanto que no ensaio U<sub>5</sub>, onde foi utilizado o resíduo da ultrafiltração o volume final do resíduo foi de apenas, 2%. Pode-se observar na Figura 5d e na Figura 5i este comportamento, pois na Figura 5d está apresentado o gráfico de consumo de lactose, e indicados por uma seta os dias em que foi adicionado o resíduo. A Figura 5d mostra o gráfico do ensaio N<sub>5</sub>, onde foi realizado 7 adições de resíduo da nanofiltração em um período de 16 dias, enquanto que no ensaio U<sub>5</sub> (Figura 5i) realizou-se apenas 2 adições de resíduo da ultrafiltração durante 24 dias.

Comparando o ensaio N<sub>5</sub> (Tabela 5) que utilizou o resíduo da nanofiltração, e os controles C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>, não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao teor de proteínas. No entanto, a produtividade em carboidratos é diferente estatisticamente, sendo que no ensaio N<sub>5</sub> apresentou produtividade maior do que nos ensaios controles. No ensaio U<sub>5</sub> utilizando o resíduo da ultrafiltração, o ensaio apresenta maior produtividade em carboidratos, e em relação à produtividade de proteínas são iguais aos ensaios controles C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>. Algumas microalgas podem aumentar seu crescimento celular com a adição de moléculas orgânicas, tais como monossacarídeos (glicose, frutose, etc), ácidos orgânicos (acetatos, etc.), glicerol, aminoácidos, etc. (HEREDIA-ARROYO et al., 2011). Heredia-Arroyo et al. (2011) realizaram cultivos mixotróficos da microalga *C. vulgaris* adicionados de diferentes concentrações de glicose, e ao adicionar a maior concentração de glicose foi atingido elevados teores de concentração celular e de lipídeos. A lactose, assim como a glicose, é um açúcar redutor simples e provavelmente influenciou no teor de carboidratos nos ensaios C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>.

O objetivo foi a indução do acúmulo de carboidratos na microalga *Spirulina*, para que sua biomassa possa ser utilizada como matéria-prima para a produção de bioetanol e, observa-se que a redução dos nutrientes do meio Zarrouk para concentração de 20% é capaz de induzir este acúmulo de carboidratos. Entretanto a adição de resíduo pode ser realizada, pois ao reduzir os nutrientes do meio Zarrouk para 20% adicionado de resíduo da nanofiltração do soro de leite houve influência positiva no crescimento

celular. Esta influência no crescimento celular explica-se devido ao cultivo mixotrófico e também pelo alto teor de magnésio e cálcio presente neste resíduo.

Ao utilizar o meio Zarrouk 20% e adicionar um resíduo rico em lactose, magnésio e cálcio, faz com que a microalga *Spirulina platensis* altere suas vias metabólicas e passe a sintetizar carboidratos preferencialmente. A diluição do meio Zarrouk reduz os custos de produção da microalga, pois representa redução significativa dos custos com reagentes comerciais. Além disso, ao utilizar 2,5% de resíduo, além de apresentar influência positiva para a concentração celular da microalga, considera-se uma alternativa sustentável e ambiental da produção, pois o montante de resíduo a ser descartado ou encaminhado a estações de tratamento de efluentes será menor.

#### **4.4. Scale up para raceway de 10 L**

##### **4.4.1 Concentração celular e parâmetros cinéticos nos raceways pounds**

O aumento de escala, em *raceways* de 10 L, foi realizado em três ensaios: A, B e C. Os ensaios A e B foram realizados em modo descontínuo e sem adição de resíduo enquanto o ensaio C foi adicionado o permeado da ultrafiltração em modo descontínuo alimentado (Tabela 11). A escolha dos ensaios para o aumento de escala foi determinada pelos resultados obtidos em escala laboratorial. Os ensaios A e C foram realizados porque estes apresentaram as maiores produtividades em carboidratos, e o ensaio B porque apresentou elevada produtividade em proteínas.

O ensaio C foi realizado com meio Zarrouk 20% e adição de 2,5% de permeado da ultrafiltração. Esta mesma condição foi testada em modo descontínuo alimentado nos fotobiorreatores de 1 L, e atingiu produtividade em carboidratos elevada ( $60 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ). Por este motivo decidiu-se realizar o *scale up* para 10 L, para verificar se em maior escala esta condição também apresentaria bons resultados em termos de concentração celular, teor de carboidratos e produtividade de carboidratos.

O ensaio B apresentou a maior concentração celular final ( $2,51 \text{ g.L}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ) em comparação aos ensaios A e C. Em comparação ao ensaio A, o ensaio B apresentou maior crescimento porque este ensaio apresenta maior concentração de nutrientes. O ensaio C, com menor concentração de Zarrouk (20%) e com a adição de 2,5% de permeado da ultrafiltração atingiu a menor concentração celular ( $1,12 \text{ g.L}^{-1}$ ). Esta baixa

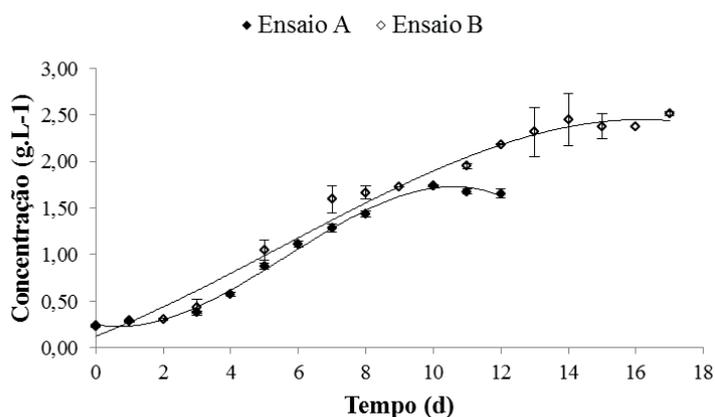
concentração celular no ensaio C indica que a microalga não se adaptou ao resíduo no aumento de escala, no qual a luminosidade não foi controlada.

Tabela 13- Concentração celular e parâmetros cinéticos de crescimento

Ensaio	Zarrouk % v/v	Resíduo % v/v	Modo de cultivo	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{d}^{-1}$ )	Intervalo da fase log	Duração da fase log (d)	$R^2$	X final ( $\text{g.L}^{-1}$ )
A	20	-	Descontínuo	$0,27 \pm 0,00^b$	3-8	5	0,94	$1,65 \pm 0,05^b$
B	30	-	Descontínuo	$0,09 \pm 0,02^a$	5-14	9	0,91	$2,51 \pm 0,02^c$
C	20	2,5%	Batelada alimentada	$0,23 \pm 0,01^b$	2-9	7	0,98	$1,12 \pm 0,02^a$

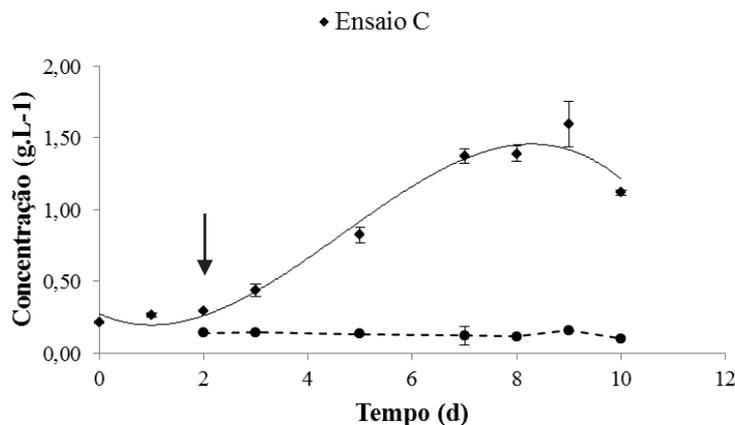
Em relação aos cultivos realizados nos fotobiorreatores de 1 L, os cultivos realizados em *raceways* atingiram a fase estacionária em um período menor (Figuras 12 e 13), sendo que no ensaio A, a microalga atingiu a fase estacionária em 12 d, o ensaio B em 18 d e o ensaio C em 10 d. O ensaio B foi cultivado com meio Zarrouk 30% e provavelmente devido a maior quantidade de nutrientes que nos ensaios A e B, permaneceu por mais tempo na fase log (9 d).

Figura 12 - Concentração celular em função do tempo dos ensaios A e B realizados nos *raceways*



Ensaio A (◆) (Zarrouk 20%) e ensaio B (◇) (Zarrouk 30%)

Figura 13 - Concentração celular em função do tempo do ensaios C realizados nos *raceways*



Ensaio C (Zarrouk 20%, 2,5% de permeado da UF), sendo (♦) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e (●) concentração de lactose.

Ao realizar o aumento de escala da condição  $U_5$  para os *raceways* (ensaio C), nota-se que o cultivo em maior escala (ensaio C) atingiu a fase estacionária em um tempo menor que no ensaio  $U_5$ . A duração da fase log do ensaio C foi de 7 d, enquanto que a do ensaio  $U_5$  foi de 12 d. O ensaio C apresentou concentração celular final ( $1,12 \text{ g.L}^{-1}$ ) inferior a obtida no ensaio  $U_5$  ( $2,85 \text{ g.L}^{-1}$ ). No ensaio  $U_5$  foram realizadas 3 adições do permeado durante o cultivo, enquanto que no ensaio C, apenas uma adição foi realizada, pois a microalga não consumiu o resíduo (Figura 12). Isto demonstra que ao realizar o aumento da escala, a microalga não se adaptou ao resíduo adicionado, diferente do ensaio realizado em escala laboratorial.

Vonshak et al. (1982) constataram que nas concentrações entre  $0,4 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa da *Spirulina*, ocorre em um decréscimo do potencial fotossintético da microalga, devido a ausência de luz incidente sobre a maioria das células, causadas pelo efeito de sombreamento das próprias células. Mesmo em cultivos com a concentração celular de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ , considerado ideal para a máxima eficiência fotossintética, cerca de 80% das células passou algum tempo em escuridão completa. O efeito de sombreamento causado pela concentração de células no ensaio C, e também pela adição do permeado da ultrafiltração pode ter influenciado para a diminuição da concentração celular final. Segundo Kumar et al. (2013) e Shuterland et al. (2014) a luz é um dos maiores obstáculos para a produtividade de biomassa das microalgas. A própria pigmentação das microalgas provoca diminuição exponencial na intensidade de luz. Nos

sistemas tipo raceways, a quantidade de luz recebida por cada célula da microalga depende da concentração da biomassa e da turbidez do cultivo .

Nos ensaios realizados em escala laboratorial, a luminosidade era menor, porém o volume de cultivo também. No entanto, ao realizar os ensaios nos *raceways*, a luminosidade foi maior, mas os volumes de cultivo também e estes ensaios tiveram menor concentração celular do que os ensaios nos fotobiorreatores. Nos ensaios DU<sub>1</sub> e DU<sub>2</sub>, cultivados com meio Zarrouk 20% e 30%, atingiram concentração celular de 3,47 g.L<sup>-1</sup> e 1,95 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Enquanto que nos ensaios com as mesmas concentrações de Zarrouk (20% e 30%), mas realizados em *raceways*, foi obtida concentração celular final de 1,65 g.L<sup>-1</sup> e 2,51 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Realizou-se o teste Anova a 95% de confiança entre os ensaios com as mesmas concentrações, porém cultivados em diferentes fotobiorreatores (Tabela 14). O ensaio A apresentou concentração celular menor que o ensaio DU<sub>1</sub>, e ambos foram cultivados somente com meio Zarrouk 20%. O ensaio B e DN<sub>2</sub>, os quais foram realizados com meio Zarrouk 30% não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ). O ensaio C e U<sub>5</sub>, apresentaram diferença estatística em relação a concentração celular, e o ensaio realizado em sistema fechado e em escala laboratorial obteve concentração celular maior. Com exceção dos ensaios cultivados com Zarrouk 30% (ensaios C e DU<sub>2</sub>), os ensaios realizados em fotobiorreatores fechados de 1 L apresentaram concentração celular maior que nos ensaios realizados nos *raceways* de 10 L.

Tabela 14 - Comparação da concentração celular dos ensaios em sistemas fechados e abertos

Ensaio	Concentração Meio Zarrouk (% v/v)	Concentração de Resíduo (% v/v)	Biorreator	X <sub>final</sub> (g.L <sup>-1</sup> )
A	20%	-		1,65 ± 0,05 <sup>a</sup>
B	30%	-	<i>Raceway</i> de 10L	2,51 ± 0,02 <sup>b</sup>
C	20%	2,5%		1,12 ± 0,02 <sup>a</sup>
DU <sub>1</sub>	20%	-	Fotobiorreator	3,47 ± 0,25 <sup>c</sup>
DU <sub>2</sub>	30%	-	fechado de 1L	1,95 ± 0,03 <sup>ab</sup>
U <sub>5</sub>	20%	2,5%		2,85 ± 0,31 <sup>b</sup>

\*Média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios.

O ensaio C diferencia-se dos ensaios A e B, pela adição da fonte de carbono orgânico proveniente do permeado da ultrafiltração. Hoje em dia, o cultivo de microalgas, é em grande parte, dependente do uso de águas residuais, visto que o meio de cultivo representa um terço do custo total envolvido no processo de produção de

microalgas (KUMAR et al, 2016). A redução e reutilização de águas são as peças chave da sustentabilidade ambiental e econômica na produção de biocombustíveis de microalgas. A utilização de águas residuais no cultivo de microalgas pode acarretar em contaminação bacteriana (KAZAMIA et al., 2012; KUMAR et al, 2016). No entanto, a adição de bactérias no meio de cultivo pode ter um efeito positivo. As bactérias fazem simbiose com as microalgas, e as bactérias tem a capacidade de sintetizar a vitamina B12, vitamina essencial para o crescimento das microalgas (KAZAMIA et al., 2012). No entanto, em elevadas concentrações, as bactérias podem agir como substâncias inibidoras, causando diminuição na produtividade das microalgas. E também, a adição de bactérias pode induzir a competição por nutrientes e ocasionar a perda de nitrogênio, através do processo de desnitrificação (ERKELENS et al, 2014; KUMAR et al, 2016).

Isto pode explicar o fato da microalga consumir os resíduos quando foram cultivados em fotobiorreatores de 1 L e em condições estéreis apresentar elevada concentração celular e ter consumido o resíduo de maneira eficaz. Entretanto ao realizar o aumento do escala, não foi possível controlar a contaminação bacteriana, e, portanto, a presença de bactérias, não foi saudável para as microalgas, quando as mesmas foram cultivadas em tanques tipo *raceways* (ERKELENS et al, 2014; GRESSEL et al, 2013).

#### **4.4.2 Teor e produtividades de carboidratos e proteínas nos *raceways* pounds**

Entre os ensaios A, B e C, realizados em mini-tanques tipo *raceways* de 10 L, avaliou-se o teor e produtividades de carboidratos e proteínas. A mesma condição dos ensaios A e C, quando testadas em escala laboratorial apresentaram elevada produtividade em carboidratos, e o ensaio B, com Zarrouk 30% apresentou elevada produtividade em proteínas nos ensaios realizados em fotobiorreatores de 1 L.

Todos os ensaios realizados nos *raceways* apresentaram diferença estatística entre si em relação ao teor de carboidratos, sendo que o ensaio C (Zarrouk 20%, 2,5% de permeado da UF) apresentou o maior teor de carboidratos intracelulares (68,11%). O ensaio A, também obteve teor elevado de carboidratos (52,51%). Em relação as produtividades em carboidratos os ensaios A, B e C não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Embora em relação ao teor de carboidratos apresentar diferença estatisticamente entre os ensaios, a concentração celular também apresentou, sendo que

foi menor no ensaio C, o que justifica as produtividades em carboidratos serem iguais estatisticamente.

Tabela 15 - Teor e produtividade de carboidratos e proteínas obtidas nos ensaios realizados em *raceways*

Ensaio	Zarrouk %	Resíduo % v/v	Modo de cultivo	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Produtividade em carboidratos (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Produtividade em proteínas (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
A	20	-	Descontínuo	52,51 ± 0,28 <sup>b</sup>	37,17 ± 0,09 <sup>ab</sup>	72,42 ± 2,48 <sup>a</sup>	51,25 ± 1,61 <sup>b</sup>
B	30	-	Descontínuo	44,87 ± 2,09 <sup>a</sup>	44,70 ± 5,37 <sup>b</sup>	66,40 ± 3,68 <sup>a</sup>	66,10 ± 7,36 <sup>b</sup>
C	20	2,5%	Batelada alimentada	68,11 ± 2,34 <sup>c</sup>	24,80 ± 4,35 <sup>a</sup>	76,21 ± 1,48 <sup>a</sup>	27,72 ± 4,46 <sup>a</sup>

\*Média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios.

Em relação ao teor de proteínas, os ensaios B e C são diferentes estatisticamente, sendo que no ensaio C apresentou o menor teor de proteínas (24,80%), o que era esperado, devido ao elevado teor de carboidratos obtido neste ensaio. Em relação a produtividade em proteínas, o mesmo comportamento foi verificado, sendo que apenas os ensaios B e C são diferentes estatisticamente ( $p > 0,05$ ), e o ensaio C apresentou menor produtividade em proteínas (27,72 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>).

A comparação entre as produtividades em carboidratos entre os ensaios realizados em fotobiorreatores fechados em escala laboratorial e em fotobiorreatores abertos tipo *raceways* foi realizada, através do Teste Anova e Tukey com 95% de confiança (Tabela 16). Visto que para nortear a utilização da biomassa da microalga *Spirulina* para a produção de bioetanol é importante avaliar a produtividade em carboidratos.

Tabela 16 - Produtividade em carboidratos dos ensaios em sistemas fechados e abertos

Ensaio	Concentração Meio Zarrouk (% v/v)	Concentração de Resíduo (% v/v)	Biorreator	Produtividade em carboidratos (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
A	20%	-	<i>Raceway</i> de 10L	72,42 ± 2,48 <sup>c</sup>
B	30%	-		66,40 ± 3,68 <sup>bc</sup>
C	20%	2,5%		76,21 ± 1,48 <sup>c</sup>
DU <sub>1</sub>	20%	-	Fotobiorreator fechado de 1L	68,55 ± 8,55 <sup>bc</sup>
DU <sub>2</sub>	30%	-		14,52 ± 0,78 <sup>a</sup>
U <sub>5</sub>	20%	2,5%		50,13 ± 8,19 <sup>b</sup>

\*Média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios.

Os ensaios com meio Zarrouk 20% tanto em sistema aberto quanto sem sistema fechado, foram obtidos elevadas produtividades em carboidratos e estas (ensaio A e ensaio DU<sub>1</sub>) não apresentaram diferença estatística entre si. Porém entre os ensaios com Zarrouk 30% a produtividade em carboidratos foi maior no ensaio B do que no ensaio DU<sub>2</sub>. E o ensaio C obteve maior produtividade em carboidratos que no ensaio U5, apesar de ambos utilizarem a mesma concentração de meio Zarrouk e de resíduo (Tabela 16). Apesar dos ensaios realizados em fotobiorreatores fechados apresentarem maiores concentrações celulares do que quando cultivados nos *raceways*, o inverso ocorreu com a produtividade em carboidratos. Isto significa que apesar de obter menor concentração celular nos ensaios realizados nos *raceways*, a microalga acumulou maiores teores de carboidratos no sistema de cultivo aberto, o que possibilitou maior produtividade em carboidratos.

Poucos estudos relataram a produção de bioetanol a partir da biomassa da microalga *Spirulina platensis*. A microalga *Spirulina* é mundialmente utilizada e conhecida devido às suas propriedades antioxidantes (Costa e Morais, 2011). Essa biomassa também pode acumular altos níveis de carboidratos, gerando uma nova alternativa para a produção de bioetanol, principalmente em sistemas de biorrefinaria. Markou et al. (2013) usou biomassa de *Spirulina* contendo 55% de carboidratos e obteve uma produtividade de 16,3% de etanol ( $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{biomassa}}$ ). Em nosso estudo, *Spirulina* atingiu de 68% de carboidratos (ensaio C), o que permite a sua utilização para a produção de bioetanol.



## 5 CONCLUSÕES

A diluição do meio nutriente Zarrouk para 20% propiciou elevado teor e produtividade de carboidratos na microalga *Spirulina platensis*. E ao utilizar esta concentração de meio Zarrouk adicionado de resíduos do processo de concentração da proteína do soro de leite, em modo descontínuo alimentado, proporcionou aumento na produtividade de carboidratos da biomassa da microalga, a qual atingiu  $60 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Este resíduo com alto teor de lactose, baixos níveis de fósforo, potássio e ferro propiciou um estresse na microalga e fez com que ela acumulasse cerca de 58% de carboidratos intracelulares, quando cultivadas em fotobiorreatores fechados de 1 L.

O aumento de escala dos cultivos realizados em fotobiorreatores tipo *raceways* de 10 L foi favorável para o aumento de carboidratos na microalga, e conseqüentemente na produtividade de carboidratos. Todas as condições testadas nos *raceways* apresentaram cerca de 70% de carboidratos (meio Zarrouk nas concentrações de 20% e 30%, sem adição de resíduo, e com a concentração de 20% de Zarrouk adicionado de 2,5% de permeado da ultrafiltração). Estas três condições realizadas nos *raceways* atingiram também elevada produtividade em carboidratos (cerca de  $70 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ).

