



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (PPGCTA)



Engenharia de biorreatores para maximização da produção de biomassa e biocompostos pela microalga *Heterochlorella luteoviridis*

– Tese de Doutorado –

Tania Menegol

Porto Alegre

2018

Tania Menegol

Engenharia de biorreatores para maximização da produção de biomassa e biocompostos pela microalga *Heterochlorella luteoviridis*

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof^a Dr^a. Rosane Rech.

Coorientador: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues.

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Menegol, Tania
Engenharia de biorreatores para maximização da
produção de biomassa e biocompostos pela microalga
Heterochlorella luteoviridis / Tania Menegol. --
2018.

142 f.

Orientador: Rosane Rech.

Coorientador: Eliseu Rodrigues.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Heterochlorella luteoviridis. 2. Ácidos
graxos. 3. Carotenoides. 4. Modelagem matemática. 5.
Fermentação alcoólica. I. Rech, Rosane, orient. II.
Rodrigues, Eliseu, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (PPGCTA)**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese Engenharia de biorreatores para maximização da produção de biomassa e biocompostos pela microalga *Heterochlorella luteoviridis*, elaborada por Tania Menegol, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciência de Alimentos e Tecnologia de Alimentos.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Débora Jung Luvizetto Faccin

Prof^a. Dr^a. Giovana Domeneghini Mercali

Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Colla

Porto Alegre, 9 de julho de 2018.

Agradecimentos

À minha família, em especial ao André, pelo apoio recebido incondicionalmente.

À professora Dr^a. Rosane Rech pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, orientação, amizade e auxílio nos momentos mais necessários.

Ao Prof. Dr. Eliseu Rodrigues, pela coorientação e ensinamentos nas diversas áreas do conhecimento.

Aos técnicos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), em especial a Andressa por apoio e condução das análises cromatográficas e ao Diogo pela disponibilidade em ajudar quando necessário.

Aos integrantes do Laboratório de Bioengenharia do ICTA, em especial Lenon, Carolina e Carla pela amizade e principalmente pelo auxílio na execução deste trabalho e pelas discussões técnicas e não técnicas.

À Daniela Barros Vargas, pela amizade e principalmente por toda ajuda no laboratório durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vitor Manfroi, por todos os ensinamentos para produção de vinho

À minha amiga Juliana, pelo apoio desde o início deste trabalho.

Ao CNPQ pelo financiamento da pesquisa

À CAPES pelo financiamento pessoal e pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche na Universidade de Almería - Espanha.

Ao Prof. Dr. Emilio Molina Grima, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa em Biotecnologia Marinha na Universidade de Almería.

À Prof. Dr^a Maria Carmén Cerón García da Universidade de Almería, pelos ensinamentos compartilhados e acompanhamento incondicional da pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

As microalgas são conhecidas pela sua elevada capacidade fotossintética e pela produção de compostos de alto valor agregado. Nutrientes essenciais como nitrogênio e carbono, a intensidade da luz e a temperatura são responsáveis por mudanças substanciais na produção de biomassa e compostos de interesse. Este trabalho teve como objetivo estudar os fatores como concentração de nitrogênio, variação da temperatura, regime de iluminação e regime de operação do fotobiorreator (batelada, batelada repetida e contínuo) que afetam a formação e a composição da biomassa (proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos graxos e carotenoides) da microalga *Heterochlorella luteoviridis* e desenvolver um sistema de cultivo para a utilização do CO₂ formado durante a fermentação alcoólica na produção de vinho. Primeiramente foram avaliados os efeitos da temperatura (22 °C a 32 °C) e concentrações de nitrogênio (75 mg L⁻¹ a 375 mg L⁻¹ NaNO₃) sobre a formação de biomassa *H. luteoviridis* e sua composição química. A concentração de nitrogênio e a temperatura influenciaram no teor de carboidratos, carotenoides e proteínas, contudo não afetaram o perfil qualitativo de carotenoides e ácidos graxos. A maior concentração de biomassa (3,35 g L⁻¹) foi obtida com a maior concentração de nitrogênio testada. Mantendo-se a temperatura fixa (27 °C) realizaram-se cultivos com concentração de nitrogênio entre 300 mg L⁻¹ e 750 mg L⁻¹ NaNO₃. A máxima produção de biomassa (5,26 g L⁻¹) e carotenoides (2,06 mg g⁻¹) foi obtida com concentração de nitrogênio de 650 mg L⁻¹ NaNO₃. As cinéticas de crescimento e consumo de nitrogênio em batelada foram ajustadas a modelos fenomenológicos. O modelo matemático proposto neste trabalho mostrou o melhor ajuste para biomassa (R² = 0,994) e consumo de nitrogênio (R² = 0,996). A partir deste modelo foram realizadas simulações de cultivo em modo de operação batelada repetida e contínuo com diferentes taxas de diluição e os cultivos com as maiores produtividades de biomassa preditas foram validados experimentalmente. As culturas em batelada repetida apresentaram produtividade de biomassa menor que a predita, enquanto que a contínua apresentou produtividade similar à predita pelo modelo (1,09 ± 0,01 g L⁻¹ d⁻¹). Os cultivos em batelada-repetida e contínuo apresentaram biomassa com maiores teores de proteínas, ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e carotenoides quando comparados à batelada. O cultivo contínuo foi repetido utilizando CO₂ proveniente da fermentação alcoólica da produção de vinho como fonte de carbono, o qual apresentou comportamento similar ao cultivo com a CO₂ comercial. Por fim, avaliou-se os efeitos da intensidade e dos comprimentos de onda da luz no crescimento e na composição da microalga *H. luteoviridis*. As culturas iluminadas por LED brancos com intensidade máxima de 1500 μmol m⁻² s⁻¹ apresentaram maiores produtividades de biomassa (0,29 g L⁻¹ d⁻¹). Comparando culturas iluminadas por LEDs vermelhos e/ou azuis, os primeiros estimularam o crescimento da biomassa enquanto que os últimos estimularam a biossíntese de carotenoides, lipídeos e proteínas.

Palavras-chave: *Heterochlorella luteoviridis*. Modelagem matemática. Carotenoides. Ácidos graxos. Fermentação alcoólica.