A microalga *Spirulina platensis* demonstrou ser uma matéria-prima promissora para a produção de bioetanol, devido à elevada produtividade em carboidratos atingida. A diluição do meio Zarrouk diminui os custos de produção da microalga e o maior volume de resíduo adicionado diminui o montante que seria descartado no meio ambiente.

A produção de biocombustíveis a partir da biomassa de microalgas é considerado caro e o retorno do investimento é demorado. E o meio de cultivo representa um terço do custo de produção das microalgas. Ao reduzir as concentrações do meio Zarrouk é possível diminuir os custos de produção da microalga, visto que estes componentes químicos presentes no meio Zarrouk são caros. No entanto, com a melhoria de tecnologias, espera-se que os biocombustíveis de microalgas se tornem em breve economicamente viável e comparável ao dos combustíveis fósseis em termos de custo de produção. Ainda são necessárias a avaliação do custo do cultivo de microalgas e a hidrólise dos polissacáridos.

São necessárias o desenvolvimento de novas tecnologias e inovações para reduzir os custos de produção. E isto pode ser realizado com sucesso através de um programa de pesquisa e desenvolvimento, coerente, extenso e bem financiado. Para isto,

a indústria deve deliberar e buscar novos modelos de negócio, que pensem no futuro, e no potencial de bioenergia de microalgas através do mercado de combustíveis de transporte, bem como a produção de outros produtos de maior valor, para transformar a economia possível.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Testar condições de cultivo com concentração de meio Zarrouk de 5%, 10% e 15%, para verificar se diminuindo mais a concentração de nutrientes, a microalga *Spirulina platensis* atinge produtividades em carboidratos ainda maiores.

Cultivar a microalga *Spirulina platensis* nas condições verificadas para obtenção de elevada produtividade em carboidratos, com posterior produção de bioetanol.

Realizar o *scale up* para tanques de *raceways* de 300 L nas condições testadas nos mini-*raceways* de 10 L.

Ao utilizar resíduos nos cultivos da microalga *Spirulina platensis*, fazer contagem de bactérias para fazer um controle ou uma comparação, por exemplo, se cultivos com maior contaminação possuem maior concentração celular ou de carboidratos da microalga.

Fazer a identificação dos carboidratos da microalga *Spirulina platensis* e realizar a hidrólise dos carboidratos e avaliar a produção real de bioetanol.

Recuperar sais do meio para reutilizar o meio de cultivo, através da tecnologia de separação por membranas.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Novos+Alimentos+e+Novos+Ingredientes/64ac1100401aecf4b4b4b654e035b7cb> Acesso em: 11 mar 2014
- AIE. Agência Internacional de Energia. **World Energy Outlook**. 2013 Disponível em: [http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WEO2013\\_Executive\\_Summary\\_Portuguese.pdf](http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WEO2013_Executive_Summary_Portuguese.pdf) Acesso em 17 nov. 2014.
- ALGENOL B. **Algenolbiofuels**. Disponível em: <http://www.algenol.com/direct-to-ethanol/direct-to-ethanol> Acesso em 12 nov. 2014.
- ANP. **Agência Nacional de Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis**. Boletim da produção de petróleo e gás natural de janeiro de 2015. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=74332&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1425928173044> Acesso em 09 mar. 2015
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of AOAC international**. 16 ed., Arlington: AOAC International, 1995.
- AOAC (ASOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis** 18. Ed. Washington: AOAC, 2005
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. Atomic Absorption Method for Evaporated Milk-Official Final Action. 13<sup>th</sup> ed. AOAC, 1980.
- APHA (American Public Health Association) American Water Works Association Water, Environment Federation. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association. 3, 83-98; 1995.
- ARAUJO, G.S.; **Utilização de microalgas na biotecnologia, com ênfase para biodiesel e análise de imunoparâmetros em camarões marinhos**. Tese de Doutorado em Engenharia de Pesca. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- AZEREDO, V.B.S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil**. Dissertação (Mestrado em Planejamento energético) UFRJ, Rio de Janeiro, 2012
- BALDASSO, C. Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do sorolácteo através de tecnologia de separação por membranas. **Dissertação de mestrado em Engenharia Química**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008
- BALDASSO, C.; BARROS, T.C.; TESSARO, I.C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011.
- BATIST, AP.; AMBROSANO, L.; GRAÇA, S.; SOUSA, C.; MARQUES P.A.S.S.; RIBEIRO, B.; POTREL, E.P.; NETO, P.G.; GOUVEIA, L. Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production – An integrated microalgae-based approach. **Bioresource Technology**. v.184, p.230-235, 2015.
- BECKER, E. W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycoecology**. London: Blackwell Science, p.312-351, 2004.

BIOCOMBUSTÍVEIS; Resumo Temático Energia e Clima; **BCSD Portugal Conselho Empresarial para o Desenvolvimento Sustentável**; Disponível em: <http://www.wbcds.org/web/publications/Biofuels-Portuguese.pdf> Acesso em 13 out 2014.

BJERK, T.R. **Cultivo de microalgas em fotobiorreator e reator misto visando a biorremediação e produção de biocombustíveis**. Dissertação.(Mestrado em Tecnologia Ambiental) UNISC. Santa Cruz do Sul 2012.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**.v. 25, n.3, p.743-756, 2013

BORUFF, B.J.; MOHEIMANI, N.R.; BOROWITZKA, M. A.; Identifying locations for large-scale microalgae cultivation in Western Australia: A GIS approach. **Applied Energy**. v. 149, p.379-391, 2015

BRENNAN, L. e OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.

BRIÃO, V.,B.; MAGOGA, J.; HEMKEMEIER, M.; BRÃO, E.B.; GIRARDELLI, L.; SBEGHEN, L.; FAVARETTO, D.P.C. Reverse osmosis for desalination of water from the Guarani AquiferSystem to produce drinking water in southern Brazil. **Desalination**. v.344, p.402-411, 2014

CARDOSO A., VIEIRA, G.E.G.; MARQUES, A.K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 9, n. 4, p. 542-549 2011.

CARLOS, M. R. E. Avaliação das propriedades funcionais de hidrolisados de proteínas do soro de leite. 1997. 97 f. **Dissertação** -Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

CERON-GARCIA, M.C. et al. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylumtricornutum*.Influence of diferente nitrogen and organic carbono sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry** v. 40, p. 297-305, 2005.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; TRIRATANA, P.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Polysaccharide extraction from Spirulina sp. and its antioxidants capcity. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 58, p. 73-78, 2013.

CHEN, C.-Y.; YEHA, K-L.; AISYAHA, R.; LEEC, D-J.; CHANGA; J-S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource technology**, v. 102, n.1, p. 71-81, 2011.

CHEN, C.Y.; ZHAO, X.Q., YEN, H.W.; HOD, S.H.; CHENG, C.L.; LEE, D.J.; BAI, F.W; CHANG, J.S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**. v. 78, p. 1-10, 2013.

CHEN, H.; ZHAO, J.; HU, T.; ZHAO, T.; DEHUA, L. A comparison of several organosolv pretreatments for improving the enzymatic hydrolysis of wheat straw: Substrate digestibility, fermentability and structural features. **Applied Energy**. v. 150, p. 224-232, 2015

CHEN, R-H, L.-B.CHIANG, C.-N.CHEN E T.-H. LIN.. Cold-start emissions of an SI engine using ethanol–gasoline blended fuel. **Applied Thermal Engineering**, v. 31, p. 1463-1467, 2011.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F.J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 21-34, 2004.

COLLA, L.M. et al. Planta piloto de produção de microalgas e uso da biomassa em aquicultura, na produção de bioetanol e como antioxidante. **Projeto de pesquisa, desenvolvimento e inovação para a produção de biocombustíveis e bioprodutos a partir de microalgas**. Chamada MCTI/CNPQ N° 56, 2013.

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

DE PHILIPPIS, R.; VICENZINI, M. Exocellular polysaccharide from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiol Reviews**. v. 22, p. 151-175, 1998.

DEMIRBAS, A., Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. **Energy Conversion and Management**, v. 49, p. 2106-2116, 2008.

DEPRAETERE, O., FOUBERT, I., MUYLAERT, K., Decolorisation of piggyery wastewater to stimulate the production of *Arthrospira platensis*. **Bioresource Technology**. V. 148, p. 366-372. 2013.

DERNER, R.B; OSHE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DISMUKES, G. C. et al., Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, p. 235-240, 2008.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A, 1999. **Novas metodologias para a fermentação alcoólica do soro de queijo**. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3671/1/CNQA-C15-30%5B2%5D.PDF>>. Acesso em: 8 out. 2014.

DOUSKOVA I., J. DOUCHA, J. MACHAT, P. NOVAK, D. UMYSOVA, M. VITOVA e V. ZACHLEDER Microalgae as a means for converting flue gas CO<sub>2</sub> into biomass with high content of starch. **Proceedings of the International Conference: Bioenergy: Challenges and Opportunities**, Guimarães, Portugal, Abril 2008.

DUARTE, I. C. S. Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella sp* (Chlorophyta, Chlorococcales). **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)** – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; MITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ERKELENS M., BALL A. S., LEWIS A.S., D.M.. The influences of the recycle process on the bacterial community in a pilot scale microalgae raceway pond. **Bioresource Technology** v.157 p.364-7, 2014.

ESCOBAR, J. C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YÁÑEZ, E. E.; CASTILLO, E. F.; ALMAZAN, O.; Biofuels: Environment, technology and food security; **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1275-1287, 2009.

- FAO, O. (2011). OECD-FAO Agricultural Outlook 2011-2020. Agricultural Outlook(p.197). Disponível em:  
<http://www.oecd.org/redirect/dataoecd/52/34/48202074.pdf> Acesso em 22 out 2014
- FERREIRA, L.S., RODRIGUES, M.S., CONVERTI, A., SATO, S., CARVALHO, J.C.M., *Arthrospira Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO<sub>2</sub> from ethanol fermentation. **Applied. Energy**. 92, 379-385, 2012.
- FERREIRA, V.R.S., PASSADOR, C. S.O Cenário Sobre Biocombustíveis, Políticas Públicas e Sustentabilidade na Produção Científica Nacional e Internacional: a Internacionalização das Pesquisas do Brasil? **XXXVIII Encontro da ANPAD**. Rio de Janeiro, RJ, 2014
- FRADIQUE, M.; BATISTA, A. P.; NUNES, M. C.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; RAYMUNDO, A.; Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina máxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation; **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1656-1664, 2010
- GODOS, I. DE, H. O. GUZMAN, R. SOTO, P. A. GARCÍA-ENCINA, E. BECARES, R MUÑOZ E V. A. VARGAS. Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 923-927, 2010
- GONG, Y.; JIANG, M. Biodiesel Production with Microalgae as Feedstock: from Strains to Biodiesel. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1269-1284, 2011.
- GRESSEL J, VAN DER VLUGT CJB, BERGMANS HEN. Environmental risks of large scale cultivation of microalgae: mitigation of spills. **Algal Research**; v.2 p. 286–98, 2013.
- GROBBELAR, J.U. Algal biotechnology: real opportunities for Africa, South African **Journal of Botany**, v. 70, p. 140-144, 2004
- HARUN, R. e DANQUAH, M. K. Enzymatic hydrolysis of microalgais biomass for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 3, p. 1079-1084, 2011
- HARUN, R., SINGH, M., FORDE, G. M. & DANQUAH, M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037-1047, 2010a.
- HARUN, R., SINGH, M., FORDE, G. M. & DANQUAH, M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037-1047, 2010a.
- HARUN, R.; DANQUAH, M.K.; FORDE, G.M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, 199-203, 2010.
- HARUN, R.; JASON, W. S. Y.; CHERRINGTON, T.; DANQUAH, M. K.; Microalgal biomass as a cellulosic fermentation feedstock for bioethanol production; **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 2010b Disponível em:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032110002510#> Acesso em 05 mar 2015
- HARUN, R. e DANQUAH, M. K. Enzymatic hydrolysis of microalgais biomass for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 3, 2011

- HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; RUAN, R.; HU, B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from no-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 2245-2253, 2011
- HO, S.H.; HUANG, S.W., CHEN, C.Y., HASUNUMA, T.; KONDO, A., CHANG, S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191-198, 2013a
- HO, S.H.; LI, P.J.; LIU, C.C.; CHANG, J.S. Bioprocess development on microalgae-based CO<sub>2</sub> fixation and bioethanol production using *Scenedesmusobliquus* **Bioresource Technology**, v. 145, p. 142-149, 2013b
- HOEKMAN, S. K. Biofuels in the U.S. - Challenges and Opportunities. **Renewable Energy**, v. 34, p. 14-22, 2009
- IMMAN, S.; ARNTHONG, J.; BURAPATANA, V.; CHAMPREDA, V.; Influence of alkaline catalyst addition on compressed liquid hot water pretreatment of rice Straw. **Chemical Engineering Journal**. v. 278, p. 85-91, 2015
- JOHN, R. P.; ANSHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. et al. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 186-193, 2011.
- KAZAMIA E.; CZESNICK, H.; NGUYEN, T.T.V.; CROFT, M.T.; M.S. ;SASSO, S.; HODSON, S. J.; WARREN, M., J.;ALISON GAIL SMITH, A.G.; Mutualistic interactions between vitamin B12-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. **Environmental Microbiology**. v.14, p.1466–76 2012.
- KIM, J, B. P. LINGARAJU, R. RHEAUME, J.-Y. LEE K. F. Siddiqui. Removal of Ammonia from Wastewater Effluent by *Chlorella vulgaris*. **Tsinghua Science & Technology**, v. 16, p. 391-396, 2010.
- KONG, Q.-X, L. LI, B. MARTINEZ,P. CHEN E R. RUAN. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 9-18, 2010.
- KUMAR K, SIRASALE A, DAS D. Use of image analysis tool for the development of light distribution pattern inside the photobioreactor for the algal cultivation. **Bioresource Technology**, v.143 p. 88–95, 2013.
- KUMAR, K., MISHRA, S.K., SHRIVASTAV, A.; PARK, M.S., YANG, J.W. Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v.51, p. 875–885. 2015
- KUMAR, S., CHAUBE, A., JAIN, S. K. Critical review of jatropha biodiesel promotion policies in India. **Energy Policy**, v. 41, p. 775-781, 2012.
- LA ROVERE, E. L., PEREIRA, A. S., & SIMÕES, A. F. Biofuels and Sustainable Energy Development in Brazil. **World Development**, v. 39, n. 6, p. 132-133, 2011.
- LEE, H.Y.; ERICKSON, L. E.; YANG, S.S.; Kinetics and Bioenergetics of Light-limited photoautotrophic growth of *Spirulina platensis*. **Biotechnology and Bioengineering** v. 29, n. 7, p. 832-843, 1987.
- LEE, Y.K. Algal nutrition: heterotrophic carbon nutrition. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v 193, p. 265-276, 1951.
- LUNDQUIST, T. J.; WOERTZ, I.C.; QUINN, N.W.T.; BENEMANN J.R."A Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production." **Energy BiosciencesInstitute**, 2010. Disponível em: <http://www.energybiosciencesinstitute.org/media/AlgaeReportFINAL.pdf> Acesso em 05 nov 2014
- MACEDO, I. J. SEABRA E J. SILVA. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 7, p. 582-595, 2008
- MADKOUR, F.F.; KAMIL,A.E.; NASR, H.S. Production and nutritivevalue of *Spirulina platensis* in reducedcost media. **EgyptianJournal of AquaticResearch**. v. 38, p. 51-57, 2012.
- MAGRO, F. G. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em *raceways* para a obtenção de matéria-prima para produção de bioetanol. **Exame de qualificação do mestrado em Engenharia Civil e Ambiental**. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2015.
- MAHDY, A.; MENDEZ, L.; BALLESTEROS, M.; FERNANDEZ, C.G.; Algalculture integration in conventional wastewater treatment plants: Anaerobic digestion comparison of primary and secondary sludge with microalgae biomass. **Bioresource Technology**, v.184, p. 236-244, 2015
- MANDIK, Y.I.; CHEIRSILP, B.; BOONSAWANG, P.; PRASERTSAN, P. Optimization of flocculation efficiency of lipid-rich marine *Chlorella* sp biomass and evaluation of its composition in diferente cultivation modes. **Bioresource Technology**. v. 182, p. 89-97, 2015.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução normativa SDA nº 68 de 12/12/2006. Anexo métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, 14 dez 2006.
- MARGARITES, A.C. **Síntese de carboidratos por microalgas e produção de bioetanol**. Tese de doutorado (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, 2014
- MARGARITES, A.C.F. e COSTA, J.A.V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, ed. 3, p. 80-86, 2014.
- MARKOU, G. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* and *Chorella* in ammonia-rich waste-water: Optimization of nutrient removal and biomass production. **BioresourceTechnology**, v. 193, p. 35-41, 2015
- MATA, T. M.; MARTINS, A. a. e CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.
- MATAMOROS, V., GUTIÉRREZ, R.; FERRER, I.; GARCIA, J.; BAYONA, J.M. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems toremove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. **Journal of Hazardous Materials**. v. 288, p. 34-42, 2015.

- MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v.110, p.85-93, 2004
- MILANO, J., ONG, H.C., MASJJUKI, H.H., CHONG, W.T., LAM, M.K., LOH, P.K., VELLAYAN, V.. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy**. v. 58, p. 180-197, 2016.
- MILLER, G. L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**., v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959
- MIRANDA, J.R.P.C., **Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus***. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Energia e Bioenergia. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2011
- MOURA JÚNIOR, A.M.; BEZERRA NETO, E.; KOENING, M.L.; LEÇA, E.E. Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow). **Ciência Agrônômica**, v. 37, n. 2, p.142-148, 2006.
- MUSSATO, S. I., G. DRAGONE, P. M. R. GUIMARÃES, J. P.A. SILVA, L. M. CARNEIRO, I. C. ROBERTO, A. VICENTE, L. DOMINGUES e J. A. TEIXEIRA. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production-R1. **Biotechnology Advances** v. 28, n. 6, p. 817-830, 2010.
- ONCEL, S.S. Microalgae for a macroenergy world. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 26, p. 241-264, 2013.
- PAGNO, C.H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I.C.; FLORES, S.H.; JONG, E.V. Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Alimentos e Nutrição**, v.20, p. 231-239, 2009.
- PARMAR, A.; SINGH, N.K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 10163-10172, 2011.
- PATIL, S.; AL-ZAREA, B.K.; MAHESHWARI, S.; SAHU, R. Comparative evaluation of natural antioxidants *Spirulina* and aloe vera for the treatment of oral submucous fibrosis. **Journal of oral biology and craniofacial research**. v. 1, p. 1-5, 2015.
- PERIMENIS, A., WALIMWIPI, H., ZINOVIEV, S., MÜLLER-LANGER, F., MIERTUS, S. Development of a decision support tool for the assessment of biofuels. **Energy Policy**, v. 39, n. 3, p. 1782-1793, 2011
- POSADAS, E.; MORALES, M.M; GOMEZ, C.; ACIÉN, F.G.; MUNÑOZ, R.; Influence of pH and CO<sub>2</sub> source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. **Chemical Engineering Journal**, v. 265, p. 239-248, 2015.
- PULZ, O. Cultivation techniques for microalgae in open and closed ponds. **Proceedings of the 1st European workshop on microalgal biotechnology**. Potsdam, : 1992
- RICHMOND, A **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. A. Richmond, Blackwell Science, 2004.
- RICHMOND, A. **CRC Handbook of microalgal mass culture**. Florida: CRC Press, p. 528 1990a.

- RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company, 2004a.
- RICHMOND, A. Outdoor mass culture of microalgae ; biological principles, productions systems. IN: RICHMOND, A. (ed.). **CRC Handbook of microalgal culture**. Boca Raton; CRC, 1990b
- RICHMOND, A. Phototropic microalgae. In: REHM, H. J.; REED, G. (eds.) **Biotechnology**. v.3, Weinheim: Verlag Chemie, 1983.
- RUTHES, A.C. **Otimização da produção de polissacarídeos em microalgas verdes isoladas de fungos liquenizados**. Monografia de conclusão de Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- SANTOS, R.R., ARAUJO, O.Q.F., MEDEIROS, J.L., CHALOUB, R.M. Cultivation of *Spirulina máxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**. v. 204, p. 38-48, 2016.
- SARKAR, D.; SHIMIZU, K.; An overview on biofuel and biochemical production by photosynthetic microorganisms with understanding of the metabolism and by metabolic engineering together with efficient cultivation and downstream processing. **Bioresources and Bioprocessing a Springer Open Journal**. v. 2, p. 1-19, 2015.
- SCHMIDELL, W., FACCIOTTI M.C.R., **Biorreatores e processos fermentativos. In.: SCHMIDEL et al, Biotecnologia Industrial**. Edgard Blücher Ltda. Vol 2, 2004
- SCHMIDELL, W.; LIMA, A.U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: E. Blücher, 2001. 254 p.
- SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.
- SINGH, J. GU, S.. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Review**. v. 14, p. 2596-2610, 2010
- SIQUEIRA, A.M.O.; MACHADO, E.C.L.; STAMFORD, T.L.M., Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 8, p. 1693-1700, 2013.
- SUGANYA, T., VARMAN, M., MASJUKI, H.H., RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.55, p. 909-941, 2015.
- SUTHERLAND DL, TURNBULL MH, CRAGGS RJ. Increased pond depth improves algal productivity and nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds. **Water Research**; v. 53, p.271–81. 2014
- TOKUSOGLU, O.; UNAL, M.K. Biomass nutrient profile of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. **Journal of Food Science**, v. 68, n 4, p. 1144-1148, 2003
- TOMEI, J., UPHAM, P. Argentinean soy-based biodiesel: An introduction to production and impacts. **Energy Policy**, v. 37, p. 3890–3898, 2009
- TORZILLO, G., VONSHAK, A. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 6, n. 5, p. 399-403, 1994

TRUMBO, J.L., TONN, B.E. Biofuels: A sustainable choice for the United States' energy future? **Technological Forecasting and Social Change**. v.1, p.1-15, 2015.

VONSHAK, A. Outdoor mass production of *Spirulina*. In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor e Francis, 1997

VONSHAK, A., ABELIOVICH, A., BOUSSIBA, S., ARAD, S., RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. **Biomass** v. 2, p. 175–185, 1982.

VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An overview. **Biomass**, v. 15, p. 233-247, 1988.

WANG, H.; JI, C.;; BI S.; ZHOU P.; CHEN, L.; LIU, T. Joint production of biodiesel and bioethanol from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema sp.* **Bioresource Technology**. v. 172, p. 169-173, 2014.

WORLD ECONOMIC FORUM (W.E.F). Annual meeting. Disponivelem: <http://www.weforum.org/events/world-economic-forum-annual-meeting-2015> Acesso: 10 mar 2015

WU, X.; STAGGENBORG, S.; PROPHETER, J. L.; ROONEY, W. L.; YU, J.; WANG, D. Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n.1, p.164-170, 2010.

YANG S. J.; YOO, H.Y.; CHOI, H.S.; LEE, J.H.; PARK,, C.; KIM, S.W. Enhancement of enzymatic digestibility of *Miscanthus* by electron beam irradiation and chemical combined treatments for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**. v. 275, p. 227-234, 2015

YEN, H.W.; HU, C.; CHEN, C.Y.; HO, S.H., LEE, D.J.; CHANG, J.S.; Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**. v. 135, p.166-174, 2013.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude de l'unicyanophycée. *Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima*. **Ph.D Thesis**, Université de Paris, 1966

ZHU, L.D.; Hiltunen, E.; ANTILA, E.; ZHONG, J.J.; YUAN, Z.H.; WANG, Z.M. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 30, p. 1035-1046, 2014.

ZOTTE, D.A.; CULLERE, M.; SARTORI, A.; SZENDRO, Z.; KOVACS, M.; GIACCONE, V.; DAL BOSCO, A. Dietary *Spirulina (Arthrospiraplatensis)* and Thyme (*Thymus vulgaris*) supplementation to growing rabbits: Effects on raw and cooked meat quality, nutrient true retention and oxidative stability. **Meat Science**. v. 98, p.94-103, 2014.

COSTA, J.A.V. AND MORAIS, M.G.. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 2-9. 2011

MARKOU, G., ANGELIDAKI, I., NERANTZIS, E., GEORGAKAKIS, D. Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **Energies**. v. 6, p. 3937-3950, 2013.

## APÊNDICE A – Resultados em descontinúo simples

Tabela 17 - Velocidades específicas de crescimento, concentrações celulares máximas e teor de carboidratos e proteínas obtidas nos ensaios dos planejamentos experimentais em modo descontinúo simples.

Ensaio	Zarrouk (% v/v)	Resíduo (% v/v)	µmáx (d <sup>-1</sup> )	Intervalo da fase log	Duração da fase log (d)	R <sup>2</sup>	X final (g.L <sup>-1</sup> )	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Produtividade em carboidratos (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Produtividade em proteínas (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
<b>Fonte de carbono: Retido da nanofiltração</b>											
DN <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,0	0,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	7-16	9	0,94	2,17 ± 0,34 <sup>b</sup>	58,17 ± 3,7 <sup>c</sup>	31,64 ± 5,98 <sup>a</sup>	63,29 ± 14,16 <sup>c</sup>	24,03 ± 1,34 <sup>a</sup>
DN <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,0	0,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	7-16	9	0,95	1,72 ± 0,24 <sup>b</sup>	14,94 ± 3,20 <sup>a</sup>	41,53 ± 1,40 <sup>b</sup>	13,01 ± 4,62 <sup>ab</sup>	43,40 ± 4,99 <sup>b</sup>
DN <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 4,0	0,14 ± 0,00 <sup>a</sup>	5-10	5	0,66	1,11 ± 0,07 <sup>a</sup>	57,11 ± 1,5 <sup>c</sup>	22,65 ± 2,08 <sup>a</sup>	45,17 ± 3,67 <sup>bc</sup>	17,85 ± 0,52 <sup>a</sup>
DN <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 4,0	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	5-12	7	0,65	1,75 ± 0,43 <sup>b</sup>	39,08 ± 6,04 <sup>b</sup>	17,17 ± 1,65 <sup>a</sup>	52,70 ± 15,38 <sup>c</sup>	21,18 ± 3,23 <sup>a</sup>
DN <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 10,0	0,16 ± 0,06 <sup>ab</sup>	6-9	3	0,60	0,35 ± 0,18 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND
DN <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 10,0	0,26 ± 0,01 <sup>b</sup>	6-9	3	0,97	0,91 ± 0,04 <sup>a</sup>	14,34 ± 2,92 <sup>a</sup>	25,01 ± 5,34 <sup>a</sup>	9,38 ± 2,33 <sup>a</sup>	16,17 ± 2,70 <sup>a</sup>
<b>Fonte de carbono: Permeado da ultrafiltração</b>											
DU <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,0	0,11 ± 0,01 <sup>A</sup>	5-18	13	0,96	3,47 ± 0,25 <sup>D</sup>	45,40 ± 0,10 <sup>D</sup>	27,25 ± 6,05 <sup>A</sup>	63,01 ± 4,49 <sup>D</sup>	37,87 ± 4,30 <sup>B</sup>
DU <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,0	0,09 ± 0,01 <sup>A</sup>	7-25	18	0,96	1,95 ± 0,03 <sup>C</sup>	17,16 ± 0,61 <sup>AB</sup>	40,80 ± 9,41 <sup>B</sup>	14,52 ± 0,78 <sup>AB</sup>	39,17 ± 2,09 <sup>B</sup>
DU <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 4,0	0,18 ± 0,02 <sup>A</sup>	2-9	7	0,86	1,03 ± 0,08 <sup>AB</sup>	22,29 ± 0,21 <sup>B</sup>	63,09 ± 1,78 <sup>C</sup>	17,62 ± 1,59 <sup>B</sup>	49,80 ± 2,63 <sup>B</sup>
DU <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 4,0	0,23 ± 0,06 <sup>A</sup>	2-8	6	0,93	0,91 ± 0,12 <sup>AB</sup>	21,05 ± 3,57 <sup>B</sup>	60,08 ± 5,67 <sup>C</sup>	15,90 ± 0,08 <sup>B</sup>	41,71 ± 1,63 <sup>B</sup>
DU <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 10,0	0,17 ± 0,08 <sup>A</sup>	1-11	10	0,87	1,25 ± 0,23 <sup>B</sup>	33,99 ± 4,09 <sup>C</sup>	37,85 ± 2,87 <sup>AB</sup>	30,49 ± 2,19 <sup>C</sup>	36,62 ± 9,54 <sup>B</sup>
DU <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 10,0	0,22 ± 0,13 <sup>A</sup>	2-6	4	0,80	0,55 ± 0,07 <sup>A</sup>	14,05 ± 0,89 <sup>A</sup>	38,57 ± 4,43 <sup>AB</sup>	5,96 ± 0,41 <sup>A</sup>	16,54 ± 4,06 <sup>A</sup>
<b>Dados dos Ensaios Controles</b>											
C <sub>1</sub>	100	0,0	0,10 ± 0,01 <sup>ab</sup>	5-19	14	0,98	1,93 ± 0,21 <sup>ab</sup>	20,60 ± 4,32 <sup>a</sup>	45,40 ± 3,28 <sup>a</sup>	17,09 ± 1,72 <sup>a</sup>	37,06 ± 5,26 <sup>a</sup>
<b>Fonte de carbono: Retido da nanofiltração</b>											
DC <sub>2</sub>	100	4,0	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	8-48	40	0,91	2,64 ± 0,09 <sup>b</sup>	52,21 ± 8,17 <sup>b</sup>	42,15 ± 1,40 <sup>a</sup>	25,98 ± 3,17 <sup>a</sup>	21,05 ± 1,43 <sup>a</sup>
DC <sub>3</sub>	100	10,0	0,25 ± 0,03 <sup>c</sup>	6-8	2	0,82	1,79 ± 0,54 <sup>ab</sup>	7,52 ± 0,80 <sup>a</sup>	47,67 ± 3,15 <sup>a</sup>	9,75 ± 3,9 <sup>a</sup>	61,39 ± 22,55 <sup>a</sup>
<b>Fonte de carbono: Permeado da ultrafiltração</b>											
DC <sub>4</sub>	100	4,0	0,08 ± 0,02 <sup>ab</sup>	3-22	19	0,79	2,5 ± 0,60 <sup>b</sup>	26,43 ± 7,07 <sup>a</sup>	50,03 ± 6,79 <sup>a</sup>	30,85 ± 14,97 <sup>a</sup>	57,52 ± 20,87 <sup>a</sup>
DC <sub>5</sub>	100	10,0	0,18 ± 0,00 <sup>c</sup>	1-8	7	0,74	0,56 ± 0,09 <sup>a</sup>	18,98 ± 1,52 <sup>a</sup>	40,24 ± 0,82 <sup>a</sup>	8,16 ± 1,99 <sup>a</sup>	17,15 ± 2,49 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Média ± desvio padrão, (n = 2). Letras minúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios que utilizaram o resíduo da nanofiltração. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios que utilizaram o resíduo da ultrafiltração. Letras minúsculas e em negrito iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança nos ensaios controles. ND: Não determinado.

## APÊNDICE B–Resultado em descontinuo alimentado

Tabela 18 - Velocidades específicas de crescimento, concentrações celulares máximas e teor de carboidratos e proteínas obtidas nos ensaios dos planejamentos experimentais e experimentos controles dos cultivos realizados em modo descontinuo alimentado.

Ensaio	Zarrouk (% v/v)	Resíduo (% v/v)	$\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> )	Intervalo da fase log	Duração da fase log (d)	R <sup>2</sup>	X final (g.L <sup>-1</sup> )	Carboidratos (%)	Proteínas (%)
<b>Fonte de carbono: Resíduo da nanofiltração</b>									
N <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,00	0,125 ± 0,02 <sup>a</sup>	7-16	9	0,94	2,17 ± 0,34 <sup>a</sup>	58,17 ± 3,7 <sup>b</sup>	22,30 ± 2,3 <sup>a</sup>
N <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,00	0,104 ± 0,02 <sup>a</sup>	7-16	9	0,95	1,72 ± 0,24 <sup>ab</sup>	14,94 ± 3,20 <sup>c</sup>	50,70 ± 1,4 <sup>c</sup>
N <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 1,25	0,123 ± 0,01 <sup>a</sup>	5-16	11	0,96	2,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	37,94 ± 1,20 <sup>a</sup>	25,85 ± 1,03 <sup>ab</sup>
N <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 1,25	0,109 ± 0,01 <sup>a</sup>	5-18	13	0,94	1,96 ± 0,17 <sup>ab</sup>	28,68 ± 2,28 <sup>a</sup>	33,60 ± 6,00 <sup>b</sup>
N <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 2,50	0,135 ± 0,01 <sup>a</sup>	5-18	13	0,99	3,22 ± 0,19 <sup>c</sup>	37,84 ± 2,73 <sup>a</sup>	18,96 ± 0,53 <sup>b</sup>
N <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 2,50	0,146 ± 0,05 <sup>a</sup>	7-14	7	0,95	1,33 ± 0,07 <sup>b</sup>	39,43 ± 18,99 <sup>b</sup>	37,23 ± 16,89 <sup>ab</sup>
<b>Fonte de carbono: Resíduo da ultrafiltração</b>									
U <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0,00	0,108 ± 0,01 <sup>A</sup>	5-18	13	0,96	3,47 ± 0,25 <sup>B</sup>	45,40 ± 0,10 <sup>AB</sup>	30,75 ± 6,05 <sup>A</sup>
U <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0,00	0,091 ± 0,01 <sup>D</sup>	7-25	18	0,96	1,95 ± 0,03 <sup>A</sup>	17,16 ± 0,61 <sup>C</sup>	40,81 ± 9,41 <sup>B</sup>
U <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 1,25	0,136 ± 0,01 <sup>C</sup>	5-21	16	0,99	2,64 ± 0,03 <sup>AB</sup>	44,02 ± 2,32 <sup>AB</sup>	26,68 ± 0,81 <sup>A</sup>
U <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 1,25	0,109 ± 0,02 <sup>A</sup>	7-16	9	0,94	2,10 ± 0,16 <sup>AB</sup>	21,82 ± 8,36 <sup>D</sup>	41,30 ± 5,19 <sup>B</sup>
U <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 2,50	0,126 ± 0,01 <sup>BC</sup>	7-19	12	0,97	2,85 ± 0,31 <sup>AB</sup>	43,81 ± 3,02 <sup>AB</sup>	26,38 ± 0,08 <sup>A</sup>
U <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 2,50	0,116 ± 0,01 <sup>A</sup>	7-21	14	0,96	3,10 ± 0,75 <sup>AB</sup>	37,25 ± 1,50 <sup>A</sup>	28,02 ± 3,01 <sup>A</sup>
<b>Dados dos Ensaios Controles</b>									
C <sub>1</sub>	100	0,00	0,097 ± 0,01 <sup>a</sup>	5-19	14	0,98	1,93 ± 0,21 <sup>a</sup>	20,60 ± 4,32 <sup>a</sup>	45,40 ± 3,28 <sup>a</sup>
<b>Fonte de carbono: Resíduo da nanofiltração</b>									
C <sub>2</sub>	100	1,25	0,122 ± 0,01 <sup>ab</sup>	5-19	14	0,98	2,70 ± 0,32 <sup>a</sup>	20,171 ± 0,57 <sup>ab</sup>	31,13 ± 0,35 <sup>a</sup>
C <sub>3</sub>	100	2,50	0,132 ± 0,01 <sup>b</sup>	5-19	14	0,98	3,28 ± 0,47 <sup>a</sup>	23,23 ± 7,17 <sup>b</sup>	32,22 ± 0,38 <sup>a</sup>
<b>Fonte de carbono: Resíduo da ultrafiltração</b>									
C <sub>4</sub>	100	1,25	0,105 ± 0,01 <sup>ab</sup>	10-23	13	0,99	2,48 ± 0,38 <sup>a</sup>	15,30 ± 0,21 <sup>a</sup>	35,47 ± 0,54 <sup>a</sup>
C <sub>5</sub>	100	2,50	0,131 ± 0,01 <sup>ab</sup>	10-25	15	0,96	2,56 ± 0,27 <sup>a</sup>	17,22 ± 2,78 <sup>a</sup>	33,32 ± 2,74 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios que utilizaram o resíduo da nanofiltração. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios que utilizaram o resíduo da ultrafiltração. Letras minúsculas e em negrito iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança nos ensaios controles.

## APÊNDICE C—Resultado em *raceways* pounds de 10 L

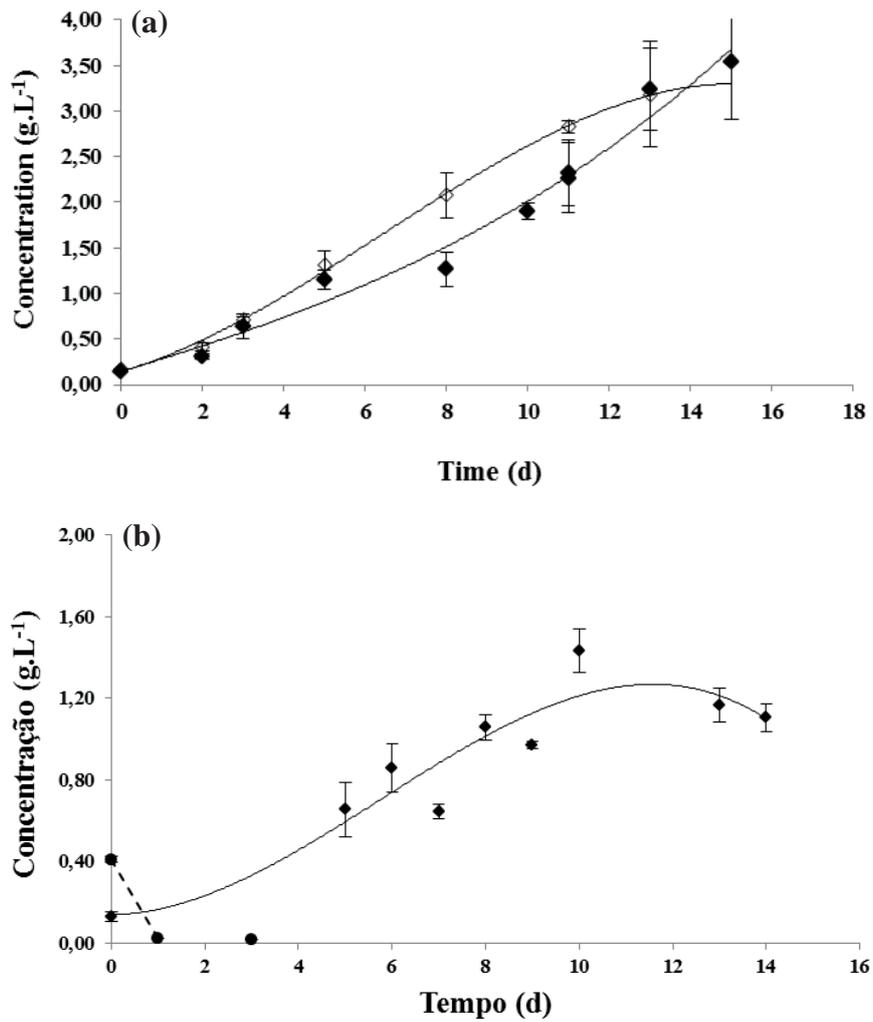
Tabela 19- Velocidades específicas de crescimento, concentrações celulares máximas e teor de carboidratos e proteínas obtidas nos ensaios dos planejamentos experimentais e experimentos controles dos cultivos realizados em *raceways*.