Abstract

Microalgae are known for their high photosynthetic activity and by the production of high-value products. Essential nutrients, like nitrogen and carbon, light intensity, and temperature are responsible for substantial changes in biomass and compounds production. This work aimed to study the parameters as concentration of nitrogen, temperature variation, lighting regime and operation regime of the photobioreactor (batch, repeated-batch and continuous) that affect biomass production and composition (proteins, lipids, carbohydrates, fatty acids and carotenoids) of the microalga *Heterochlorella luteoviridis*, and to develop an integrated culture system to use the CO₂ from alcoholic wine fermentation to grow the microalga. Firstly, the effects of temperature (22 °C to 32 °C) and nitrogen concentration (75 mg L⁻¹ to 375 mg L⁻¹ NaNO₃) were evaluated. Both parameters affected carbohydrates, carotenoids and protein contents in the biomass but did not affect the qualitative profile of carotenoids and fatty acids. The highest biomass concentration (3.35 g L⁻¹) was achieved at the highest nitrogen concentration. New cultures were performed using nitrogen concentration between 300 mg L⁻¹ and 750 mg L⁻¹ NaNO₃, and keeping temperature fixed at 27 °C. The maximal biomass and carotenoid production, 5.26 g L⁻¹ and 2.06 mg g⁻¹, were achieved using 650 mg L⁻¹ NaNO₃. The biomass growth and nitrogen consumption were adjusted by phenomenological models. The model proposed in this work showed the highest adjust for biomass (R² = 0.994) and nitrogen (R² = 9.996) data. This model was used to simulate repeated-batch and continuous cultures using several dilution rates. The cultures with the highest predicted biomass productivities were experimentally validated. The repeated-batch cultures showed lower biomass productivities than the predicted one, while the continuous culture showed biomass productivity similar to the one predicted by the model (1.09 ± 0.01 g L⁻¹ d⁻¹). The biomass resultant from these cultures had higher contents of proteins, omega-3 polyunsaturated fatty acids and carotenoids, compared to the biomass from batch cultures. The continuous culture was repeated using CO₂ from wine fermentation as a carbon source. The results were similar to the ones using commercial CO₂, showing the feasibility of the integrated process. Finally, the effects of light intensity and wavelength were evaluated on the growth and composition of *H. luteoviridis* biomass. Cultures illuminated with white LEDs at maximum intensity of 1500 μmol m⁻² s⁻¹ showed the higher biomass productivity, 0.29 g L⁻¹ d⁻¹. Comparing cultures illuminated with red and/or blue LEDs, the former stimulated biomass growth and the latter the carotenoid, lipids and protein biosynthesis.

Keywords: *Heterochlorella luteoviridis*. mathematical modelling. Carotenoids. Fatty acids. Alcoholic fermentation.

Lista de Figuras

CAPÍTULO 2.....	18
Figura 2.1. <i>Heterochlorella luteoviridis</i> , adaptado de (ICB, 2016).	20
Figura 2.2. Estrutura de alguns carotenoides encontrados em microalgas (Bassi et al. 2016).	23
Figura 2.3. Exemplo de cultivo comercial de microalgas (a) lagoas raceway em pequena escala, (b) fotobiorreator de painel plano. Adaptado de (BARREIRA et al., 2015).	24
Figura 2.4. Fotobiorreator tipo airlift com trocador de calor interno desenvolvido por Kochem et al. (2013).	26
Figura 2.5. Diagrama resumido da assimilação do nitrogênio inorgânico (Cai; Park; Li, 2013).	32
Figura 2.6. Esquema da fixação de CO ₂ em microalgas e resumo da fotossíntese (à direita) (ZHAO; SU, 2014)	34
CAPÍTULO 3.....	41
Figura 3.1. Fluxograma geral do estudo	42
CAPÍTULO 4.....	45
Figure 4.1. Kinetics of (a) biomass growth and (b) nitrogen consumption of <i>H. luteoviridis</i> cultured under different temperatures and initial NaNO ₃ concentrations. (■) 12 mg L ⁻¹ N-NO ₃ , 27°C; (▲) 24 mg L ⁻¹ N-NO ₃ , 22 °C; (▼) 24 mg L ⁻¹ N-NO ₃ , 32 °C; (◆) 36 mg L ⁻¹ N-NO ₃ , 27 °C; (►) 48 mg L ⁻¹ N-NO ₃ , 22 °C; (◄) 48 mg L ⁻¹ N-NO ₃ , 32 °C; (●) 60 mg L ⁻¹ N-NO ₃ , 27 °C. Error bars represent the standard deviation between the four repetitions of each culture condition (<i>n</i> = 4).	50
Figure 4.2. Response surfaces for (a) total carbohydrate (mg g ⁻¹) and (b) protein (mg g ⁻¹) contents in the biomass of <i>H. luteoviridis</i> grown under different temperatures and nitrogen concentrations.	51
Figure 4.3. Lipid content in biomass of <i>H. luteoviridis</i> grown under different of nitrogen concentrations. Error bars represent the standard deviation between the four repetitions of each culture condition (<i>n</i> = 4).	53
Figure 4.4. Response surfaces for (a) xanthophyll (mg g ⁻¹) and (b) carotene (mg g ⁻¹) contents in the biomass of <i>H. luteoviridis</i> grown under different temperatures and nitrogen concentrations.	56
CAPÍTULO 5.....	60

Figure 5.1. Cultivation of <i>H. luteoviridis</i> in photobioreactors enriched with CO ₂ and nitrogen (650 mg L ⁻¹ N-NO ₃). (a): kinetics of biomass growth, total carotenoids and nitrogen consumption; (b) protein, lipid and carbohydrate contents in biomass during growth.	69
Figure 5.2. Model simulation results for (A) biomass concentration and (B) nitrogen concentration with time for experimental data and the tested models.	70
Figure 5.3. Biomass maximum productivity obtained per simulation of model of growth of population of <i>H. luteoviridis</i> with renovation rates of 0.009 up to 0.019 h ⁻¹ and 0.008 up to 0.013 h ⁻¹ for repeated batch cultivation.	71
Figure 5.4. Growth kinetics and the consumption of nitrogen experimental and simulation <i>H. luteoviridis</i> in dilution rate of 0.8 L 24 h ⁻¹ (A), 1.0 L 24 h ⁻¹ (B) and 1.3 L 48 h ⁻¹ (C) for repeated batch cultivation.	72
Figure 5.5. Concentration of the carotenoids of biomass of <i>H. luteoviridis</i> grown under dilution rate of 1.3 L 48 h ⁻¹ for repeated batch and batch cultivation.	75
CAPITULO 6.....	77
Figure 6.1. Kinetics of CO ₂ accumulated and CO ₂ production rates from wine production....	84
Figure 6.2. Schematic design of the integrated system between photobioreactors and wine fermenters.	85
Figure 6.3. Biomass (A) and Nitrogen (B) concentration during continuous cultivation of <i>H. luteoviridis</i> ($D = 0.401 \text{ d}^{-1}$) in photobioreactors enriched with commercial CO ₂ (CC) and CO ₂ from wine fermentation using $VPBR:V_{wine} = 5.0:1$ ($R_{5.0:1}$) and $VPBR:V_{wine} = 2.5:1$ ($R_{2.5:1}$)	86
CAPÍTULO 7.....	95
Figure 7.1. Detalhes do fotobiorreator da coluna de bolhas, iluminado com diferentes intensidades de luz, utilizando LEDs multi-espectrais	99
Figure 7.2. Consumo de fosfato (a) e nitrato pela <i>H. luteoviridis</i> em diferentes proporções molares N: P e concentração inicial de nitrato	103
Figure 7.3. Efeito de luz LED incidente e das cores de LED sobre a concentração de carotenoides na biomassa de <i>H. luteoviridis</i>	110