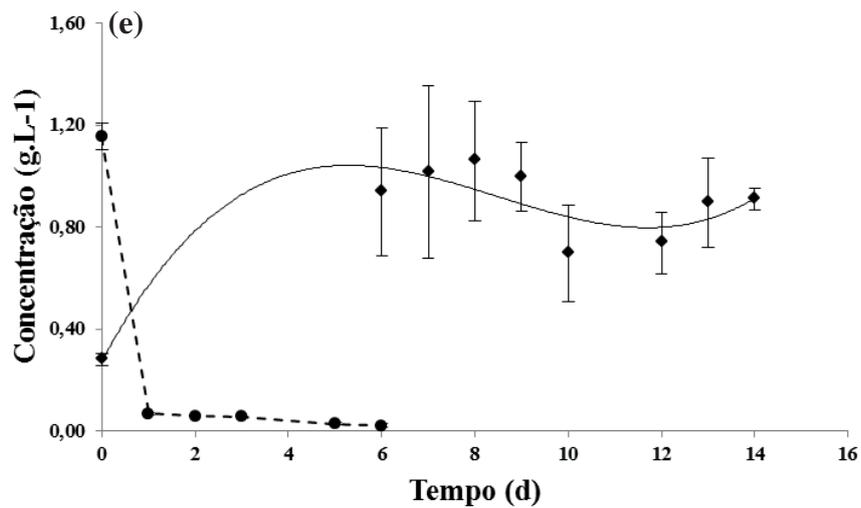
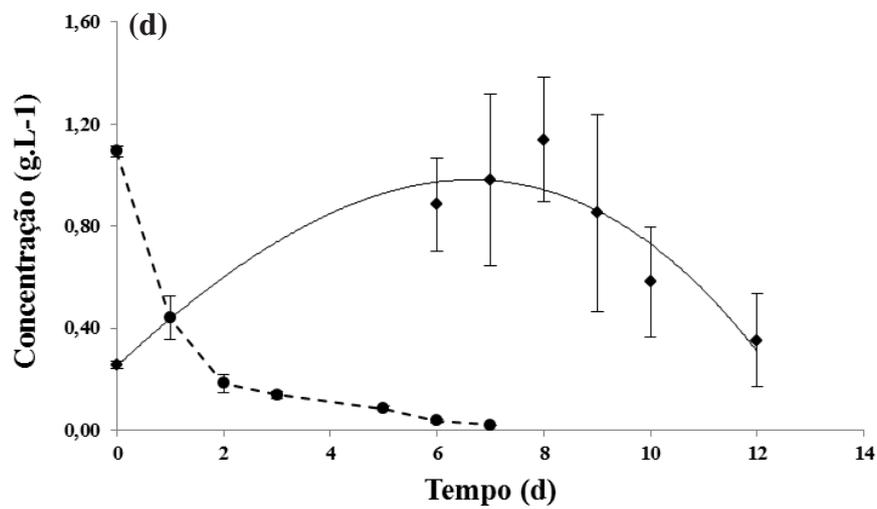
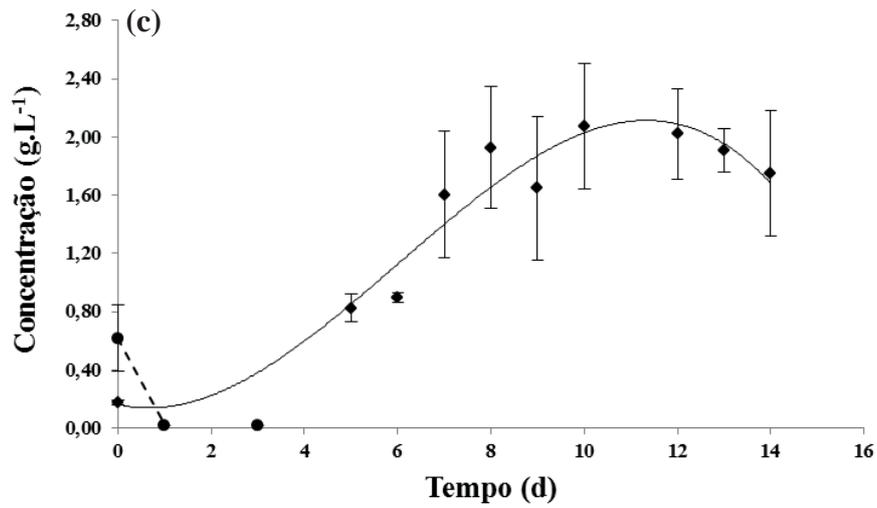
Ensaio	Zarrouk (% v/v)	Resíduo (% v/v)	μ <sub>máx</sub> (d <sup>-1</sup> )	Intervalo da fase log	Duração da fase log (d)	R <sup>2</sup>	X final (g.L <sup>-1</sup> )	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Produtividade em carboidratos (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Produtividade em proteínas (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
A	(-1) 20	(-1) 0,0	0,27 ± 0,00 <sub>b</sub>	3-8	5	0,94	1,65 ± 0,05 <sup>b</sup>	52,51 ± 0,28 <sup>b</sup>	37,17 ± 0,09 <sup>ab</sup>	72,42 ± 2,48 <sup>a</sup>	51,25 ± 1,61 <sup>b</sup>
B	(+1) 30	(-1) 0,0	0,09 ± 0,02 <sup>a</sup>	5-14	9	0,91	2,51 ± 0,02 <sup>c</sup>	44,87 ± 2,09 <sup>a</sup>	44,70 ± 5,37 <sup>b</sup>	66,40 ± 3,68 <sup>a</sup>	66,10 ± 7,36 <sup>b</sup>
C	(-1) 20	(0) 2,5	0,23 ± 0,01 <sub>b</sub>	2-9	7	0,98	1,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	68,11 ± 2,34 <sup>c</sup>	24,80 ± 4,35 <sup>a</sup>	76,21 ± 1,48 <sup>a</sup>	27,72 ± 4,46 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística a 95% de confiança entre os ensaios.

**APÊNDICE D – Gráficos concentração celular em função do tempo para os cultivos realizados em modo descontínuo simples e adicionados de retido de nanofiltração**

Figura 14 - Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de lactose em função tempo para os cultivos da microalga *Spirulina platensis* realizados com adição de retido da nanofiltração (NF) de soro de leite em modo descontínuo simples.

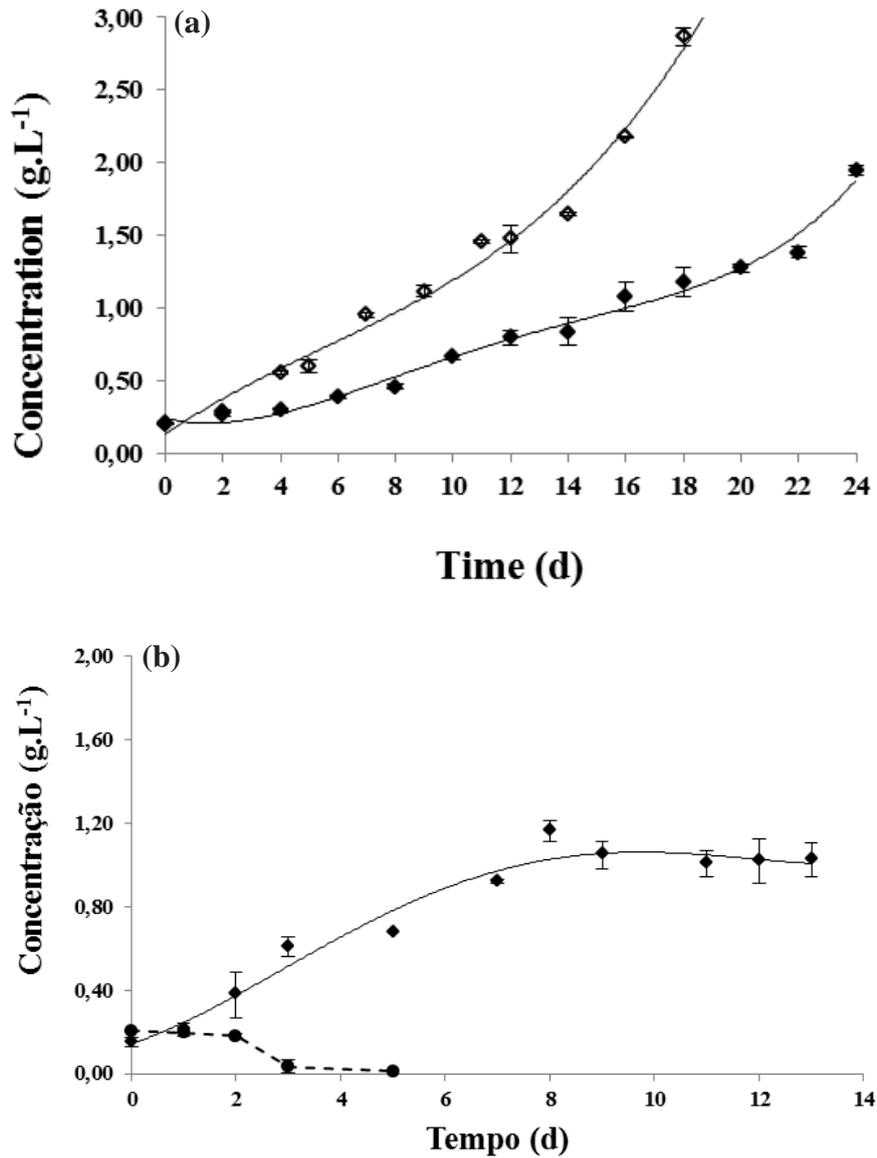


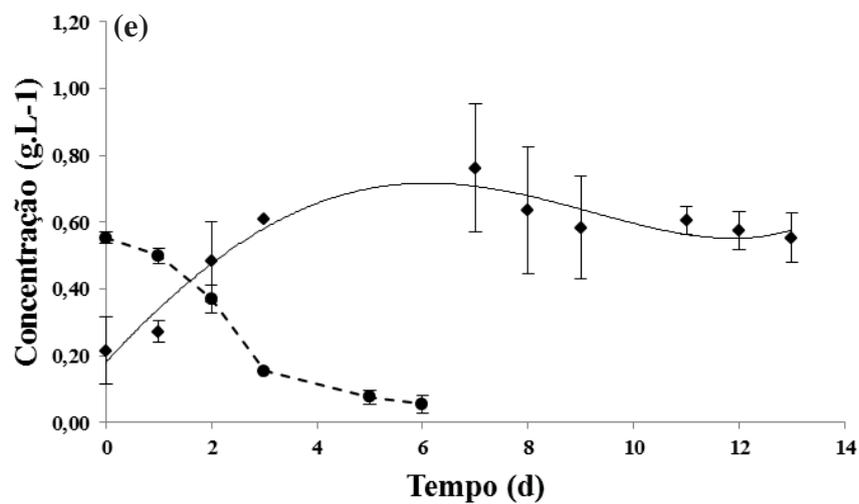
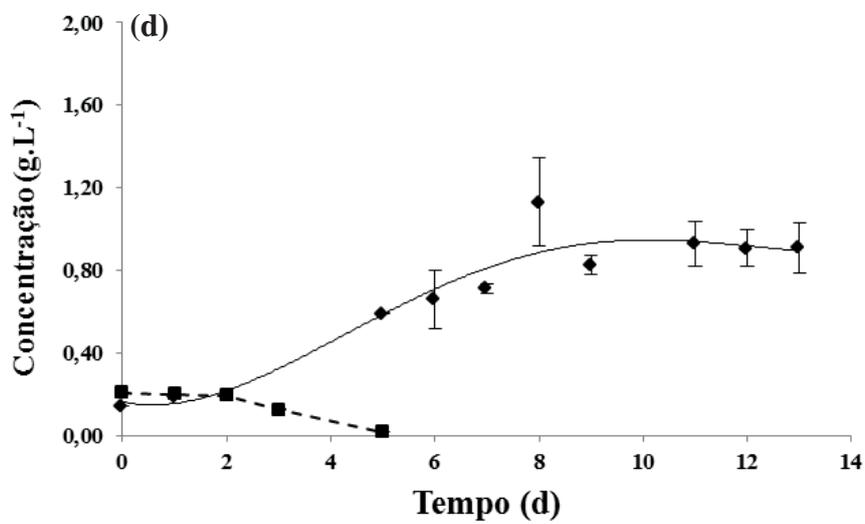
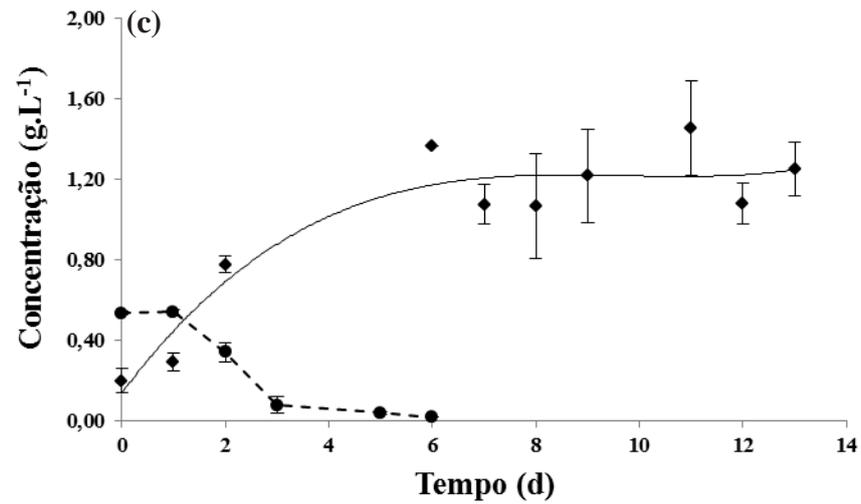


Ensaio DN<sub>1</sub> (Zarrouk 20%;  $\diamond$ ) e DN<sub>2</sub> (Zarrouk 30%;  $\blacklozenge$ ) - (a); ensaio DN<sub>3</sub> (Zarrouk 20%, 4,00% de retido da NF) - (b); ensaio D<sub>4</sub> (Zarrouk 30%; 4,00% de retido da NF) - (c); ensaio DN<sub>5</sub> (Zarrouk 20%, 10,0% de retido da NF) - (d), ensaio DN<sub>6</sub> (Zarrouk 30%, 10,0% de retido da NF) - (e); sendo ( $\blacklozenge, \diamond$ ) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e ( $\bullet$ ) concentração de lactose.

**APÊNDICE E – Gráficos concentração celular em função do tempo para os cultivos realizados em modo descontínuo simples e adicionados de permeado da ultrafiltração**

Figura 15 - Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de lactose em função tempo para os cultivos da microalga *Spirulina platensis* realizados com adição de permeado da ultrafiltração (UF) de soro de leite em modo descontínuo simples.

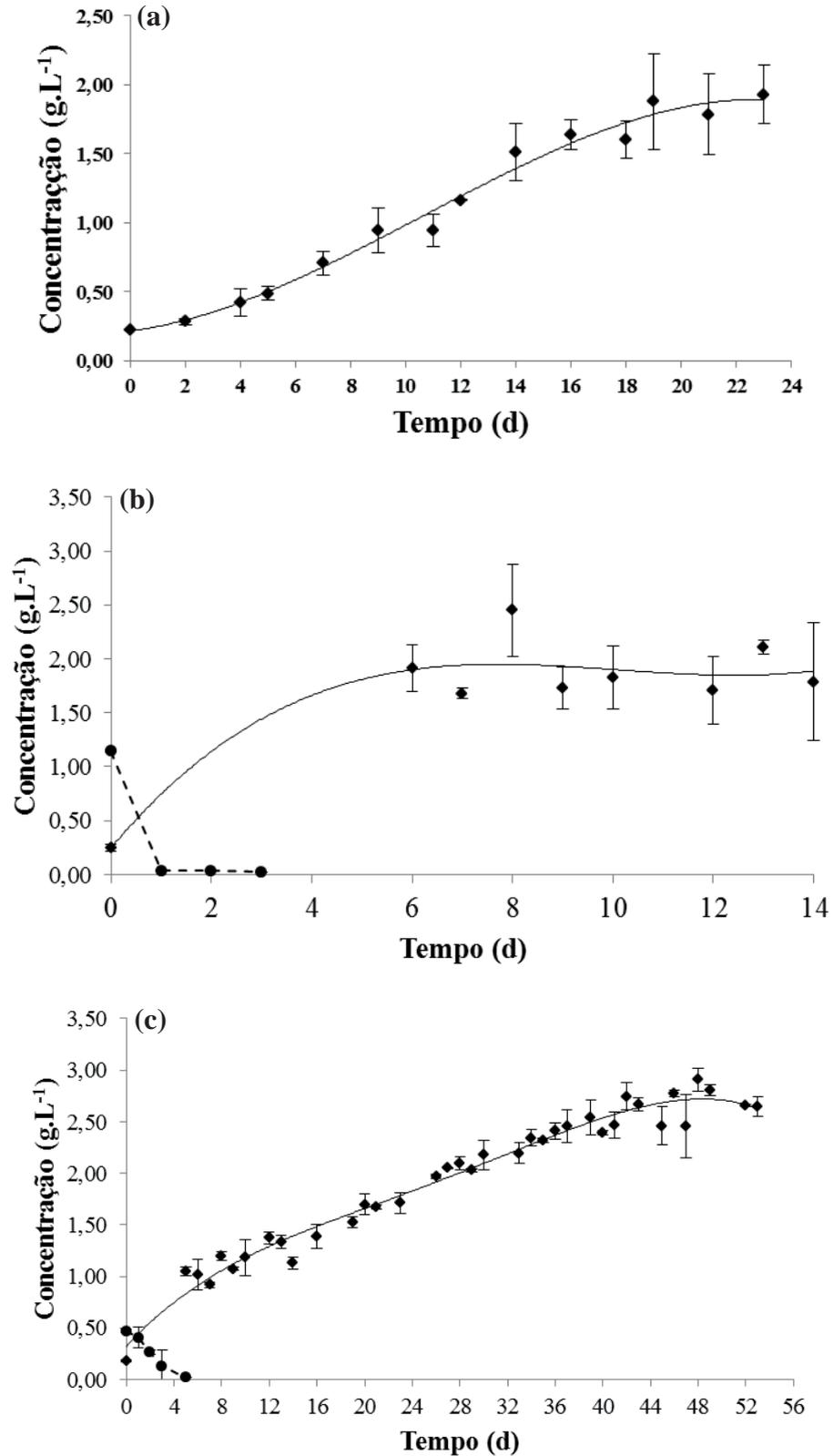


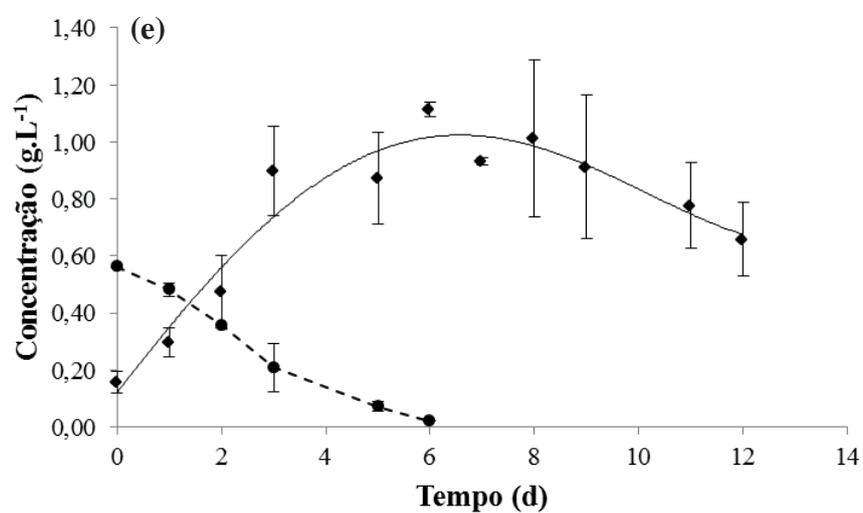
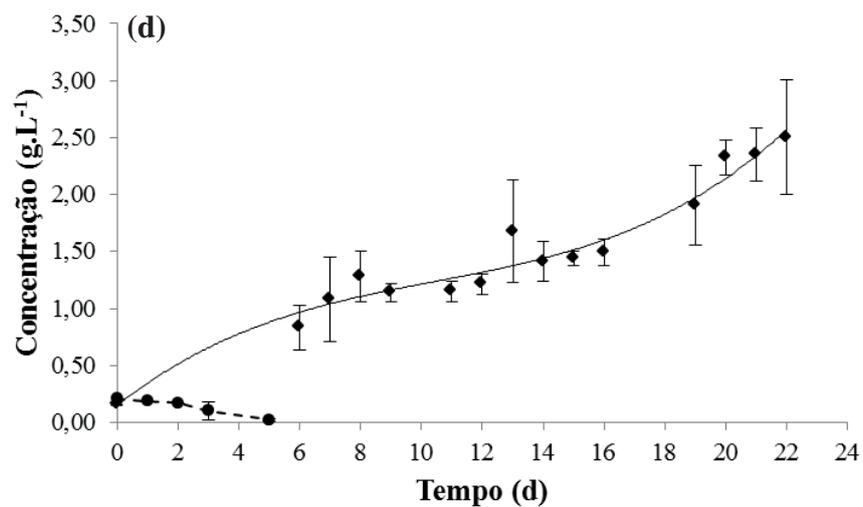


Ensaios DU<sub>1</sub> (Zarrouk 20%;  $\diamond$ ) e DU<sub>2</sub> (Zarrouk 30%;  $\blacklozenge$ ) - (a); ensaio DU<sub>3</sub> (Zarrouk 20%, 4,00% de retido da NF) - (b); ensaio DU<sub>4</sub> (Zarrouk 30%; 4,00% de retido da NF) - (c); ensaio DU<sub>5</sub> (Zarrouk 20%, 10,0% de retido da NF) - (d); ensaio DU<sub>6</sub> (Zarrouk 30%, 10,0% de retido da NF) - (e); sendo ( $\blacklozenge, \diamond$ ) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e ( $\bullet$ ) concentração de lactose.

## APÊNDICE F – Gráficos concentração celular em função do tempo dos ensaios controles realizados em modo descontínuo simples

Figura 16 - Curvas de crescimento e consumo de lactose dos cultivos em modo descontínuo da microalga *Spirulina platensis* nos ensaios controles

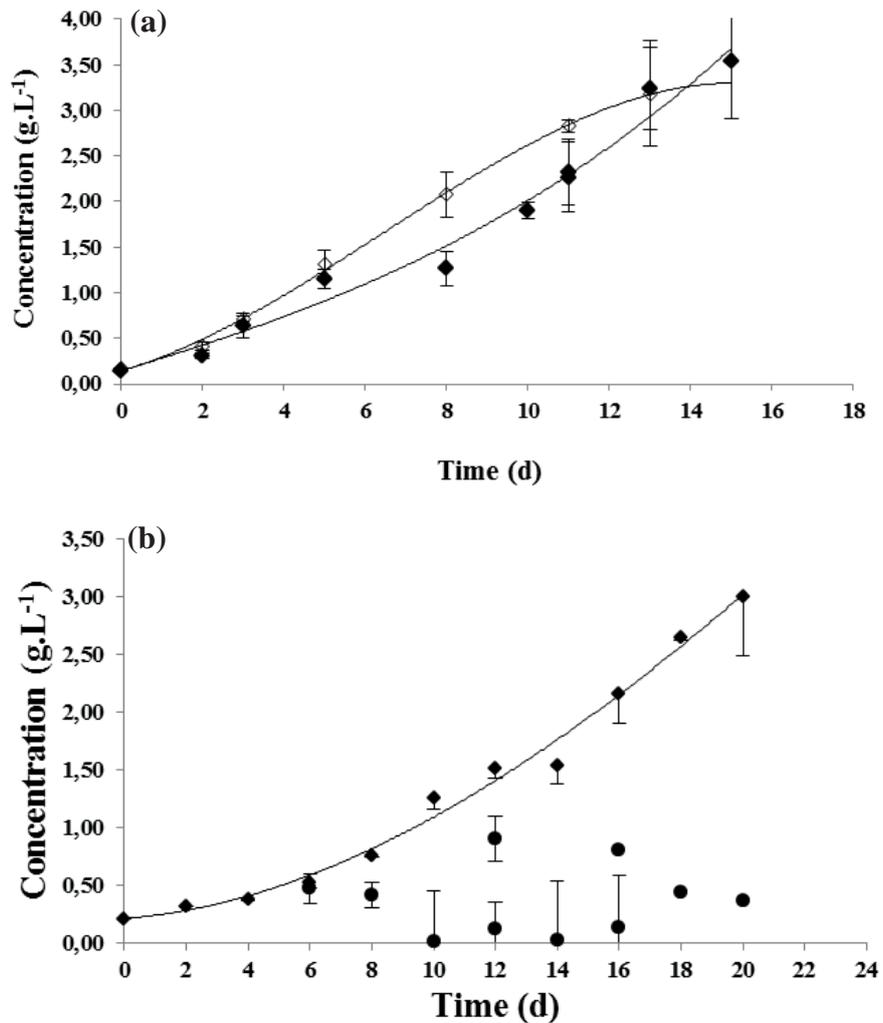


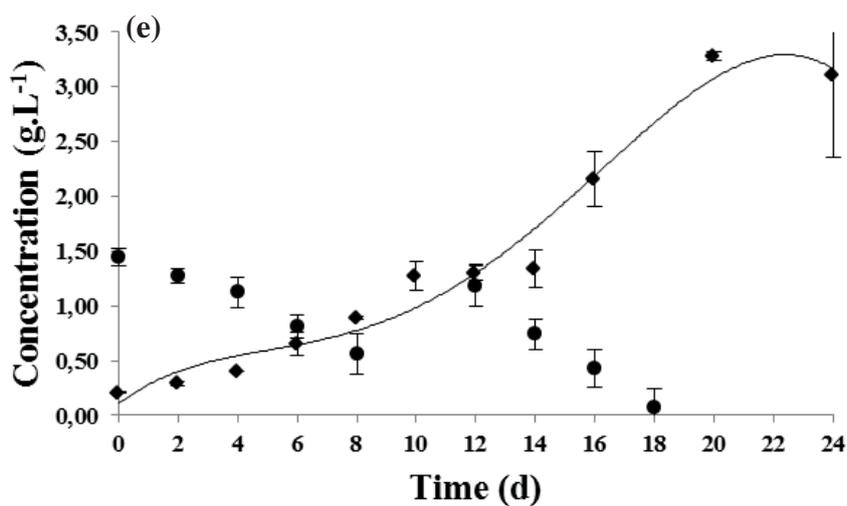
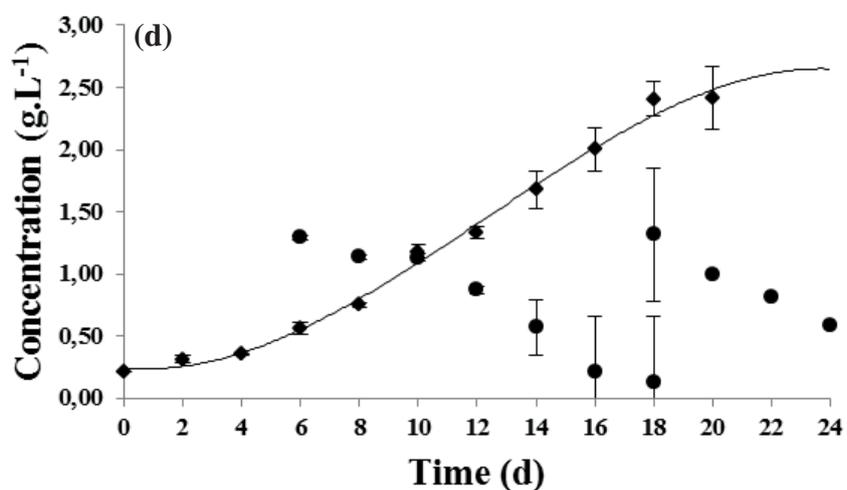
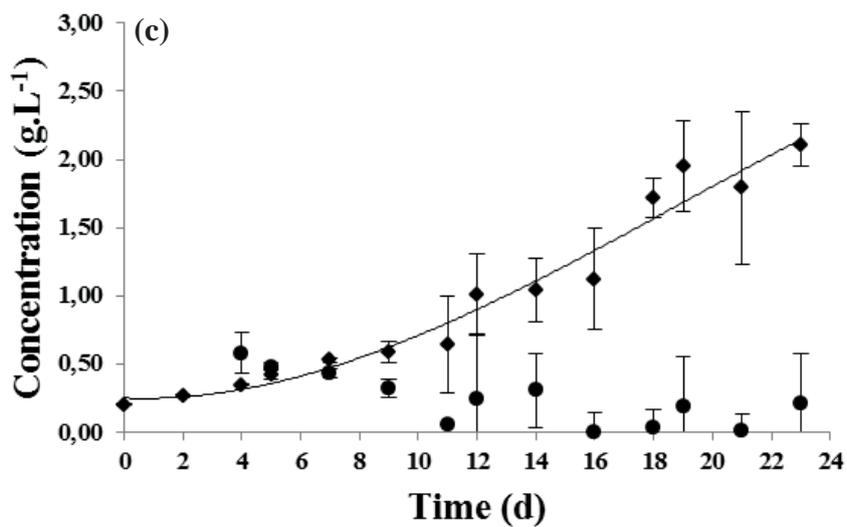


Ensaio DC<sub>1</sub> (Zarrouk 100%) - (a); ensaio DC<sub>2</sub> (Zarrouk 100%, 4,0% de retido da NF) - (b); ensaio DC<sub>3</sub> (Zarrouk 100%, 10,0% de retido da NF) - (c); ensaio DC<sub>4</sub> (Zarrouk 100%, 4,0% de permeado da UF) - (d); ensaio DC<sub>5</sub> (Zarrouk 100%, 10,0% de permeado da UF) (e), sendo (●) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e (◆) concentração de lactose. As figuras (b) e (c) referem-se aos ensaios controles adicionados de resíduo da nanofiltração, e as figuras (d) e (e) aos ensaios controles adicionados do resíduo da ultrafiltração.

**APÊNDICE G – Gráficos concentração celular em função do tempo para os cultivos realizados em modo descontínuo alimentado e adicionados de retido de nanofiltração**

Figura 17 - Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de lactose *versus* tempo para os cultivos da microalga *Spirulina platensis* realizados com adição de retido da nanofiltração (NF) de soro de leite.

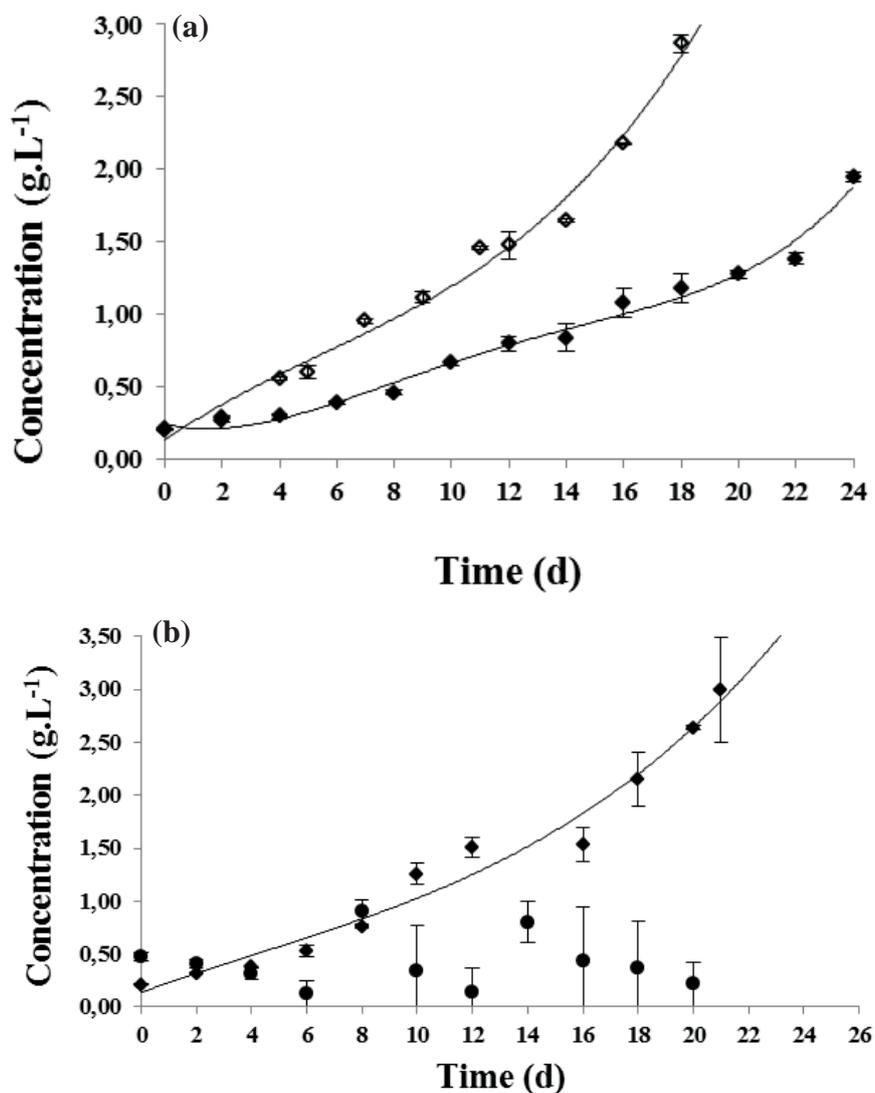


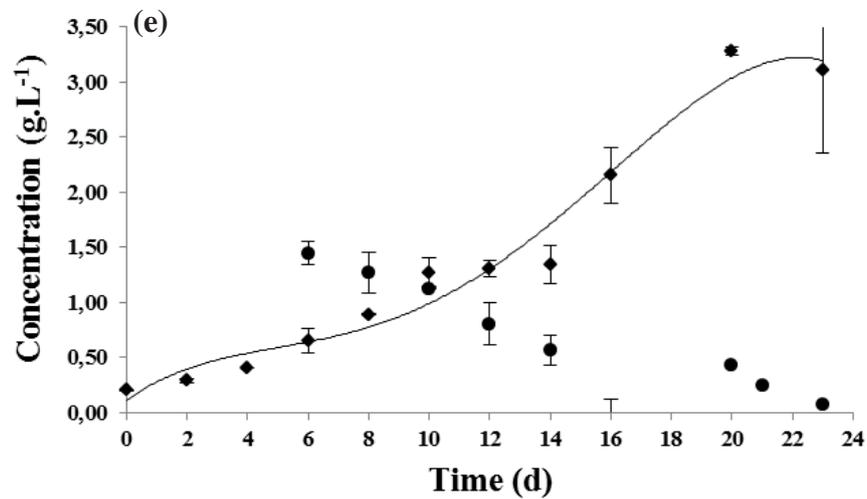
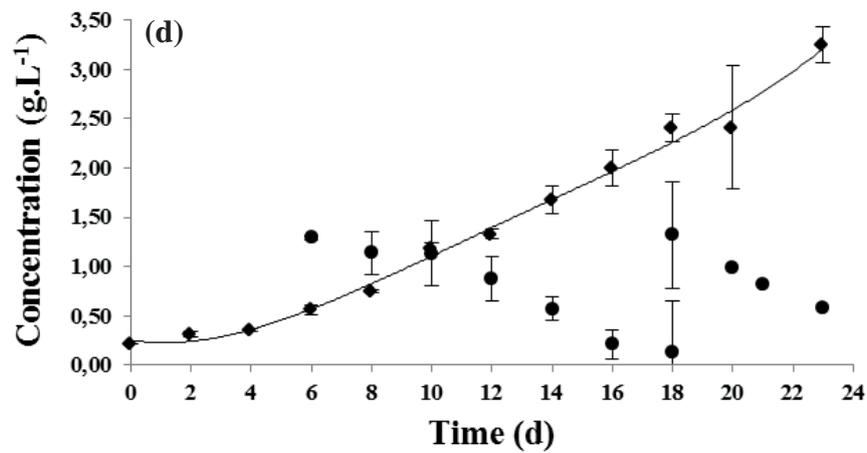
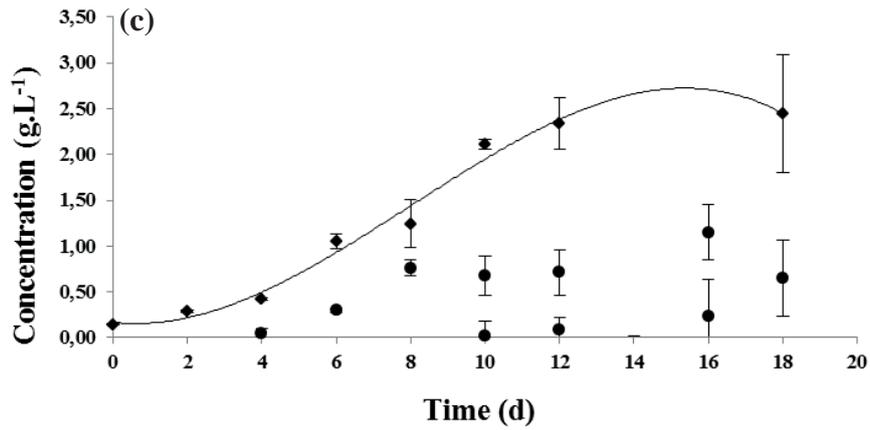


Ensaios N<sub>1</sub> (Zarrouk 20%;  $\diamond$ ) e N<sub>2</sub> (Zarrouk 30%;  $\blacklozenge$ ) - (a); ensaio N<sub>3</sub> (Zarrouk 20%, 1,25% de retido da NF) - (b); ensaio N<sub>4</sub>, (Zarrouk 30%; 1,25% de retido da NF) - (c); ensaio N<sub>5</sub> (Zarrouk 20%, 2,5% de retido da NF) - (d); ensaio N<sub>6</sub> (Zarrouk 30%, 1,25% de retido da NF) - (e); sendo ( $\blacklozenge, \diamond$ ) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e ( $\bullet$ ) concentração de lactose. As setas indicam a concentração de lactose após a adição de resíduo.

**APÊNDICE H – Gráficos concentração celular em função do tempo para os cultivos realizados em modo descontínuo alimentado e adicionados de permeado da ultrafiltração**

Figura 18 - Concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de lactose *versus* tempo para os cultivos da microalga *Spirulina platensis* realizados com adição de permeado da ultrafiltração (UF) de soro de leite.

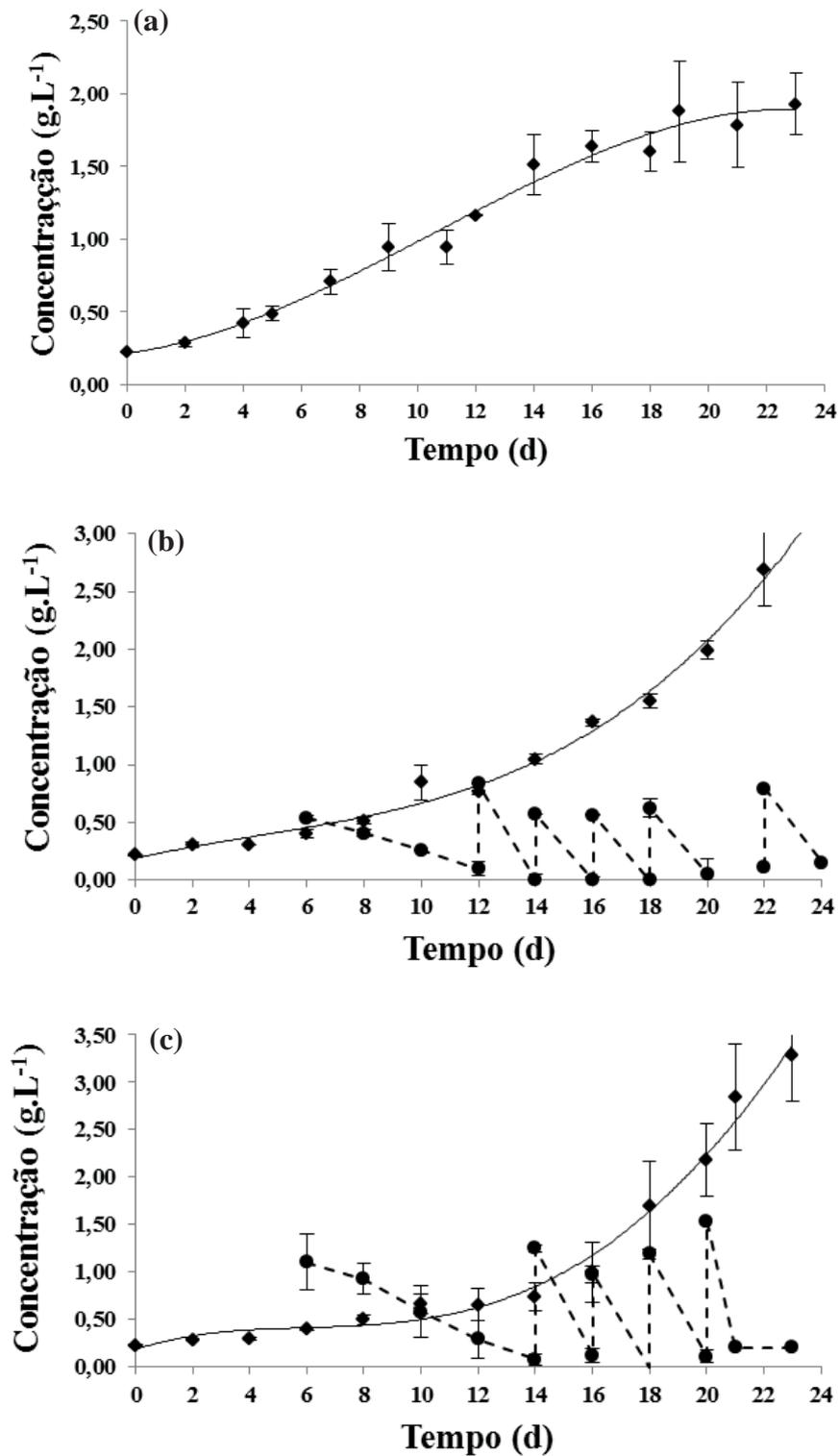


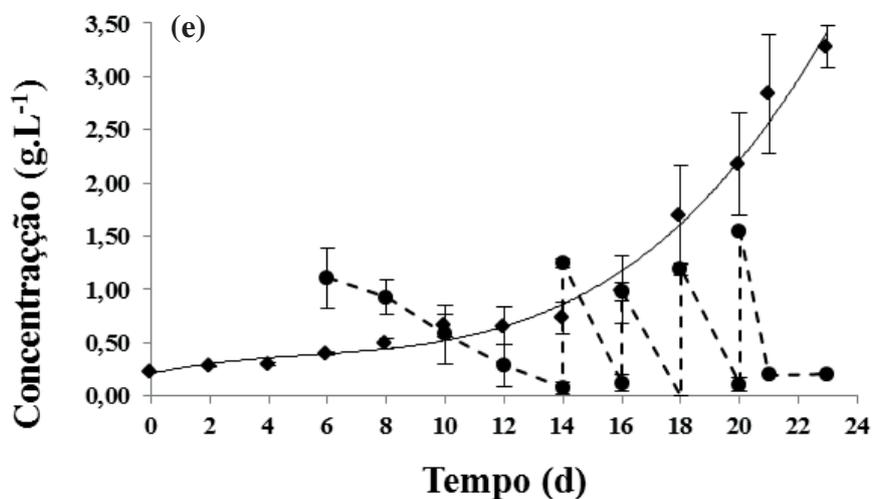
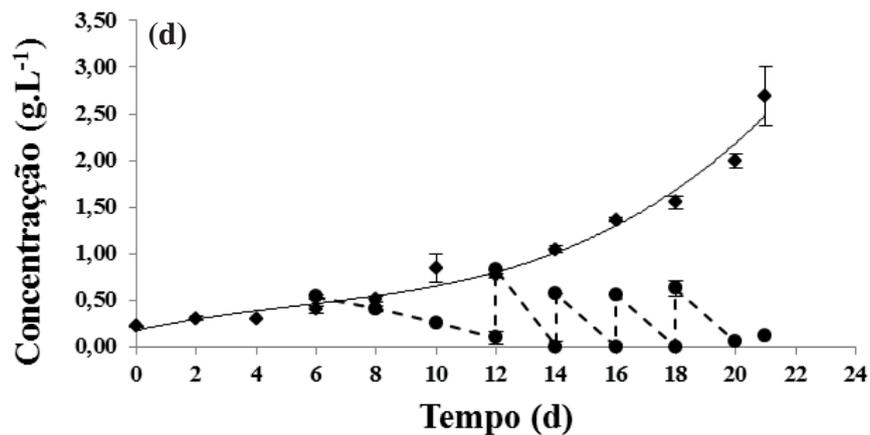


Ensaio U<sub>1</sub> (Zarrouk 20%; ◆) e U<sub>2</sub> (Zarrouk 30%; ◆) - (a); ensaio U<sub>3</sub> (Zarrouk 20%, 1,25% de permeado da UF) - (b); ensaio U<sub>4</sub>, (Zarrouk 30%; 1,25% de permeado da UF) - (c); ensaio U<sub>5</sub> (Zarrouk 20%, 2,5% de permeado da UF) - (d); ensaio U<sub>6</sub> (Zarrouk 30%, 1,25% de permeado da UF) - (e); sendo (◆, ◆) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e (●) concentração de lactose. As setas indicam a concentração de lactose após a adição de resíduo.