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 2.....	18
Tabela 2.1 Modelos matemáticos.....	39
CAPÍTULO 3.....	41
Tabela 3.1. Concentração das soluções para suplementação do meio base	44
CAPÍTULO 4.....	45
Table 4 1 Composition of carotenoids (mg g^{-1}) <i>H. luteoviridis</i> grown under different temperatures and nitrogen concentrations.*	55
Table 4.2. Fatty acids composition of <i>H. luteoviridis</i> grown under different temperatures and nitrogen concentrations.*	58
CAPÍTULO 5.....	60
Table 5.1. Biomass and total carotenoids content in biomass of <i>H. luteoviridis</i> grown in PBR, at 27 °C and 18.0 klx, under different of nitrogen concentrations	68
Table 5 2. Results for model parameter values from the experimental data.....	70
Table 5.3. Content and Productivity of biomass and biochemical composition of <i>H. luteoviridis</i> grown under repeated batch and batch cultivation.....	73
Table 5.4. Concentration de fatty acids (Saturated fatty acids (STA); monounsaturated fatty acids (MUFA); polyunsaturated fatty acids (PUFA)) content of biomass of <i>H. luteoviridis</i> grown under dilution rate of 1.3 L 48 h ⁻¹ for repeated batch and batch cultivation.....	76
CAPITULO 6.....	77
Table 6.1. Parameters estimated for DroopLog model (Menegol et al., results not published)	80
Table 6. 2.Values for the specified variables and start values for the dynamic variables for the continuous simulation of <i>H luteoviridis</i> culture.....	81
Table 6.3. Results for biomass concentration and biomass productivity obtained in this work for <i>H. luteoviridis</i> grown under continuous cultivation ($D = 0.401 \text{ d}^{-1}$), and comparison with other reports.....	87
Table 6.4. Results for lipids, fatty acids, carotenoids and proteins contents and productivities obtained in this work for <i>H. luteoviridis</i> grown under continuous cultivation ($D = 0.401 \text{ d}^{-1}$), and comparison with other reports.	92

CAPÍTULO 7.....	95
Tabela 7.1. Efeito da concentração de nitrogênio e fósforo sobre os parâmetros de crescimento celular e carotenoides totais	103
Tabela 7. 2. Efeito de luz LED incidente e das cores de LED sobre a concentração de biomassa, lipídeos e proteínas e fluorescência de clorofila.	106
Tabela 7.3. Concentração de ácidos graxos na biomassa de <i>H. luteoviridis</i> cultivada sob intensidade luminosa com LED Branco LED (240 a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), LED vermelho (700 a 1100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e intensidade luminosa fixa a 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em 100 % LED azul e vermelho e suas combinações.	108

Nomenclatura

Lista Siglas de Símbolos

D (h^{-1})	<i>dilution rate</i>
F (L d^{-1})	<i>volumetric flow</i>
k_N (g L^{-1})	<i>half saturation constant for nitrogen</i>
k_q (g g^{-1})	<i>minimum cell quota</i>
N (g L^{-1})	<i>nitrogen concentration</i>
N_{dl} (-)	<i>dimension less nitrogen concentration</i>
N_{in} (g L^{-1})	<i>initial nitrogen concentration</i>
N_{ref} (g L^{-1})	<i>reference nitrogen concentration</i>
m_N ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	<i>nitrogen non-growth-associated term</i>
P_x ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	<i>Cellular productivity</i>
q (g g^{-1})	<i>internal nitrogen cell quota</i>
R^2	<i>coefficient of determination</i>
X_{max} (g L^{-1})	<i>maximum biomass concentration</i>
X (g L^{-1})	<i>biomass concentration</i>
Y_{XN} (g g^{-1})	<i>nitrogen growth-associated term</i>
ρ ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	<i>nitrogen uptake rate</i>
ρ_{max} ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	<i>maximum nitrogen uptake rate</i>
μ (h^{-1})	<i>specific growth rate</i>
μ_{max} (h^{-1})	<i>maximum specific growth rate</i>
μ_{m} (h^{-1})	<i>maximum specific growth rate of Droop model</i>

Sumário

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	15
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Características, aplicações e comercialização das microalgas em geral.....	18
2.2 <i>Heterochlorella luteoviridis</i>	19
2.3 Composição das microalgas em geral.....	20
2.4 Componentes bioativos presentes na fração lipídica das microalgas e suas aplicações.....	21
2.4.1 Ácidos graxos.....	21
2.4.2 Carotenoides.....	22
2.5 Sistemas de cultivo de microalgas	24
2.5.1 Sistema de cultivo aberto	24
2.5.2 Sistemas de cultivo fechados.....	25
2.6 Modo de operação de cultivo em batelada, batelada repetida e contínuo	27
2.7 Fatores essenciais no cultivo de microalgas	28
2.7.1 Luminosidade	28
2.7.2 Temperatura	30
2.7.3 Nitrogênio.....	31
2.7.4 Carbono	33
2.7.5 Fixação biológica de CO ₂ por microalgas.....	35
2.7.6 Fontes alternativas de CO ₂ biológico para cultivo de microalgas.....	37
2.8 Modelagem matemática para sistemas de cultivo	38
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Fluxograma geral do estudo	42
3.2 Microrganismo e manutenção celular	43
3.3 Meio de cultivo e preparo do inóculo	43
CAPÍTULO 4 – EFEITO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO NA COMPOSIÇÃO DE BIOMASSA DA <i>HETEROCHLORELLA LUTEOVIRIDIS</i>... ..	45
4.1 Introduction	45
4.2 Materials and Methods	47
4.2.1 Microalgae and cultivation condition.....	47
4.2.2. Determination of lipids and fatty acid methyl esters (FAMES)	48

4.2.3 Determination of carbohydrates and proteins	48
4.2.5 Determination of carotenoids	49
4.2.6 Statistical analysis	49
4.3. Results and Discussion	50
4.3.1 Biomass	50
4.3.2 Biomass composition: carbohydrates, proteins and lipids	51
4.3.3 Identification and quantification of lipid fraction	53
4.4. Conclusion	59
CAPÍTULO 5 MODELAGEM CINÉTICA DA CULTURA DE <i>HETEROCHLORELLA LUTEOVIRIDIS</i> EM BATELADA E EM BATELADA REPETIDA: EFEITO SOBRE A BIOMASSA E CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	60
5.1 Introduction	60
5.2 Materials and Methods	62
5.2.1 Microalgae and pre-cultivation	62
5.2.2 Batch cultures for the optimum nitrogen concentration	62
5.2.3 Biomass growth and nitrogen consumption modeling	63
5.2.4 Process optimization by repeated-batch cultures	65
5.2.5 Analytical methods	65
5.2.5.1 Determination of carotenoids by HPLC-DAD-MS/MS	66
5.2.5.2 Determination of lipids and fatty acid methyl esters (FAMES)	66
5.3 Results and Discussion	67
5.3.1 Optimum nitrogen concentration and kinetics of biomass growth and composition	67
5.3.2 Mathematical modeling	69
5.3.3 Optimization experimental model repeated-batch	71
5.3.4 Effect of cultivation mode on biomass composition	74
5.4 Conclusion	76
CAPÍTULO 6 – CULTIVO CONTÍNUO DE <i>HETEROCHLORELLA LUTEOVIRIDIS</i> UTILIZANDO CO₂ DE FERMENTAÇÃO DO VINHO	77
6.1 Introduction	77
6.2 Materials and Methods	79
6.2.1 Computer simulation and optimization of the continuous culture	79
6.2.2 Cultivation of microalgae <i>Heterochlorella luteoviridis</i> in continuous operation mode using CO ₂ from alcoholic fermentation.	81
6.2.3 CO ₂ production from wine fermentation	82
6.2.5 Analytical methods	83