## APÊNDICE I – Gráficos concentração celular em função do tempo para os ensaios controles realizados em modo descontínuo alimentado

Figura 19 - Curvas de crescimento e consumo de lactose dos cultivos da microalga *Spirulina platensis* nos ensaios controles





Ensaio C<sub>1</sub> (Zarrouk 100%) - (a); ensaio C<sub>2</sub> (Zarrouk 100%, 1,25% de retido da NF) - (b); ensaio C<sub>3</sub> (Zarrouk 100%, 2,5% de retido da NF) - (c); ensaio C<sub>4</sub> (Zarrouk 100%, 1,25% de permeado da UF) - (d); ensaio C<sub>5</sub> (Zarrouk 100%, 2,5% de permeado da UF) (e), sendo (●) concentração celular da microalga *Spirulina platensis* e (◆) concentração de lactose. As figuras (b) e (c) referem-se aos ensaios controles adicionados de resíduo da nanofiltração, e as figuras (d) e (e) aos ensaios controles adicionados do resíduo da ultrafiltração. As setas indicam a concentração de lactose após a adição de resíduo.

**APÊNDICE J – Artigo “Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate”**

**Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate**

Ana Cláudia Vieira Salla<sup>a\*</sup>, Ana Cláudia Margarites<sup>a</sup>, Fábio Ivan Seibel<sup>a</sup>, Luiz Carlos Holz<sup>a</sup>, Vandrê Barbosa Brião<sup>a</sup>, Telma Elita Bertolin<sup>a</sup>, Luciane Maria Colla<sup>a</sup>, Jorge Alberto Vieira Costa<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Fermentations, Course of Food Engineering and Course of Environmental Engineering, College of Engineering and Architecture, University of Passo Fundo, Campus I, km 171, BR 285, P.O. Box 611, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS, Brazil. E-mail: [lmcolla@upf.br](mailto:lmcolla@upf.br)

<sup>b</sup> Laboratory of Biochemical Engineering, School of Chemistry and Food Engineering, Federal University of Rio Grande, P.O. Box 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.

Fax: +55-53-32338676. E-mail: [jorgealbertovc@terra.com.br](mailto:jorgealbertovc@terra.com.br), [dqmjorge@furg.br](mailto:dqmjorge@furg.br), [jorgealbertovc@terra.com.br](mailto:jorgealbertovc@terra.com.br)

\*Corresponding author

**Keywords:** bioethanol feedstock, fed batch, mixotrophic culture, diluted culture medium

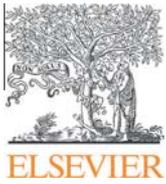
## Highlights

- Microalgae are an attractive feedstock for bioethanol production.
- *Spirulina platensis* is an attractive microalgae for biorefinery systems.
- Diluted Zarrouk medium did not affect the growth of *Spirulina platensis*.
- *Spirulina* was grown with the residues from the concentration of whey protein.
- For *Spirulina*, the accumulation of intracellular carbohydrates reached 58%.

## ABSTRACT

Non-renewable sources that will end with time are the largest part of world energy consumption, which emphasizes the necessity to develop renewable sources of energy. This necessity has created opportunities for the use of microalgae as a biofuel. The use of microalgae as a feedstock source for bioethanol production requires high yields of both biomass and carbohydrates. With mixotrophic cultures, wastewater can be used to culture algae. The aim of the study was to increase the carbohydrate content in the microalgae *Spirulina* with the additions of residues from the ultra and nanofiltration of whey protein. The nutrient deficit in the Zarrouk medium diluted to 20% and the addition of 2.5% of both residue types led to high carbohydrate productivity ( $60 \text{ mgL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). With these culture conditions, the increase in carbohydrate production in *Spirulina* indicated that the conditions were appropriate for use with microalgae as a feedstock in the production of bioethanol.

**Keywords:** bioethanol feedstock; fed batch; mixotrophic culture; diluted culture medium;



# Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate



Ana Cláudia Vieira Salla<sup>a,\*</sup>, Ana Cláudia Margarites<sup>a</sup>, Fábio Ivan Seibel<sup>a</sup>, Luiz Carlos Holz<sup>a</sup>, Vandrê Barbosa Brião<sup>a</sup>, Telma Elita Bertolin<sup>a</sup>, Luciane Maria Colla<sup>a</sup>, Jorge Alberto Vieira Costa<sup>b</sup>

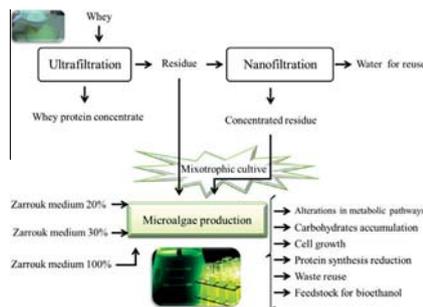
<sup>a</sup>Laboratory of Fermentations, Course of Food Engineering and Course of Environmental Engineering, College of Engineering and Architecture, University of Passo Fundo, Campus I, km 171, BR 285, P.O. Box 611, CEP 99001-970 Passo Fundo, RS, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Biochemical Engineering, School of Chemistry and Food Engineering, Federal University of Rio Grande, P.O. Box 474, CEP 96201-900 Rio Grande, RS, Brazil

## HIGHLIGHTS

- Microalgae are an attractive feedstock for bioethanol production.
- *Spirulina platensis* is an attractive microalgae for biorefinery systems.
- Diluted Zarrouk medium did not affect the growth of *Spirulina platensis*.
- *Spirulina* was grown with the residues from the concentration of whey protein.
- For *Spirulina*, the accumulation of intracellular carbohydrates reached 58%.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 7 December 2015  
 Received in revised form 15 February 2016  
 Accepted 17 February 2016  
 Available online 3 March 2016

### Keywords:

Bioethanol feedstock  
 Fed batch  
 Mixotrophic culture  
 Diluted culture medium

## ABSTRACT

Non-renewable sources that will end with time are the largest part of world energy consumption, which emphasizes the necessity to develop renewable sources of energy. This necessity has created opportunities for the use of microalgae as a biofuel. The use of microalgae as a feedstock source for bioethanol production requires high yields of both biomass and carbohydrates. With mixotrophic cultures, wastewater can be used to culture algae. The aim of the study was to increase the carbohydrate content in the microalgae *Spirulina* with the additions of residues from the ultra and nanofiltration of whey protein. The nutrient deficit in the Zarrouk medium diluted to 20% and the addition of 2.5% of both residue types led to high carbohydrate productivity ( $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). With these culture conditions, the increase in carbohydrate production in *Spirulina* indicated that the conditions were appropriate for use with microalgae as a feedstock in the production of bioethanol.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The growth in the world population has resulted in a surge in energy demand, which demonstrates the necessity for secure energy sources. All countries are grappling with the problem to

meet the continual increase in demand for transport fuels within the constraints of international commitments, legal requirements, environmental concerns and limited resources (Suganya et al., 2015). Because of the conflict between energy use and the creation of environmental problems, we are forced to choose a different pathway for a sustainable future (Oncel, 2013). Biofuels are an excellent substitute for conventional diesel fuel because these fuels

\* Corresponding author.

are renewable, nontoxic and biodegradable. Additionally, biofuels are particularly optimal options for sustainable energy use because they can replace petroleum-based fuels without extensive changes in energy infrastructure (Suganya et al., 2015; Trumbo and Tonn, 2015). Microalgae offer the potential to profoundly affect the future welfare of the planet by addressing the pressing concerns of an alternative energy resource, global warming, human health and food security. The use of algae for biofuel production is potentially sustainable but economic feasibility is the primary obstacle to commercialization (Parmar et al., 2012; Suganya et al., 2015).

Microalgae are a versatile feedstock with broad bioenergy potential because these algae are flexible and can produce multiple biofuels, including biodiesel, bioethanol, biogas and biohydrogen, using only different methods of conversion (Zhu et al., 2014). Microalgae can produce a wide range of products because of the high concentrations of natural proteins, lipids, carbohydrates, vitamins, pigments and enzymes. The advantages of production of biofuels from microalgae include reduced environmental impact, no competition for space with food crops (Zhu et al., 2014), and wastes and wastewater can be treated during the growth process (Mahdy et al., 2015). To be a viable energy alternative, the bioethanol from microalgae must represent a high net energy gain, have ecological benefits, be economically competitive and be produced at large scales without affecting the provisioning of food. Additionally, for use in bioethanol production, the microalgae must have high biomass production and a high rate of intracellular carbohydrate accumulation (Mussato et al., 2010).

Microalgae can produce a variety of valuable bioproducts based on their composition; therefore, to achieve the objective of using microalgae in bioethanol production, background information on microalgae biology and culture production must be combined (Oncel, 2013). Because of favorable chemical compositions, different microalgae have been studied as alternative raw materials for the production of biofuels. The carbohydrates in microalgae are an appropriate feedstock for microbial growth and the production of bioethanol. Moreover, the high lipid content in the biomass of some algal species is promising for biodiesel production, whereas the related long-chain fatty acids, pigments and proteins have separate nutritional and pharmaceutical applications (Yen et al., 2013). *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* were recently studied for use as raw materials in the production of biofuels (Ho et al., 2013), and the lipids of marine *Chlorella* sp. contain primarily saturated fatty acids that are suitable for use as a biodiesel feedstock (Mandik et al., 2015).

The microalgae *Spirulina* is worldwide used to extract biocompounds from biomass; primarily those with antioxidant properties (Patil et al., 2015). The high rate of protein production and nutritional content induced the microalgae for many years to be used as a feedstock for humans (Parada et al., 1998). However, little attention was directed on the use of these microalgae as a source of biofuels (Costa and Morais, 2011).

One of the primary problems with the large-scale production of algal biomass is the cost of the culture medium (Lourenço, 2006). Therefore, microalgae production systems and facilities must be well planned for a feasible production strategy. Although the production of microalgae faces a cost crisis and marketing and commercialization hardships under current global conditions, the relief provided by microalgae in regard to ethical issues will begin a new era in the production of a clean, sustainable and environmentally friendly biofuel for the future (Oncel, 2013).

The concept of an integrated biorefinery is an alternative to the viability of algal cultures. However, more studies are required to confirm the commercial viability of converting microalgae components into biofuels and other valuable products (Yen et al., 2013). The use of wastes to cultivate microalgae is an alternative that can reduce production costs, and several studies that used microal-

gae for wastewater treatment were conducted recently (Mahdy et al., 2015; Posadas et al., 2015). The whey is a by-product of cheese production, and the treatment of this by-product is one of the most critical problems for the dairy industry. The average contents of lactose, protein and ash remaining in the serum after the manufacture of cheese were  $42 \text{ kg m}^{-3}$  (72.4%, w/w),  $9 \text{ kg m}^{-3}$  (15.6%) and  $7 \text{ kg m}^{-3}$  (12%), respectively (Baldasso, 2011). Because of these high concentrations of salts, lactose and protein, beneficial applications for this by-product are under investigation.

Pagno et al. (2009) used ultrafiltration membranes to concentrate whey protein and produced a fluid concentrate rich in proteins and an ultrafiltrate (permeate) formed by water, lactose, minerals, vitamins and other constituents of low molecular weight milk. The permeate is the co-waste generated in the concentration of the whey protein, which can then be processed through nanofiltration to concentrate the lactose and retain the nanofiltrate. The permeate from the ultrafiltration and the retentate from the nanofiltration are the co-wastes of the process using membranes to separate whey protein. These co-wastes can be reused for biotechnological applications, which include the use of the ultrafiltration permeate or the nanofiltration retentate as a source of nutrients in mixotrophic cultures of the microalgae *Spirulina*. With mixotrophic cultivation, cells can synthesize characteristic compounds such as carbohydrates and may result in high concentrations of biomass (Ceron-Garcia et al., 2005). Therefore, when the objective is bioethanol production, this culture mode is a good alternative to reduce the costs in the production of biomass.

The microalgae *Spirulina* is used worldwide for the biocompounds that are extracted from biomass, primarily those with antioxidant properties (Patil et al., 2015). Only a few studies investigated the process of obtaining bioethanol from *Spirulina*, and although this microalgae is primarily studied for other purposes because of the valuable biocompounds, *Spirulina* is a potential feedstock for bioethanol production in biorefinery systems. As alternative to increase the carbohydrate content in microalgal biomass and to increase the production of microalgal biomass, the cultivation of *Spirulina* using diluted Zarrouk medium and the addition of an organic carbon source from the residues of whey protein concentrate can be an alternative. Thus, with the focus to increase both the carbohydrate content and biomass production for the production of bioethanol, the aim of this study was to evaluate the effects of ultrafiltration permeates and nanofiltration retentates from the whey separation process as a source of sugars for mixotrophic cultures of *Spirulina platensis*.

## 2. Methods

### 2.1. Microorganism and culture conditions

The strain of *S. platensis* LEB 52 was obtained from the Oceanographic Institute, University of São Paulo; which was maintained in Zarrouk's medium diluted to 50% (Vonshak et al., 1983). In the experimental design, the concentrations of 20% and 30% diluted Zarrouk medium were examined. The standard controls were Zarrouk medium without dilution.

A mixotrophic culture was established in which the organic carbon source originated from the input of the permeates and retentates. In Fig. 1, the flow chart for the generation of the ultrafiltration (UF) permeates and the nanofiltration (NF) retentates is shown.

### 2.2. Characterization of UF permeates and NF retentates

The composition of the whey residue was evaluated for proteins, lactose, fat and salts (Table 1). The Kjeldahl method was used

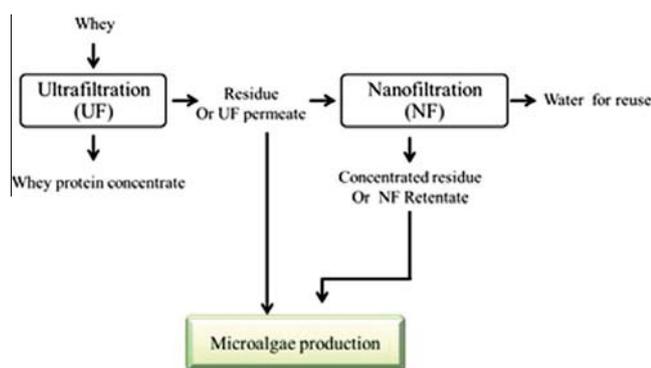


Fig. 1. Flow chart of the process to generate the wastes.

Table 1  
Characterization of residues.

	Nanofiltration retentate	Ultrafiltration permeate
Salt (%)	0.33 ± 0.16	0.14 ± 0.07
Lipids (%)	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Protein (%)	0.33 ± 0.19	0.25 ± 0.23
Lactose (%)	7.18 ± 2.26	3.73 ± 1.38
Total solids (%)	9.65 ± 0.63	5.49 ± 0.68
Ca (mg L <sup>-1</sup> )	502.96 ± 9.90	325.00 ± 20.63
Mg (mg L <sup>-1</sup> )	118.20 ± 1.41	87.05 ± 2.19
Na (mg L <sup>-1</sup> )	267.62 ± 2.85	907.48 ± 31.30
K (mg L <sup>-1</sup> )	779.92 ± 147.69	1646.49 ± 59.71
Total ammonium nitrogen (mg L <sup>-1</sup> )	107.10 ± 4.95	66.85 ± 2.47
Total organics – DQO (g L <sup>-1</sup> )	96.63 ± 2.65	55.65 ± 2.10

for protein determinations (AOAC, 2005), and the Fehling method was used for lactose determinations (MAPA, 2006). A drying process using a muffle furnace at 500 °C (AOAC, 1995) was used to determine the amount of salts. Magnesium and calcium contents were determined by atomic absorption (AOAC, 1980), and sodium and potassium contents were determined with flame spectrophotometry of the fat content using near-infrared spectroscopy (APHA, 1995). The total ammonium nitrogen and chemical oxygen demand (COD) was determined according to the methodology described in APHA.

Table 2

Maximum specific growth rates ( $\mu_{max}$ ), final cell concentrations (g L<sup>-1</sup>), and protein and carbohydrate contents (%) in the test and controls experiments according to the experimental design.

Assay	Zarrouk (% v/v)	Residue (% v/v)	$\mu_{max}$ (d <sup>-1</sup> )	Interval of log phase	Duration of log phase (d)	R <sup>2</sup>	X final (g L <sup>-1</sup> )	Carbohydrates (%)	Protein (%)
N <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0.00	0.12 ± 0.02 <sup>a</sup>	7–16	9	0.94	2.17 ± 0.34 <sup>a</sup>	58.17 ± 3.70 <sup>b</sup>	22.30 ± 2.30 <sup>a</sup>
N <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0.00	0.10 ± 0.02 <sup>a</sup>	7–16	9	0.95	1.72 ± 0.24 <sup>ab</sup>	14.94 ± 3.20 <sup>c</sup>	50.70 ± 1.40 <sup>c</sup>
N <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 1.25	0.12 ± 0.01 <sup>a</sup>	5–16	11	0.96	2.32 ± 0.01 <sup>a</sup>	37.94 ± 1.20 <sup>a</sup>	25.85 ± 1.03 <sup>ab</sup>
N <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 1.25	0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	5–18	13	0.94	1.96 ± 0.17 <sup>ab</sup>	28.68 ± 2.28 <sup>a</sup>	33.60 ± 6.00 <sup>b</sup>
N <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 2.50	0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>	5–18	13	0.99	3.22 ± 0.19 <sup>c</sup>	37.84 ± 2.73 <sup>a</sup>	18.96 ± 0.53 <sup>b</sup>
N <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 2.50	0.15 ± 0.05 <sup>a</sup>	7–14	7	0.95	1.33 ± 0.07 <sup>b</sup>	39.43 ± 18.99 <sup>b</sup>	37.23 ± 16.89 <sup>ab</sup>
U <sub>1</sub>	(-1) 20	(-1) 0.00	0.11 ± 0.01 <sup>A</sup>	5–18	13	0.96	3.47 ± 0.25 <sup>B</sup>	45.40 ± 0.10 <sup>AB</sup>	30.75 ± 6.05 <sup>A</sup>
U <sub>2</sub>	(+1) 30	(-1) 0.00	0.09 ± 0.01 <sup>D</sup>	7–25	18	0.96	1.95 ± 0.03 <sup>A</sup>	17.16 ± 0.61 <sup>C</sup>	40.81 ± 9.41 <sup>B</sup>
U <sub>3</sub>	(-1) 20	(0) 1.25	0.14 ± 0.01 <sup>C</sup>	5–21	16	0.99	2.64 ± 0.03 <sup>AB</sup>	44.02 ± 2.32 <sup>AB</sup>	26.68 ± 0.81 <sup>A</sup>
U <sub>4</sub>	(+1) 30	(0) 1.25	0.11 ± 0.02 <sup>A</sup>	7–16	9	0.94	2.10 ± 0.16 <sup>AB</sup>	21.82 ± 8.36 <sup>D</sup>	41.30 ± 5.19 <sup>B</sup>
U <sub>5</sub>	(-1) 20	(+1) 2.50	0.13 ± 0.01 <sup>BC</sup>	7–19	12	0.97	2.85 ± 0.31 <sup>AB</sup>	43.81 ± 3.02 <sup>AB</sup>	26.38 ± 0.08 <sup>A</sup>
U <sub>6</sub>	(+1) 30	(+1) 2.50	0.12 ± 0.01 <sup>A</sup>	7–21	14	0.96	3.10 ± 0.75 <sup>AB</sup>	37.25 ± 1.50 <sup>A</sup>	28.02 ± 3.01 <sup>A</sup>
C <sub>1</sub>	100	0.00	0.10 ± 0.01 <sup>a</sup>	5–19	14	0.98	1.93 ± 0.21 <sup>a</sup>	20.60 ± 4.32 <sup>a</sup>	45.40 ± 3.28 <sup>a</sup>
C <sub>2</sub>	100	1.25	0.12 ± 0.01 <sup>ab</sup>	5–19	14	0.98	2.70 ± 0.32 <sup>a</sup>	20.171 ± 0.57 <sup>ab</sup>	31.13 ± 0.35 <sup>a</sup>
C <sub>3</sub>	100	2.50	0.13 ± 0.01 <sup>b</sup>	5–19	14	0.98	3.28 ± 0.47 <sup>a</sup>	23.23 ± 7.17 <sup>b</sup>	32.22 ± 0.38 <sup>a</sup>
C <sub>4</sub>	100	1.25	0.10 ± 0.01 <sup>ab</sup>	10–23	13	0.99	2.48 ± 0.38 <sup>a</sup>	15.30 ± 0.21 <sup>a</sup>	35.47 ± 0.54 <sup>a</sup>
C <sub>5</sub>	100	2.50	0.13 ± 0.01 <sup>ab</sup>	10–25	15	0.96	2.56 ± 0.27 <sup>a</sup>	17.22 ± 2.78 <sup>a</sup>	33.32 ± 2.74 <sup>a</sup>

\*Mean ± standard deviation. Capitalized letters in the identical column indicate no significant difference at a 95% confidence level using the NF retentate. The identical capital letters in the identical column indicate no significant difference at a 95% confidence level using the UF permeate, and the lowercases letters in the identical column indicate no significant difference at a 95% level in the control tests.