6.3 Results and Discussion	83
6.3.1 Kinetics of CO ₂ production from alcoholic fermentation in wine production	83
6.3.2 Continuous culture of <i>Heterochlorella luteoviridis</i> using CO ₂ from alcoholic fermentation	84
6.3.2 Biomass composition of <i>H. luteoviridis</i> grown in continuous cultures using CO ₂ from alcoholic fermentation	89
6.4 Conclusion	94
CAPÍTULO 7 – EFEITO DA ILUMINAÇÃO DE DIODOS EMISSORES DE LUZ SOBRE O CRESCIMENTO E A FORMAÇÃO DE PRODUTOS DE ALTO VALOR DE MICROALGA <i>HETEROCHLORELLA LUTEOVIRIDIS</i> CULTIVADA EM FOTOBIORREATOR DE COLUNA DE BOLHAS	95
7.1 Introdução	96
7.2 Materiais e Métodos	97
7.2.1 Microalga e inóculo	97
7.2.2 Otimização da concentração de nitrogênio e fósforo no meio f / 2	97
7.2.3 Fotobiorreator de coluna de bolhas com iluminação LED	98
7.2.4 Procedimentos analíticos	100
7.2.5 Análise estatística	101
7.3 Resultados e Discussão	101
7.3.1 Efeito da concentração de nitrogênio e fósforo no meio de cultura f/2 sobre parâmetros de crescimento e carotenoides totais	101
7.3.2 Efeito das diferentes intensidades máximas e cores de luz LED sob o crescimento de biomassa e a composição de proteínas e lipídeos	103
7.3.5 Efeito da intensidade máxima e de cores de luz LED sobre os produtos de alto valor.	107
7.4 Conclusão	110
CAPÍTULO 8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
PERSPECTIVAS FUTURAS	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
ANEXO	130
ANEXO 1. Laudo de identificação da microalga <i>H.luteoviridis</i>	130
APENDICE 1. Métodos analíticos	132

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

As microalgas são microrganismos unicelulares, capazes de sobreviver em diferentes habitats aquáticos com diferentes condições de temperaturas, pH e com pouca disponibilidade de nutrientes (ROLEDA et al., 2013). São detentoras de grande habilidade para transformar energia solar em energia química por meio da fotossíntese (ZHAO; SU, 2014). Devido a essa habilidade, as microalgas são importantes sequestrantes de gases da atmosfera, como o dióxido de carbono (CO₂). Algumas microalgas (*chlorophytas*) revelam grande capacidade de resistir a condições de estresse (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Essa capacidade está relacionada às várias adaptações fisiológicas (RAVEN; GEIDER, 1988), incluindo alterações na eficiência fotoquímica do fotossistema II (FAN et al., 2012) e mudanças na taxa da divisão celular e na composição dos pigmentos fotossintéticos (BAR et al., 1995).

Nas últimas quatro décadas, o interesse pelo uso de microalgas aumentou consideravelmente, uma vez que esses microrganismos representam uma fonte promissora na produção de compostos valiosos, como carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados (FERNÁNDEZ et al., 2016; GONG; BASSI, 2016). Substâncias derivadas de microalgas podem ser usadas como aditivos alimentares (GARCÍA-CAÑEDO et al., 2016; MINHAS et al., 2016) e apresentam efeitos positivos sobre a saúde humana (RUSSO, 2009; SIMOPOULOS, 2002), por isso são de grande interesse para as indústrias alimentícia, nutracêutica e farmacêutica. Bioprodutos como a luteína e a zeaxantina, derivadas de microalgas, representam um papel importante no mercado nutracêutico, uma vez que esses pigmentos estão relacionados à saúde dos olhos (GONG; BASSI, 2016). A luteína também é utilizada como aditivo alimentar, com a função de melhorar a cor dos alimentos (LIN; LEE; CHANG, 2015). Devido suas amplas aplicações, a demanda de mercado da luteína nos EUA foi estimada em US \$ 309 milhões em 2018 (RIO-CHANONA et al., 2017).

Os ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3) são amplamente utilizados na suplementação alimentar. A ingestão desses ácidos graxos está associada à prevenção de doenças cardíacas e inflamatórias (CALDER, 2008; SCHACKY, 2000; SIMOPOULOS, 2002). Os principais ácidos graxos ômega 3 explorados pela indústria nutracêutica são o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA 22:6n-3) (QIAO et al., 2016). Microalgas são conhecidas pela produção de altos teores de EPA (38% do total de ácidos graxos) (SCHÜLER et al., 2017). O aumento da produção de ácidos graxos poli-insaturados na

composição celular de microalgas pode ser promovido pela modulação de condições específicas de cultivo (CHEN et al., 2011b; FENG et al., 2012).

A modelagem matemática combinada com o conhecimento dos parâmetros de cultura tem sido usada para entender efetivamente a manipulação de sistemas biológicos complexos e otimizar a produção metabólica de interesse em culturas de algas (ADESANYA et al., 2014; CHANG et al., 2016). A modelagem do crescimento de microrganismos tornou-se essencial para a expansão do processo biotecnológico de cultivo de microalgas, uma vez que um modelo preciso é um pré-requisito para prever o desempenho do processo e a otimização das condições de operação (YUN; PARK, 2003). Estudos têm demonstrado que modelos matemáticos capazes de prever a dinâmica de microalgas sob diferentes condições de crescimento ajudam a otimizar o desempenho do processo e as condições de operação (FERNANDES et al., 2015). Tradicionalmente, modelagem cinética com base nos modelos Droop, Monod e logística é utilizada para prever-se um crescimento das microalgas em resposta ao substrato de concentração, como o nitrogênio (ADESANYA et al., 2014). No entanto, é o uso relativamente recente de modelagem matemática preditiva para otimização do cultivo de microalgas que abre amplo campo para a pesquisa, especialmente, no sentido de construir modelos robustos capazes de prever, com a maior precisão possível, a dinâmica de um sistema fotoautotrófico de produção contínua, a longo prazo, para o crescimento de microalgas e produção de biocompostos ao longo do processo (SUN et al., 2015).

Na perspectiva de desenvolvimento sustentável, ou seja, desenvolvimento econômico e social sem geração de prejuízos para os recursos naturais e à biodiversidade da Terra, nota-se crescente demanda por tecnologias que auxiliem na redução do aquecimento global. Nesse sentido, pesquisas demonstram que as microalgas podem ser utilizadas para minimizar problemas ambientais como gases de efeito estufa e poluição das águas por excesso de matéria orgânica (HARUN et al., 2010; ZHAO; SU, 2014), exatamente porque uma de suas principais vantagens reside na remoção de carbono inorgânico durante seu crescimento. Demonstrou-se que, para 1 kg de biomassa de microalga produzida, são retirados da atmosfera cerca de um 1,8 kg de CO₂ (BLAIR; KOKABIAN; GUDE, 2014). Estudos mostram ser possível a utilização de CO₂ proveniente de fermentação alcoólica da produção de etanol a partir do melaço de cana de açúcar na produção de biomassa de microalgas (FERREIRA et al., 2012; XU; ISOM; HANNA, 2010) .

Todavia, não se encontrou na literatura consultada estudos que relatem a produção de biomassa a partir do cultivo da microalga *Heterochlorella luteoviridis* utilizando CO₂ gerado

da fermentação alcoólica da produção de vinho. Essa lacuna motivou a realização desse estudo que teve como principal objetivo desenvolver um sistema de cultivo para maximizar a produção de biomassa e compostos de interesse da microalga *Heterochlorella luteoviridis* utilizando o dióxido de carbono (CO₂) formado durante a fermentação alcoólica da produção de vinho.

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar o efeito da temperatura e da concentração de nitrogênio sobre o crescimento e composição (carotenoides, lipídeos, carboidratos e proteínas) da microalga *Heterochlorella luteoviridis* em fotobiorreator *airlift*.
- b) Avaliar e modelar as cinéticas de crescimento de *Heterochlorella luteoviridis* e sua composição (carotenoides, lipídeos, carboidratos e proteínas), utilizando modelos matemáticos baseados em modelos existentes para simulação e otimização de diferentes modos de operação de fotobiorreatores tipo *airlift*.
- c) Quantificar e caracterizar a produção de CO₂ durante o processo de vinificação e desenvolver um processo integrado de cultivo de microalgas em modo contínuo utilizando CO₂ proveniente do processo de vinificação.
- d) Avaliar os efeitos da luz *LED* (intensidade e comprimento de onda) no crescimento e na composição da microalga *Heterochlorella luteoviridis*.

O estudo se apresenta estruturado em oito (8) capítulos, sendo que o primeiro é esse que introduz o assunto e a justificativa. O Capítulo 2 apresenta o embasamento teórico pertinente ao desenvolvimento do presente trabalho.

Na sequência, apresenta-se o Capítulo 3 que reúne uma abordagem geral dos materiais e métodos utilizados no estudo, forma de manutenção da *H. luteoviridis*, meio de cultivo e preparação do inóculo empregado na realização dos experimentos.

Os Capítulos de 4 a 7 reúnem os resultados obtidos na forma de quatro (4) artigos científicos. No Capítulo 8 apresentam-se as considerações finais e sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características, aplicações e comercialização das microalgas em geral

Microalgas são microrganismos unicelulares fotossintéticos que habitam os ecossistemas aquáticos do planeta, sendo encontradas também em ambientes com temperaturas extremas (METTING; PYNE, 1986). A diversidade desses microrganismos é muito maior que das plantas terrestres (SCOTT et al. 2010). Estima-se que existam entre 200 a 800 mil espécies de algas, mas apenas 35 mil dessas espécies foram estudadas e exploradas quanto ao seu potencial metabólico (RAJKUMAR; YAAKOB ZAHIRA, 2013) Os grupos de algas mais importantes em termos de abundância são algas verdes (*Chlorophyceae*), diatomáceas (*Bacillariophyceae*), algas verde-azuladas (*Cyanophyceae*) e algas douradas (*Chrysophyceae*) (KHAN et al., 2009).

As microalgas são classificadas pelas suas características principais como pigmentação, composição da parede celular, presença e tipo de flagelos e sua constituição química (METTING; PYNE, 1986). As microalgas do grupo *Chlorophyceae* geralmente são verdes, devido à presença de pigmentos, como clorofila a e b. Além disso, microalgas verdes possuem diversos carotenoides altamente similares aos encontrados em plantas verdes terrestres (SANCHEZ et al., 2013).

A partir das décadas de 1950 e 1960 foram realizadas e divulgadas pesquisas sobre a possibilidade da produção, em grande escala, e comercialização de microalgas e cianobactérias (CHACÓN-LEE; GONZÁLEZ-MARIÑO, 2010). Em especial, reportam-se as tentativas de produção e comercialização da microalga *Chlorella* (CHACÓN-LEE; GONZÁLEZ-MARIÑO, 2010; SAFI et al., 2014), cujo cultivo comercial surgiu em 1961, no Japão, por iniciativa da empresa Nihon Chlorella Inc. Em seguida, outras fábricas de *Chlorella* foram construídas em países como Taiwan, Malásia e Indonésia. Na década de 1980, haviam aproximadamente 46 fábricas na Ásia, com produção superior a 1000 kg por mês de biomassa, principalmente do gênero *Chlorella* (BOROWITZKA, 1999; CHU, 2012). No ano de 2009, a produção anual mundial atingiu 2000 toneladas (massa seca) de *Chlorella* (SAFI et al., 2014). Em 2014, o consumo de microalgas somente para os setores de alimentação humana e animal na Europa atingiu 9000 toneladas (EU Science Hub, 2014).

A biomassa de *Chlorella* é comercializada na forma de cápsulas, comprimidos e extratos (RASMUSSEN; MORRISSEY, 2007). A suplementação da dieta humana é certificada como GRAS (*Generally Recognized As Safe*), que assegura que a *Chlorella* não produz toxinas e pode ser empregada como suplemento alimentar para humanos e algumas espécies de animais (WALKER et al., 2005), desde que sejam consideradas as condições higiênico-sanitárias na produção, bem como a qualidade das águas de cultivo.

O campo de aplicação das microalgas é amplo, variando da indústria alimentícia à indústria cosmética, por exemplo, em que seus derivados e extratos são utilizados em uma variedade de produtos (BOROWITZKA, 2013), tais como cremes hidratantes para o rosto e pele e produtos para cuidado do cabelo. Ainda, possui potencial de uso como matéria prima para produção de biodiesel, visto que algumas espécies produzem quantidade elevada de lipídeos (HARUN et al., 2010). Uma das grandes vantagens da utilização de microalgas para produção de biodiesel reside no fato de seu cultivo não afetar a produção de alimentos, além de ser relevante à substituição de combustíveis fósseis (CHU, 2012). Alternativamente, são empregadas para fins ambientais como na redução de poluentes orgânicos (BARRA et al., 2014; HARUN et al., 2010) e na mitigação de CO₂ (HO et al., 2011).

2.2 *Heterochlorella luteoviridis*

Heterochlorella luteoviridis (Chodat) é uma microalga verde (*Chlorophyta*) pertencente à classe *Trebouxiophyceae*, ordem *Trebouxiales*, gênero *Heterochlorella*. Esta microalga era formalmente conhecida antes de 2009 como *Chlorella luteoviridis* (Chodat) (NEUSTUPA et al., 2009).

As células de *H. luteoviridis* são unicelulares, imóveis, apresentando forma arredondada, com tamanho variando entre 5 a 10 µm de diâmetro dependendo da idade celular (Figura 2.1) (KIM et al., 2017).