### 2.3. Culture conditions

The cultures of *Spirulina* were maintained in 1 L photobioreactors at 30 °C with a photoperiod of 12 h. The initial cell concentration was 0.15 g L<sup>-1</sup>. In all experiments, the residues obtained through the processes of ultra- and nanofiltration of the whey were added at concentrations of zero, 1.25% and 2.5% (v/v) (according to the experimental design). The residues were added in fed batch mode when the cultures reached a biomass of 0.3 g L<sup>-1</sup>. When the lactose concentration reached 0.15 g L<sup>-1</sup>, residues were added again. To evaluate the influences of the concentration of the Zarrouk medium and of the residues, a mixed experimental design 2<sup>1</sup>3<sup>1</sup> was used (Table 2).

### 2.4. Analytical determinations of the cultures

The biomass concentration was determined every 48 h by measuring the optical density using a spectrophotometer at 670 nm. The lactose concentration in the medium was determined using the method of 3.5 DNS (Miller, 1959), which was used as an indicator of the concentration of the residue remaining in the culture. At the termination of the experiment, the biomass was filtered through polyester yarn 180 and dried at 50 °C for 24 h, which was followed by carbohydrate and protein determinations, with the carbohydrate and protein productions calculated based on the dried biomass (Eqs. (1) and (2), respectively). The carbohydrate concentration was determined as described by Margarites and Costa (2014), and the protein concentration was determined using the Kjeldahl method (AOAC, 2005), with a conversion factor of 5.22 that is specific for cyanobacteria (Lourenço, 2006).

$$P(\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}) = \frac{\text{CHO} \cdot X_f}{\Delta t} \quad (1)$$

$$P(\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}) = \frac{\text{PRO} \cdot X_f}{\Delta t} \quad (2)$$

where  $X_f$  is the final biomass concentration of a culture (g L<sup>-1</sup>), CHO is the carbohydrate content (%), PRO is the protein content (%) and  $\Delta t$  is the cultivation time (d).

### 2.5. Kinetic parameters for growth and statistical analyses

The maximum specific growth rates were calculated with exponential regressions of cell concentration versus time data in the logarithmic growth phases (Eqs. (3) and (4)). From the maximum specific growth rates, the generation times were calculated (Eq. (5)).

$$\mu_{\max} = \left(\frac{1}{x}\right) \cdot \left(\frac{dx}{dt}\right) \quad (3)$$

$$\mu_{\max} = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{X_2}{X_1} \quad (4)$$

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (5)$$

where  $\mu_{\max}$ : is the maximum specific growth rate ( $d^{-1}$ ),  $X_1$  is the cell concentration in the early exponential growth phase ( $g L^{-1}$ ),  $X_2$  is the cell concentration at the end of the exponential growth phase ( $g L^{-1}$ ),  $\Delta t$  is the duration of the exponential growth phase (d) and  $tg$  is the generation time (d).

The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's tests with a 95% confidence interval.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Substrate characterization

Improvements in the culturing of algae depend on understanding the roles and effects of different chemicals in the culture medium (Lourenço, 2006). The characterization of both residues is shown in Table 1. Although the residues from ultrafiltration (UF permeate) and nanofiltration (NF retentate) were produced in different processes, the chemical compositions were similar because the UF permeate was concentrated passing through the nanofiltration membrane to produce the NF retentate. Because of this process of concentration, the NF retentates had higher levels of lactose (7.18%), calcium (502.96  $mg L^{-1}$ ), magnesium (118.20  $mg L^{-1}$ ), total ammonium nitrogen (107.10  $mg L^{-1}$ ) and chemical oxygen demand (96.63  $mg L^{-1}$ ) than those of the UF permeates (Table 1).

Nanofiltration and ultrafiltration membranes filter different sizes. The ultrafiltration membrane retains compounds of approximately 0.05  $\mu m$ , whereas the nanofiltration membrane retains compounds in the size range from 0.0005 to 0.005  $\mu m$ . In addition to restricting the molecular size, the membranes have retention properties from the electrostatic force of the molecules, an action known as the Donnan effect (Schäfer and Richards, 2005). The nanofiltration membrane generally prevents the passage of divalent ions, but compared with the monovalent ions such as sodium and potassium, the retention is lower; thus, sodium and potassium concentrations were lower in the nanofiltration retentate (Table 1).

A comparison of contents in UF and NF residues well as the Zarrouk medium was made: the differences between them, it that Zarrouk medium contains phosphorus, potassium and iron. These components are present in Zarrouk medium and absent in the residues. The residues possess an organic carbon source while medium Zarrouk contains this content only in the inorganic form ( $NaCO_3$ ). Moreover, residue provides ammonia nitrogen in its composition, whereas Zarrouk has sodium nitrate as nitrogen source available.

Nitrogen is the second most important element in biomass composition; in the case of commercial cyanobacteria cultivations, it is usually added in the form of nitrate salts. This choice is dictated by its ability to guarantee high maximum cell concentrations. However, these nitrogen sources are in general expensive

when compared to ammonium compounds. Ammonium compounds when in solution, release ammonium ions, which under alkaline conditions become ammonia that is toxic at high concentrations. Because of this reason it is recommended to maintain only the necessary concentration to sustain cell growth while supplied by the so-called fed-batch process (Ferreira et al., 2012). In this study, both residues were added in fed-batch process; which the amount added in the trials did not cause toxicity to cells.

### 3.2. Cell growth and substrate absorption

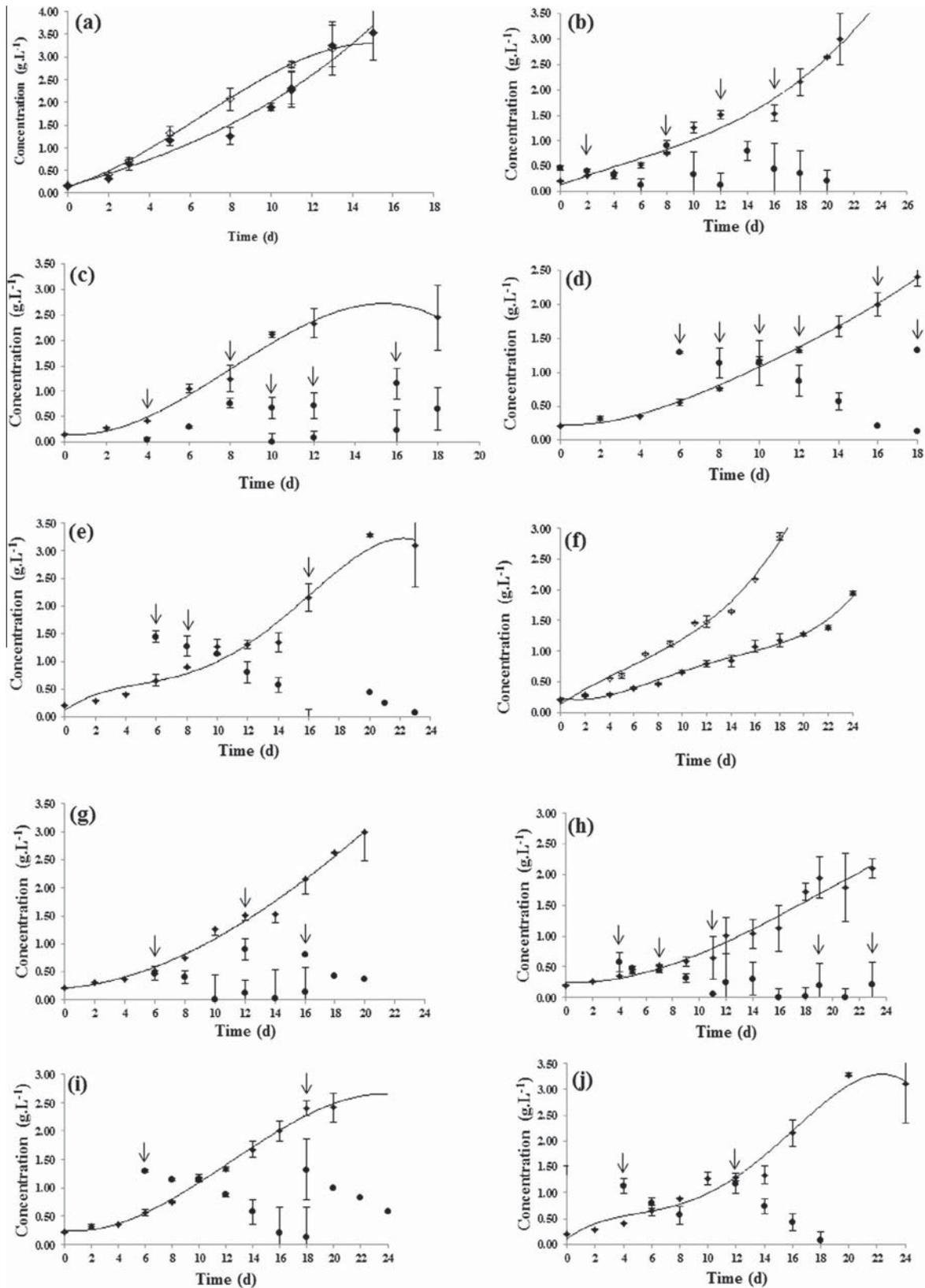
In Figs. 2 and 3, the growth curves of microalgae are shown according to the time of cultivation and the consumption of substrate. The arrows indicate when the UF permeate and NF retentate were added to the cultures. The microalgae were cultivated until the early stationary phase of growth, which is when carbohydrates are accumulated in the microalgal biomass (Moura et al., 2006). It was not possible to identify the stationary phase from some growth curves because the cell decline phase began rapidly in the experiment, as shown in Fig. 2(h).

In the N5 assay, the NF retentate was added six times in 16 d (Fig. 2d), for a total residue addition of 10% v/v during the entire process. In the other trials using the NF retentate, the frequency of residue addition was lower, with 4 additions in 12 d in the N3 assay, 5 additions in 20 d in the N4 assay, and 3 additions in 18 d in the N6 assay, and at the end of the trials, 4% v/v was added (Fig. 2b, c and e).

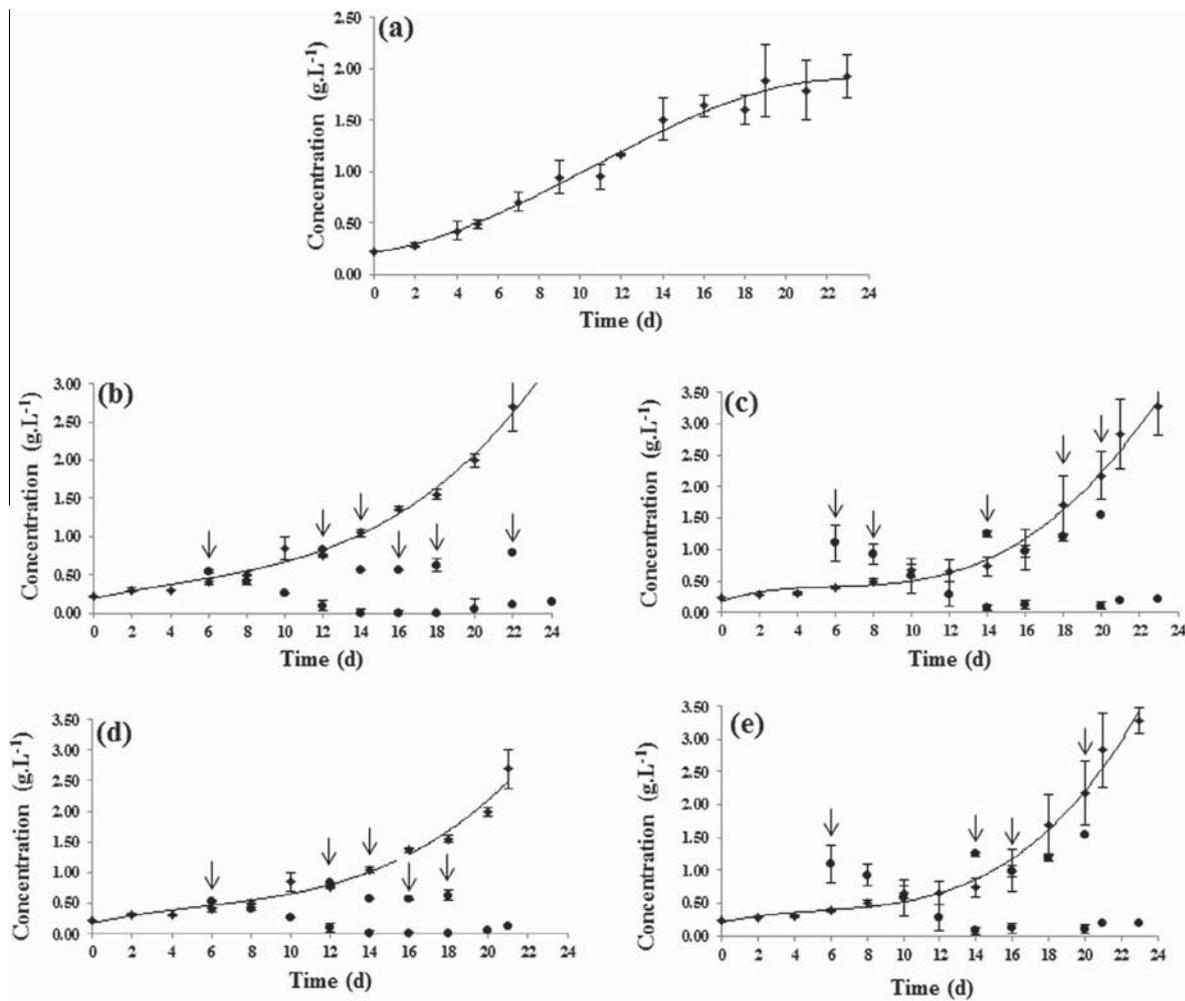
In the assays with the Zarrouk medium diluted to 20%, higher quantities of residues were added. In the trials with UF permeate additions, the percentages (v/v) added were lower than those in the trials with the NF retentates. In the U<sub>3</sub>, U<sub>5</sub> and U<sub>6</sub> assays, only 2 additions occurred during the process (Fig. 2g, i and j), whereas in the U<sub>4</sub> assay (Fig. 2h), 5 additions of UF permeate occurred in 20 d. The microalgae consumed the bulk of the nanofiltration residues (10% of culture volume) because of the limited amount of nutrients in the Zarrouk medium diluted to 20%.

In Fig. 3, the cell growth and lactose concentrations measured in the control assays performed with the standard Zarrouk medium are shown. In experiment C<sub>1</sub>, residues were not added, whereas in experiments C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>, NF retentates were added. In experiments C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub>, UF permeates were added. NF retentates were added seven times in experiment C<sub>2</sub> in 24 d, whereas in the C<sub>3</sub> assay, 5 additions occurred in 26 d, for total residue additions during the process of 4% and 8% of the volume, respectively. The control assays were cultivated for a longer period, between 24 and 26 d (Fig. 3), than the assays with diluted Zarrouk medium, with a cultivation time that varied between 12 and 24 d (Fig. 2). The N<sub>3</sub> assay, with the lowest concentration of Zarrouk medium (20%) and the lowest amount of residue (1.25% v/v), continued for only 12 d, most likely because of the lower amounts of nutrients in this assay.

When the UF permeates were added to the cultures, the microalgal consumption of residues was lower than that when the NF retentates were used (Fig. 2). For the UF permeates, the residue percentages added were 2%, 5%, 2% and 1% v/v in the assays U<sub>3</sub>, U<sub>4</sub>, U<sub>5</sub> and U<sub>6</sub>, respectively. By comparison, for the NF retentates, the residue percentages added were 4%, 4%, 10% and 4% v/v in the assays N<sub>3</sub>, N<sub>4</sub>, N<sub>5</sub> and N<sub>6</sub>, respectively (Fig. 2). The microalgae consumed a larger volume of the NF retentate, which might be because the NF retentates had higher levels of lactose, magnesium and calcium than those in the UF permeates. In the N<sub>5</sub> assay the amounts of calcium and magnesium added was larger than it is indicated in standard Zarrouk due to the addition of the retentate of the nanofiltration. In the control assays (Fig. 3), the NF retentate consumption during the process was 4% and 8% in the C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>



**Fig. 2.** Cell ( $\text{g L}^{-1}$ ) and lactose concentrations ( $\text{g L}^{-1}$ ) versus time for the cultivation of *Spirulina platensis* with the additions of NF retentate and UF permeate. Description of the illustration: Assays  $N_1$  (Zarrouk 20%;  $\diamond$ ) and  $N_2$  (Zarrouk 30%;  $\blacklozenge$ ) – (a);  $N_3$  (Zarrouk 20%, 1.25% of NF retentate) – (b);  $N_4$  (Zarrouk 30%, 1.25% of NF retentate) – (c);  $N_5$  (Zarrouk 20%, 2.5% of NF retentate) – (d);  $N_6$  (Zarrouk 30%, 2.5% of NF retentate) – (e); tests  $U_1$  (Zarrouk 20%;  $\diamond$ ) and  $U_2$  (Zarrouk 30%;  $\blacklozenge$ ) – (f);  $U_3$  (Zarrouk 20%, 1.25% of UF permeate) – (g);  $U_4$  (Zarrouk 30%, 1.25% of UF permeate) – (h);  $U_5$  (Zarrouk 20%, 2.5% of UF permeate) – (i);  $U_6$  (Zarrouk 30%, 2.5% of UF permeate) – (j); and ( $\blacklozenge$ ,  $\diamond$ ) is the cell concentration and ( $\bullet$ ) is the lactose concentration of *Spirulina platensis*. The arrows indicate the concentration of lactose after the residue additions.



**Fig. 3.** Growth curves and concentrations of lactose of the microalgae *Spirulina platensis* cultures in control trials. Description of the illustration: Assay C<sub>1</sub> (Zarrouk 100%) – (a); C<sub>2</sub> (Zarrouk 100%, 1.25% of NF retentate) – (b); C<sub>3</sub> (Zarrouk 100%, 2.5% of NF retentate) – (c); C<sub>4</sub> (Zarrouk 100%, 1.25% of UF permeate) – (d); C<sub>5</sub> (Zarrouk 100%, 2.5% of UF permeate) – (e); and (●) is the cell concentration and (◆) is the lactose concentration. The figures (b) and (c) refer to the control tests with NF retentate additions, and the figures (d) and (e) refer to control tests with UF permeate additions. The arrows indicate the concentration of lactose after the residue additions.

assays, respectively; whereas the use of UF permeates was 6% and 10% in the C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub> assays, respectively.

In Table 2, the maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ , d<sup>-1</sup>), the time interval of the log phase, the duration of the log phase, the coefficient of determination of the exponential regression in the log phase ( $R^2$ ), the final cell concentration, and the intracellular carbohydrates and proteins obtained are shown for the experimental designs 2<sup>1</sup>3<sup>1</sup> and the control assays. Among the assays that used the NF retentate, the N<sub>5</sub> assay (Zarrouk diluted to 20% and 2.5% v/v of NF retentate) had the highest cell concentration (3.22 g L<sup>-1</sup>). Among the assays that used the UF permeate, the maximum cell concentration (3.47 g L<sup>-1</sup>) was obtained in experiment U<sub>1</sub> without the addition of residue or UF permeate and with Zarrouk diluted to 20%; this cell concentration was not significantly different from that obtained in other experiments with additions of UF permeate ( $p > 0.05$ ).

The maximum specific growth rates ( $\mu_{\max}$ ) were not significantly different among the trials ( $p > 0.05$ ) that used NF retentates. However, in the trials with UF permeates, the highest  $\mu_{\max}$  were obtained in the tests with the addition of 2.5% of UF permeate, regardless of the dilution of the Zarrouk medium. When the trials with NF retentate or UF permeate additions were compared, the cell concentration in the N<sub>4</sub> assay was different compared with that in the U<sub>4</sub> assay (1.96 and 2.10, respectively). The highest con-

centration of salts in the NF retentates, in combination with the effect of more salts in the middle dilution of Zarrouk medium of 30%, might have caused the effect on the cell concentration in the N<sub>4</sub> assay.