A composição de *H. luteoviridis* pode variar dependendo das condições de cultivo. Em condições autotróficas e sob regime de cultivo em batelada sob iluminação contínua, essa microalga apresentou cerca de 41 % de carboidratos, 11 % de lipídeos e 29 % de proteínas (DIPRAT et al., 2016). Em cultivo sob baixa intensidade luminosa (40 µmolm⁻² s⁻¹) e ciclo claro escuro (16:8 h) um maior acúmulo de proteína (51 %) foi observado (KIM et al., 2017). Além disso, a *H. luteoviridis* apresenta em sua composição importantes carotenoides como

Luteína e β -caroteno (DIPRAT et al., 2016) e ácidos graxos poli-insaturados essenciais como ácido α -linolênico (ω -3) e ácido linoleico (ω -6) (KIM et al., 2017).

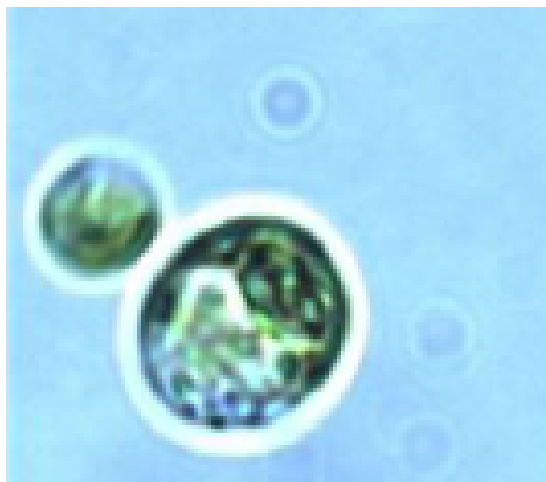


Figura 2.1. *Heterochlorella luteoviridis*, adaptado de (ICB, 2016).

2.3 Composição das microalgas em geral

As microalgas são de grande interesse para a indústria alimentícia porque possuem, em sua composição, proteínas (BATISTA et al., 2013), carboidratos (HARUN et al., 2010; SPOLAORE et al., 2006) e lipídeos (HARUN et al., 2010), além de vitaminas tais como A, C, E e do complexo B (BARRA et al., 2014; SPOLAORE et al., 2006), ácidos graxos dos tipos ômega 3 e 6 (ω -3 e ω -6) e carotenoides (PULZ; GROSS, 2004).

Os carboidratos normalmente são acumulados nas microalgas como compostos de armazenamento intermediário durante a fase estacionária de crescimento. Geralmente, os carboidratos são consumidos durante a síntese de lipídios em condições limitadas de nutrientes (BENEMANN, 2013). Os carboidratos em microalgas podem ser encontrados na forma de amido, glicose e outros polissacarídeos (SPOLAORE et al., 2006).

As proteínas são o principal constituinte na biomassa da maioria das espécies de microalgas verdes, seu conteúdo pode variar entre 40 a 60 % (de matéria seca). As proteínas de microalgas são consideradas de alto valor nutricional devido à qualidade da composição de aminoácidos e em termos de conteúdo de proteína (CHRONAKIS; MADSEN, 2011)(CHRONAKIS; MADSEN, 2011). O conteúdo de proteína celular pode ser manipulado por meio de mudanças na disponibilidade de nutrientes.

Os lipídeos de microalgas podem ser classificados como polares (glicolipídeos e fosfolipídeos) e neutros ou não polares (por exemplo, triacilgliceróis (TAGs), esteróis e ceras) (HUANG et al., 2001). Os lipídeos polares geralmente se acumulam em membranas estruturais, enquanto os TAGs são frequentemente depositados em forma de gotículas lipídicas. No entanto, ambos podem ser compostos por ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). Além disso, os TAGs geralmente têm altos níveis de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, enquanto os lipídios de membrana tendem a conter maiores teores de AGPI's (SCHÜLER et al., 2017).

A concentração de lipídeos em algumas espécies de microalgas pode alcançar valores de 40 % a 60 % da matéria seca (MAITY et al., 2014). Esses microrganismos são capazes de produzir altas concentrações de lipídeos, cuja estrutura fundamental é composta por ácidos graxos ou por outras estruturas. Na grande maioria das espécies de microalgas, os ácidos graxos correspondem à maior fração lipídica e, em algumas espécies, os AGPI's podem representar entre 25 % e 60 % dos lipídeos totais (DENER et al., 2006).

Ao contrário do que acontece com as proteínas, a concentração de lipídeos pode ser manipulada por diferentes estratégias nas condições de cultivo. A composição lipídica pode ser modulada, principalmente, para promover o aumento do teor de AGPI (CHEN et al., 2011; FENG et al., 2012)

2.4 Componentes bioativos presentes na fração lipídica das microalgas e suas aplicações

2.4.1 Ácidos graxos

O teor de ácidos graxos poli-insaturados em microalgas mostra-se especialmente dependente da espécie e das condições de cultivo, tais como a concentração de nutrientes do meio de cultura, o fluxo de aeração, a luminosidade, o tempo do fotoperíodo e a temperatura (THOMAS, TORNABENE; WEISSMAN, 1984).

Há relatos na literatura que as microalgas são fontes potenciais de ácidos graxos poli-insaturados economicamente valiosos (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; SAHU et al., 2013; SPOLAORE et al., 2006). Além disso, encontram mercado promissor no campo da biotecnologia, especialmente na indústria de alimentos funcionais (BERTOLDI et al. 2008), principalmente porque alguns desses ácidos não são sintetizados pelo organismo humano e, por tal razão, são considerados essenciais para a dieta humana (VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

Os principais ácidos graxos do tipo ômega 3 e ômega 6 sintetizados por microalgas são os ácidos: eicosapentaenoico (EPA C20:5n-3), α -linolênico (C18:3n-3) e docosahexaenoico (DHA C22:6n-3), linoleico (C18:2n-6) e o araquidônico (AA, C20:4n-6) (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014). Os ácidos graxos EPA e DHA (ômega 3) possuem um papel importante na regulação das funções biológicas e na prevenção e tratamento de várias doenças humanas, tais como doenças cardíacas e inflamatórias (QIAO et al., 2016).

A *Chlorella* é uma fonte potencial de AGPIs, especialmente ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 (ÖTLEŞ; PIRE, 2001; SAHU et al., 2013). Condições de cultivo com pouca luz, na presença ou não de nitrogênio, mostraram aumentar a síntese de EPA e DHA em microalgas (SCHÜLER et al., 2017). Na análise do conteúdo dos ácidos graxos da *Heterochlorella luteoviridis*, considerada a melhor condição de extração (75 mL de etanol/100 mL de água) e biomassa, destacou-se o ácido palmítico (C16:0) como o principal ácido graxo saturado (35 % do conteúdo total de ácidos graxos) e ácido linolênico (32 %), ácido α -linoleico (10 %), ácido esteárico (7 %) e ácido oleico (6 %) como os principais ácidos graxos poli-insaturados (JAESCHKE et al., 2016).