In the experiments with Zarrouk (20%) and 2.5% of UF permeate or NF retentate (U<sub>5</sub> and N<sub>5</sub>, respectively), the final cell concentrations were not significantly different ( $p > 0.05$ ). When compared with the control tests, the cell concentration (3.22 g L<sup>-1</sup>) was higher in the N<sub>5</sub> assay. For the assays N<sub>5</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>, the cell concentrations were not significantly different ( $p > 0.05$ ). Thus, we reached the identical final cell concentration using standard or diluted Zarrouk medium with the addition of 2.5% of NF retentate in batch feed mode.

Among the assays that used the UF permeate, the cell concentration in the U<sub>5</sub> assay (Zarrouk 20% with the addition of 2.5% of UF permeate) reached 2.85 g L<sup>-1</sup>. Thus, for the production of bioethanol, the concentration of 20% diluted Zarrouk medium and the addition of 2.5% residue provided suitable culture conditions for *S. platensis*. Because of the large amounts of residue added, high carbohydrate production and high biomass concentration were obtained. The dilution of Zarrouk medium decreases processing costs, and the amount of waste disposed of in the environment is reduced based on the amount of residue added to cultures. Based on the ANOVA and Tukey tests at a 95% confidence level, the cell

concentrations were not significantly different ( $p > 0.05$ ) among the  $U_5$  assay, controls without residues ( $C_1$ ), and controls with the addition of 1.25% and 2.5% of UF permeate ( $C_4$  and  $C_5$ , respectively). The cell concentrations in the trials that added UF permeate and NF retentate ( $U_5$  and  $N_5$ , respectively) were not significantly different from those of the controls. Thus, we demonstrated that replacement of the standard medium with diluted Zarrouk medium and the addition of residues can be used because these changes in the culture medium did not influence the cell concentration of *Spirulina*.

### 3.3. Productivity of carbohydrates and protein

In addition to the influence of carbon sources and salts from the wastes on cell concentrations, these inputs can also affect the chemical composition of microalgae, which is important because the composition determines the development of microalgal biomass. Therefore, the yields of carbohydrates and protein obtained from the biomass in each experiment are shown in Fig. 4.

The carbohydrate and protein contents of the microalgae in the control test  $C_1$  were similar to the results of Madkour et al. (2012). For the microalgae *S. platensis*, these authors found, using only standard Zarrouk medium, that the contents of protein and carbohydrates were  $52.95 \pm 0.53\%$  and  $13.20 \pm 0.57\%$ , respectively. In this study, the addition of UF permeate or NF retentate did not influence the carbohydrate production of the microalgae when cultured in standard Zarrouk medium (Fig. 4a); however, with the dilution of Zarrouk medium to 20%, a higher carbohydrate content was reached of approximately 58% in the  $N_1$  assay and 45.40% in the  $U_1$  test. The difference in the carbohydrate content between the two tests was affected by the stage of growth when the cultures were terminated; the  $N_1$  assay was in the exponential growth phase, whereas the stationary growth phase was beginning in the  $U_1$  test. However, with the Zarrouk medium diluted to 30%, high protein contents (approximately 50.70%) were obtained in the  $N_2$  assay.

With the dilution of the Zarrouk medium and the addition of residues, we observed higher productivity of carbohydrates than that of proteins. In the  $N_1$  and  $N_5$  assays, the carbohydrate yield was approximately  $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , with similar yields in the  $U_1$  and  $U_5$  assays. No significant differences in the productivity of carbohydrates were observed ( $p > 0.05$ ; Fig. 4b and c). Therefore, with

the 20% dilution of the Zarrouk medium, the addition of waste did not influence carbohydrate production. However, when the Zarrouk medium diluted to 30% was used, the residue addition had a positive effect on carbohydrate production. Thus, increasing the amount of residue provided to the cultures caused the increase in production. With the large amounts of residue added to the cultures, the productivity increased. However, in the control tests cultivated with standard Zarrouk medium, the productivity of protein was higher than that of carbohydrates, as was expected for this culture condition.

In the  $N_5$  trial with 20% diluted Zarrouk medium and 2.5% of NF retentate, the highest cell concentration ( $3.22 \text{ g L}^{-1}$ ) was obtained, with a carbohydrate content of 37.84% (Table 2) and carbohydrate production of  $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Fig. 1). In the  $N_5$  assay, the frequency of waste addition was greater than that in the other trials and reached a total of 10% (v/v). When the identical condition was reproduced using the UF permeate, a cell concentration of  $2.85 \text{ g L}^{-1}$  was obtained, with a carbohydrate content of 43.81% and carbohydrate production of  $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , with only a 5% (v/v) addition of residue. These results are significant because the microalgae must accumulate carbohydrates with a high cellular growth rate to be potential raw material for the production of bioethanol.

The high carbohydrate content of the  $N_5$  assay was likely related to the high concentrations of lactose, magnesium and calcium in the NF retentate. Magnesium, which is a constituent of the chlorophyll molecule and is associated with various enzymes, can increase the photosynthetic efficiency of the microalgae (Lourenço, 2006); thus, the increase in magnesium and calcium influenced the accumulation of carbohydrates at the same time the cell concentration was affected the most. The NF retentate had a positive effect on the cell concentration of the microalgae *Spirulina* because in the  $N_5$  assay with Zarrouk 20% and 2.5% of the residue, a biomass of  $3.22 \text{ g L}^{-1}$  was obtained. The high yield of carbohydrates in the  $N_5$  assay was because of the high cell concentration and carbohydrate content.

Many microalgae produce a substantial amount of protein, and this behavior occurs primarily when the growth medium is nutrient-rich (Dismukes et al., 2008). Moreover, some types of microalgae accumulate carbohydrates and other non-nitrogenous biocompounds, and this accumulation occurs primarily when an organic source is added to the growth medium or when the grown

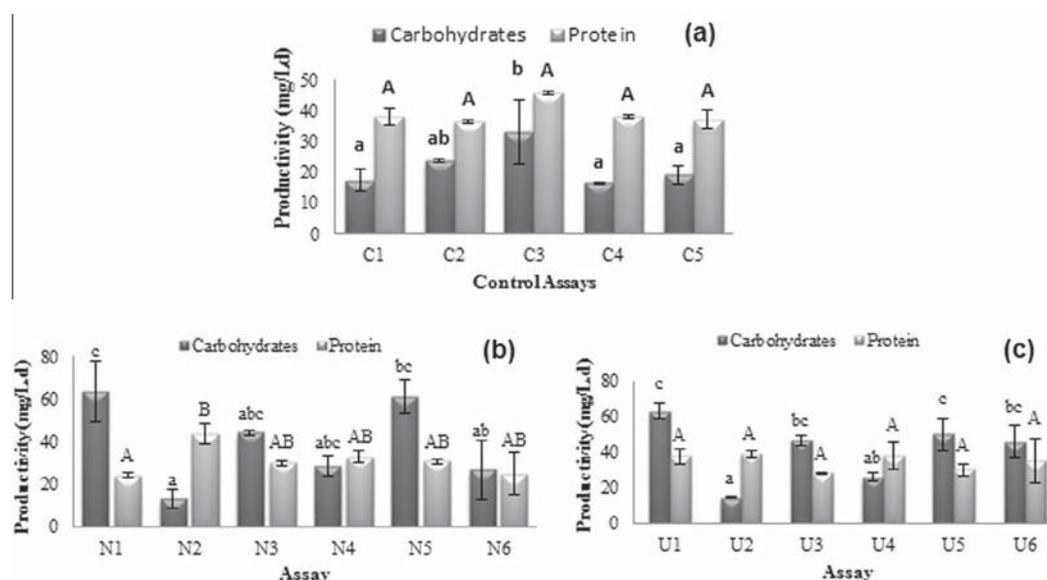


Fig. 4. Productivity of carbohydrates and protein from biomass obtained in control tests (a), tests with NF retentate added (b) and tests with UF permeate added (c).

medium has a limited amount of nitrogen. The reduced concentrations of nutrients in the 20% diluted Zarrouk medium had a positive effect on carbohydrate content and productivity; therefore, at lower concentrations of the Zarrouk medium, higher productivity of carbohydrates occurred.

In evaluating the productivity of protein, the  $N_1$  and  $N_2$  assays were the only assays to show a significant difference ( $p < 0.05$ ); generally, at diluted concentrations of the Zarrouk medium, the content and productivity protein were less (Fig. 4b). In the  $N_2$  assay, the productivity of protein reached  $43 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , whereas the productivity was  $24 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  in the  $N_1$  assay. In the control test  $C_1$  performed in standard Zarrouk medium, the productivity of protein was high ( $45 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). When the results of the  $C_1$  (Zarrouk 100%) and the  $N_2$  (Zarrouk 30%) tests were compared, the difference was not statistically significant. Therefore, when the microalgae are used for nutritional purposes or even in the context of biorefineries, the use of Zarrouk medium diluted to 30% (assays  $N_2$  and  $U_2$ ) represents an economic gain because of the lower cost, with protein production similar to that when the microalgae were grown in standard Zarrouk medium in this study. However, the differences were not significant ( $p > 0.05$ ) when the 30% diluted Zarrouk media was used in assays  $N_3$ ,  $N_4$ ,  $N_5$  and  $N_6$  with the NF retentate or in assays  $U_3$ ,  $U_4$ ,  $U_5$  and  $U_6$  with the UF permeate.

The productivity of protein in the control tests was not significantly different ( $p > 0.05$ ; Fig. 4a). However, the productivity of carbohydrates in assays  $C_2$  and  $C_3$  was significantly different from that in the trials  $C_1$ ,  $C_4$  and  $C_5$ . In the  $C_3$  assay, 2.5% of NF retentate was added, and the carbohydrate yield reached approximately  $30 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  based on the consumption of 8% of the residue volume in the final process. Some microalgae grow on organic molecules, such as monosaccharides (glucose and fructose, among others), organic acids (acetate, among others), glycerol and amino acids, among others (Heredia-Arroyo et al., 2011). Heredia-Arroyo et al. (2011) demonstrated that mixotrophic cultivations of *C. vulgaris* at different glucose concentrations reached a higher final biomass and lipid content with higher inputs of initial glucose concentration. Therefore, lactose, which is a simple sugar, might have influenced in the carbohydrate content in the control tests  $C_2$  and  $C_3$ .

The concentration of nitrogen in culture media is a primary factor that affects the accumulation of carbohydrates in microalgae; high levels of nitrogen in the medium increase the concentrations of protein and chlorophyll in cells. Conversely, when the availability of nitrogen for microalgae is low, the concentrations of protein and chlorophyll tend to decrease (Mussato et al., 2010; Lourenço, 2006). The dilution of the Zarrouk medium to concentrations of 20% and 30% reduced the concentrations of all nutrients, including nitrogen. Thus, at diluted concentrations of Zarrouk medium, carbohydrates accumulated, whereas protein content was reduced because of the lack of nutrients required for protein synthesis.

Cell growth, biochemical composition and yield can all suffer severe changes depending on the type of culture developed (Lee, 2004). When the final product of interest is bioethanol, the culturing of *S. platensis* was successful using the culture condition of the  $N_5$  assay with the NF retentate.

Because of the addition of large amounts of residue (10% of the culture volume), the carbohydrate content of the biomass was high (approximately 40%), the production of carbohydrates increased ( $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) and a high concentration of biomass was attained ( $3.22 \text{ g L}^{-1}$ ). Nevertheless, in the  $U_5$  assay with the UF permeate, these parameters were not significantly different ( $p > 0.05$ ) from the  $N_5$  test with the addition of NF retentate, with both assays using Zarrouk 20% and a residue concentration of 2.5%. Because the residue was added in fed-batch mode, the total volume added varied in each test. In the assay using the NF retentate ( $N_5$ ), the final volume was 10% of the culture volume, whereas in the  $U_5$

assay that used UF permeate, only 2% of the residue was consumed. This behavior can be observed in Fig. 2(d) and (i). In Fig. 2(d), the  $N_5$  assay was conducted with 7 additions of NF retentate in 16 d; whereas in the  $U_5$  assay (Fig. 2i), only 2 additions of the UF permeate occurred in 24 d.

Among the  $N_5$  assay and the control tests  $C_1$ ,  $C_2$  and  $C_3$ , the differences in protein yield were not significant ( $p > 0.05$ ). However, the carbohydrate yield was significantly different ( $p < 0.05$ ), with the production of carbohydrates in the  $N_5$  assay higher than that in the control tests ( $C_1$ ,  $C_2$  and  $C_3$ ). Similar results were obtained when the  $U_5$  assay was compared with the control tests  $C_1$ ,  $C_4$  and  $C_5$ ; the protein yields of the assay and the tests were not significantly different, whereas for the carbohydrate yield, the yield was higher in the  $U_5$  assay.

In this study, we demonstrated that *S. platensis* biomass is suitable as a feedstock for bioethanol production. The dilution of the nutrient medium Zarrouk to 20% induced the accumulation of carbohydrates, which reached approximately 45% and 58% (assays  $U_1$  and  $N_1$ , respectively; Table 2), depending on the phase of growth in which the culture was terminated. Moreover, an alternative carbon source derived from NF retentate or UF permeate can be added because the addition of these alternative carbon sources had positive effects on cell growth. This positive influence on cell growth can be explained because of the mixotrophic cultures and additionally, the high contents of lactose, magnesium and calcium in these residues.

The NF retained and UF permeate which had a high organic load (Table 1), required treatment to be discharged into the watershed. This treatment is a costly step in the industrial production process. The recycle of waste is a viable alternative for the reduction of environmental and economic impacts. Here we present the addition of these residues in the cultivation of *S. platensis* as an alternative to the reduction of the organic load; besides that, some nutrients required for the microalgal growth are still available in the waste. Adding the residues in the culture medium causes an economic benefit reducing the medium cost and dispensing the effluent's treatment.

Few studies reported the production of bioethanol from *Spirulina*'s biomass. The *Spirulina* is worldwide used due to its antioxidant properties (Costa and Morais, 2011). This biomass can also accumulate high levels of carbohydrates, generating a new alternative for bioethanol production, mainly in biorefinery systems. Markou et al. (2013) used *Spirulina* biomass containing 55% of carbohydrates obtaining an ethanol productivity of 16.3% ( $\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{g}_{\text{Biomass}}$ ). In our study, *Spirulina* accumulated 57% of carbohydrates, which allows its use for production of bioethanol.

Biofuel production from microalgae biomass is considered expensive and the investment return is slow and low. However, with the improvement of advanced technologies and possible government incentives it is hoped that microalgae biofuels will soon become economic feasible and comparable to fossil fuels in term of cost of production (Milano et al., 2016). Still the evaluation of microalgae cultivation cost and the hydrolysis of polysaccharides are needed.

According to Singh and Gu (2010), more innovations are still needed for the development of technologies which reduce costs while increasing the yields. This can be realized successfully through a coherent, extensive, and well-funded research and development program. It is extremely important in the early phases of this promising, yet challenging industry, to deliberate new business models that look forward at the bioenergy potential of algae through the transportation fuels market; as well as production of other higher value products to turn the economics practicable. A sustained effort from the technologists and planners can result in the successful accomplishment of this extremely potential concept toward the solution of world's future energy concerns.

#### 4. Conclusions

The dilution of the Zarrouk nutrient medium to 20% and the addition of residues from the process of whey protein concentration, with high contents of lactose, and low levels of phosphorus, potassium and iron, increased the productivity of carbohydrates in the biomass of the microalgae to  $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Therefore, the microalgae *S. platensis* is a promising feedstock for bioethanol production because of this high productivity of carbohydrates. Furthermore, the dilution of the Zarrouk medium decreased the microalgal production costs, and the high volumes of residue added to the cultures decreased the amount of residue discarded to the environment.

#### Acknowledgements

The authors are pleased to acknowledge the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Foundation for the Support of the Rio Grande do Sul State Research (FAPERGS) for the financial support.

#### References

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1980. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists Atomic Absorption Method for Evaporated Milk-Official Final Action., AOAC.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995. Official Methods of Analysis., AOAC, Arlington.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2005. Official Methods of Analysis., AOAC, Washington.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association Water, Environment Federation, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, . 19th ed. 19th ed., vol. 3 American Public Health Association, Washington, pp. 83–98.
- Baldasso, C., 2011. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination* 278, 381–386.
- Ceron-Garcia, M.C., Sánchez, A.M., Fernández, J.M.S., Molina, E.G., García, F.C., 2005. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochem.* 40, 297–305.
- Costa, J.A.V., Morais, M.G., 2011. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresour. Technol.* 102, 2–9.
- Dismukes, G.C., Carrieri, D., Bennett, N., Ananyev, G.M., Posewitz, M.C., 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 235–240.
- Ferreira, L.S., Rodrigues, M.S., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M., 2012. *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: use of no-cost  $\text{CO}_2$  from ethanol fermentation. *Appl. Energy* 92, 379–385.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Ruan, R., Hu, B., 2011. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from no-sugar materials. *Biomass Bioenergy* 35, 2245–2253.
- Ho, S.H., Huang, S.W., Chen, C.Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, S., 2013. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresour. Technol.* 135, 191–198.
- Lee, Y.K., 2004. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Algal nutrition: heterotrophic carbon nutrition. Blackwell Science, Oxford.
- Lourenço, S.O., 2006. *Cultivation of marine microalgae – principles and applications*. Rima, São Carlos.
- Madkour, F.F., Kamil, A.E., Nasr, H.S., 2012. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egypt. J. Aquat. Res.* 38, 51–57.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., Fernandez, C.G., 2015. Algal culture integration in conventional wastewater treatment plants: anaerobic digestion comparison of primary and secondary sludge with microalgae biomass. *Bioresour. Technol.* 184, 236–244.
- Mandik, Y.I., Cheirsilp, B., Boonsawang, P., Prasertsan, P., 2015. Optimization of flocculation efficiency of lipid-rich marine *Chlorella* sp. biomass and evaluation of its composition in different cultivation modes. *Bioresour. Technol.* 182, 89–97.
- Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), 2006. Education rules SDA n° 68 de 12/12/2006. Annex physicochemical official analytical methods for the control of milk and dairy products. Official Diary of the Union, Brazil.
- Margarites, A.C.F., Costa, J.A.V., 2014. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. *Int. J. Eng. Res. Appl.* 4, 80–86.
- Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E., Georgakakis, D., 2013. Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Energies* 6, 3937–3950.
- Milano, J., Ong, H.C., Masjuki, H.H., Chong, W.T., Lam, M.K., Loh, P.K., Vellayan, V., 2016. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable Sustainable Energy* 58, 180–197.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Moura, J.A.M., Bezerra, N.E., Koenig, M.L., LEÇA, E.E., 2006. Chemical composition of microalgae in semi-intensive culture: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke and *Thalassiosira weiss flogii* (Grunow). *Cienc. Agron.* 37, 142–148.
- Mussato, S.I., Dragone, G., Guimarães, P.M.R., Silva, J.P.A., Carneiro, L.M., Roberto, I. C., Vicente, A., Domingues, L., Teixeira, J.A., 2010. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production-R1. *Biotechnol. Adv.* 28, 817–830.
- Oncel, S., 2013. Microalgae for a macroenergy world. *Renewable Sustainable Energy* 26, 241–264.
- Pagno, C.H., Baldasso, C., Tessaro, I.C., Flores, S.H., Jong, E.V., 2009. Obtaining of protein concentrate of whey and technological characterization of its functional properties. *Aliment Nutr.* 20, 231–239.
- Parada, J.L., Caire, G.Z., Mulé, M.C.Z., Cano, M.M.S., 1998. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 45, 225–228.
- Parmar, A., Singh, N.K., Pandey, A., Gnansounou, E., Madamwar, D., 2012. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresour. Technol.* 102, 10163–10172.
- Patil, S., Al-zarea, B.K., Maheshwari, S., Sahu, R., 2015. Comparative evaluation of natural antioxidants *Spirulina* and aloe vera for the treatment of oral submucous fibrosis. *J. Oral. Biol. Craniofac. Res.* 1, 1–5.
- Posadas, E., Morales, M.M., Gomez, C., Acién, F.G., Muñoz, R., 2015. Influence of pH and  $\text{CO}_2$  source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. *Chem. Eng. J.* 265, 239–248.
- Schäfer, A.L., Richards, B.S., 2005. Testing of a hybrid membrane system for groundwater desalination in an Australian national park. *Desalination* 183, 55–62.
- Singh, J., Gu, S., 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 14, 2596–2610.
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H.H., Renganathan, S., 2015. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 55, 909–941.
- Trumbo, J.L., Tonn, B.E., 2015. Biofuels: a sustainable choice for the United States' energy future? *Technol. Forecasting Social Change* 1, 1–15.
- Vonshak, A., Boussiba, S., Abeliovich, A., Richmond, A., 1983. Production of *Spirulina* Biomass: maintenance of Monoalgal culture outdoors. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 341–349.
- Yen, H.W., Hu, C., Chen, C.Y., Ho, S.H., Lee, D.J., Chang, J.S., 2013. Microalgae-based biorefinery – from biofuels to natural products. *Bioresour. Technol.* 135, 166–174.
- Zhu, L.D., Hiltunen, E., Antila, E., Zhong, J.J., Yuan, Z.H., Wang, Z.M., 2014. Microalgal biofuels: flexible bioenergies for sustainable development. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 30, 1035–1046.