2.4.2 Carotenoides

Os carotenoides são compostos lipofílicos que apresentam coloração variando entre amarela, laranja e vermelha. Esses pigmentos são considerados os mais abundantes na natureza. Os carotenoides são divididos em dois grupos: carotenos e xantofilas (GONG and BASSI, 2016). Alguns carotenoides comuns em microalgas são mostrados na Figura 2.2.

Embora exista ampla diversidade de carotenoides, menos de 30 carotenoides desempenham papéis importantes na fotossíntese. A maioria desses está localizada nas membranas dos tilacóides e está ligada aos complexos de colheita de luz. Os carotenoides exercem a função de absorver a luz e suprimir o excesso de energia no metabolismo fotossintético. Alguns carotenoides primários, como a luteína, têm a função de pigmentos acessórios que podem transferir a energia absorvida para as clorofilas, expandindo portanto o espectro de absorção de luz de algas ou plantas (GONG and BASSI, 2016).

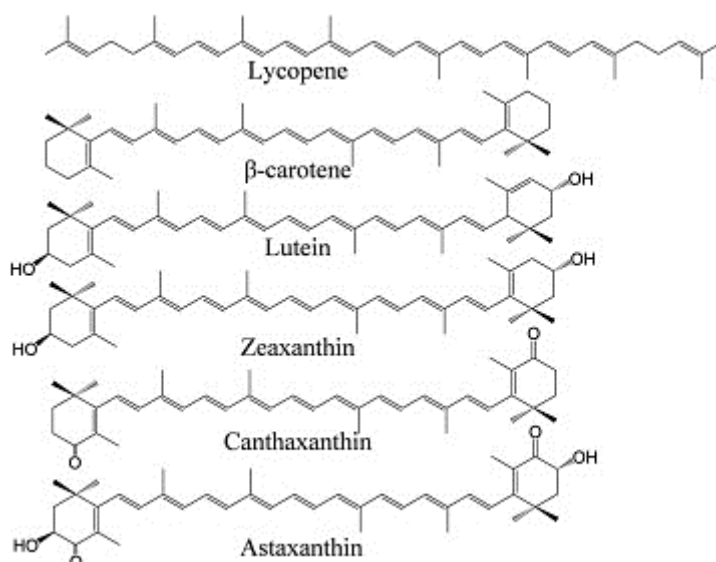


Figura 2 2. Estrutura de alguns carotenoides encontrados em microalgas (Bassi et al. 2016)

Os principais carotenoides encontrados nas espécies de microalgas são a luteína (SCHROEDER; JOHNSON, 1995), o β -caroteno (RODRIGUES et al., 2014) e a zeaxantina (VIEGAS et al., 2015). A luteína é encontrada exclusivamente nas microalgas pertencentes à divisão das *Chlorophytas* e algumas microalgas verdes (Dinophyta) (MULDERS et al., 2014a)

Os pigmentos luteína e a zeaxantina são conhecidos pelo papel que desempenham na manutenção da saúde ocular e na prevenção da doença de degeneração macular relacionada à idade (JIN et al., 2003). A luteína é utilizada como aditivo alimentar, com o objetivo de dar cor aos alimentos (LIN; LEE; CHANG, 2015).

O β -caroteno é o pigmento mais abundante presente nas espécies de microalgas e em plantas (DEL CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007; METTING; PYNE, 1986). Entre as microalgas, a *Dunaliella salina* é conhecida como sendo a principal fonte natural de β -caroteno (MULDERS et al., 2014b), podendo chegar a acumular até 12 % sobre a massa seca, dependendo das condições de cultivo (DEL CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007). Assim como outros carotenoides, o β -caroteno possui a capacidade de atuar como precursor da vitamina A, na qual é responsável pelo bom funcionamento imunológico. Além disso, desempenha função como antioxidante (RAPOSO et al., 2013).

2.5 Sistemas de cultivo de microalgas

As microalgas são facilmente cultivadas, sendo necessário apenas meio de cultura simples, com água do mar, fonte de nitrogênio, magnésio, fósforo, ferro e outros sais. Pode-se produzi-las em sistemas abertos ou fechados, com a combinação de condições de crescimento controladas, das quais depende a obtenção de diferentes tipos de produtos (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2013). A escolha do sistema a ser utilizado para cultivo de microalgas deve ser considerada para obtenção de um resultado economicamente viável. Fatores como a característica da microalga, o custo da terra e do trabalho, o gasto de energia, de água e de nutrientes e o tipo de produto final, são relevantes no alcance de resultados favoráveis (BOROWITZKA, 1999).

A produção comercial para obtenção de biomassa de microalgas pode ser realizada de forma autotrófica, mixotrófica ou heterotrófica, em lagoas abertas ou em sistemas fechados utilizando fotobiorreatores, conforme demonstrado na Figura 2.3 (MASOJÍDEK; TORZILLO, 2008).

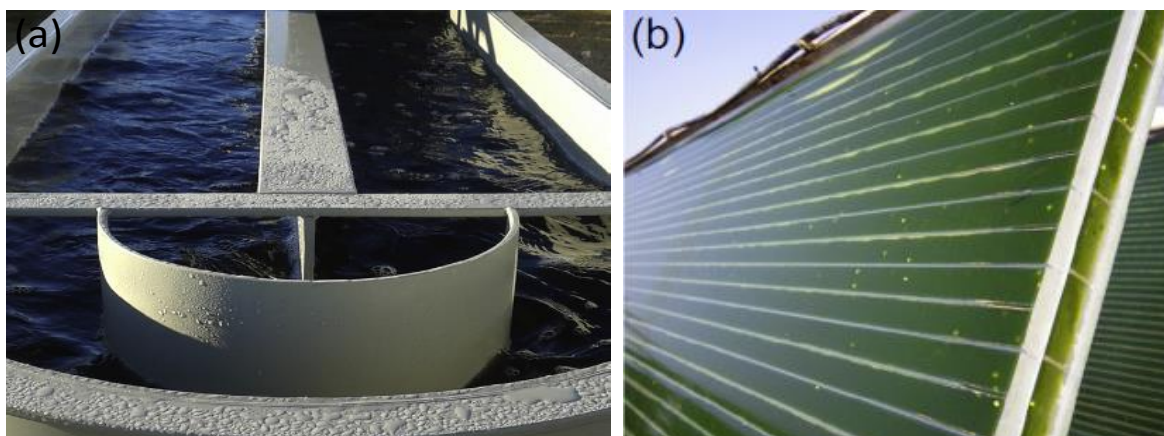


Figura 2.3. Exemplo de cultivo comercial de microalgas (a) lagoas *raceway* em pequena escala, (b) fotobiorreator de painel plano. Adaptado de (BARREIRA et al., 2015)

2.5.1 Sistema de cultivo aberto

Os principais sistemas abertos são lagoas naturais ou artificiais, de pista (*raceway*) e de cascata (MASOJÍDEK; TORZILLO, 2008).

O sistema aberto tipo lagoa *raceway* é utilizado desde a década 1950. Tal lagoa é constituída de canais de recirculação de circuito fechado com cerca de 30 cm de profundidade. Esse tipo de sistema funciona da seguinte forma: os canais são construídos em cima do solo

compactado e revestido por lona branca; a circulação e a mistura da biomassa são realizadas com auxílio de pás; a alimentação é diária sempre no início do fluxo e a colheita de biomassa é feita sempre no final do circuito.

O sistema aberto possui algumas desvantagens quando comparado com sistemas fechados tais como dificuldade de resfriamento, controle de temperatura devido ao ciclo noturno e diurno, perda de água por evaporação, a captura de CO₂ é relativamente baixa, há possibilidade de contaminação por outras algas ou microrganismos, e, com isso, a produtividade é afetada, o que resulta em baixo rendimento de biomassa (CHISTI, 2007). Razão que explica porque fotobiorreatores fechados tem maior aplicação, em especial quando se relaciona ao volume final de produção de biomassa (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2007).

2.5.2 Sistemas de cultivo fechados

Fotobiorreatores são projetados com o objetivo final de reduzir custos e alcançar maior produtividade na produção de biomassa, para tanto aspectos como modelagem do biorreator e o controle de parâmetros que influenciam no crescimento como pH, temperatura e difusão do gás são levados em consideração (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Além disso, manutenção do meio de cultivo e a distribuição da luz são fatores essenciais que também devem ser estudados em projetos de fotobiorreatores para produção de microalgas (ERIKSEN, 2008).

Sistemas fechados possuem vantagens sobre os sistemas abertos, tais como facilidade nos controles de pH, da intensidade de luz, da temperatura e da concentração de CO₂. Devido essas vantagens é possível a obtenção de alto rendimento de biomassa e, conseqüentemente, o aumento de compostos de interesse de indústrias farmacêutica e nutracêutica (SAFI et al., 2014).

Dentre os tipos de fotobiorreatores fechados usados na cultura da *Chlorella* e relatados em pesquisas de laboratório estão: fotobiorreator de placa plana (DEGEN et al., 2001), fotobiorreator de coluna vertical tipo *airlift* (JAMES; AL-KHARS, 1990), fotobiorreator tubular (LEE, 2001). Os reatores tubulares, tidos como adequados para o cultivo ao ar livre, possuem as vantagens de ser mais baratos e ter uma grande área de superfície de iluminação, o que gera alta produtividade de biomassa (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Porém, possuem limitações como, por exemplo, dependendo do comprimento dos tubos pode acumular CO₂ e gerar variações de pH (BRENNAN; OWENDE, 2010; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

O fotobiorreator de placa plana, vertical ou inclinado, é construído de materiais transparentes e com poucos milímetros de espessura, o que proporciona a máxima captura da luz (BRENNAN; OWENDE, 2010). Tais tipos são empregados para cultivo de microalgas em grande escala, em sistemas de cultivo internos e externos, devido às vantagens, como grandes áreas que recebem grande quantidade de iluminação e diminuição do acúmulo de oxigênio dissolvido em comparação com fotobiorreatores tubulares horizontais (XU et al., 2009). Dentre as limitações do fotobiorreator de placa plana, citam-se: dificuldade de controlar a temperatura da cultura, crescimento nas paredes e probabilidade de estresse em algumas cepas de algas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Dentre os fotobiorreatores, o tipo *airlift* se destaca pelo seu potencial para bioprocessos industriais, devido ao seu baixo nível de cisalhamento hidrodinâmico, elevada transferência de massa, distribuição homogênea e com potencial de redução da fotoinibição e fotooxidação (VUNJAK-NOVAKOVIC et al., 2005; WU; MERCHUK, 2004), além de apresentar alta eficiência na mistura, a qual permite excelente exposição das células à radiação da luz (WANG; LAN; HORSMAN, 2012) e outros benefícios como, por exemplo, baixo custo, facilidade de operação e de limpeza (WANG; LAN; HORSMAN, 2012; XU et al., 2009).

Normalmente, o modelo do tipo *airlift* é composto por uma coluna transparente com uma coluna interna e um sistema de borbulhamento de ar. O sistema de aeração é colocado dentro da coluna interna na parte inferior, sendo que a desgaseificação ocorre na parte superior da coluna (Figura 2.4) (LI et al., 2008).

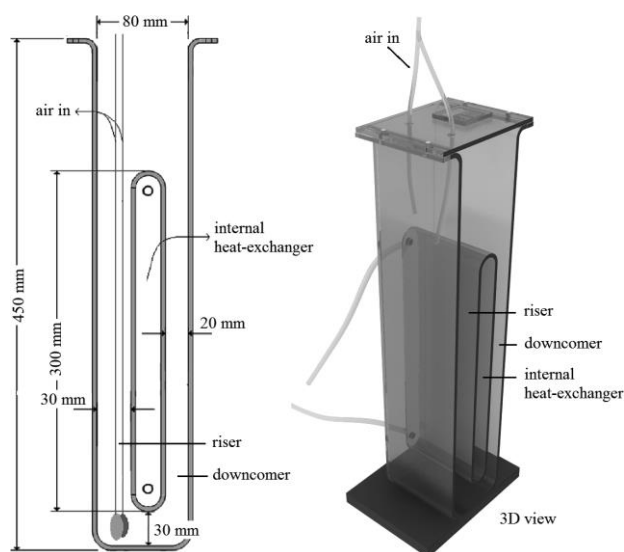


Figura 2.4. Fotobiorreator tipo *airlift* com trocador de calor interno desenvolvido por Kochem et al. (2013)

2.6 Modo de operação de cultivo em batelada, batelada repetida e contínuo

As condições operacionais do fotobiorreator desempenham um papel fundamental na produtividade de biomassa de microalgas (XIE et al., 2014). Os modos de operação comumente empregados na condução dos cultivos de microalgas são: descontínuo (batelada), semi-contínuo (batelada repetida), descontínuo alimentada (batelada alimentada) e contínuo (LOURENÇO, 2006).

A maioria dos cultivos de microalgas atuais é baseado em sistemas de operação por batelada, devido à simplicidade de operação e pouca necessidade de manutenção (GEADA et al., 2017). No processo de batelada, antes do início do cultivo, todos os nutrientes (exceto a fonte de carbono em cultivos autotróficos) necessários para o crescimento e a formação do produto desejado estão no meio de cultura. O processo inicia-se com adição do meio de cultura e o inóculo de microalgas, no andamento do processo não há adição de nutrientes (exceção já mencionada) e são realizados controles, como de aeração, de pH e da adição de antiespumantes (SCHMIDELL; AQUARONE ; BORZANI, 2001). Durante o cultivo em batelada, o crescimento cessa devido à limitação do substrato e ou acumulação de produtos inibidores do crescimento. No processo em batelada, a contínua mudança no ambiente de cultivo e também o envelhecimento celular podem ocasionar variação na composição celular como consequência, flutuações na produtividade durante o período de cultivo (GEADA et al., 2017).

Cultivos em modo de operação batelada repetida são utilizados alternativamente para a produção de microalgas. O processo de batelada repetida é iniciado conforme o sistema de operação em batelada, o biorreator é preenchido com meio de cultura e inóculo. Ao final de um determinado período que pode ser definido, por exemplo, pela concentração de corte, um volume específico de cultivo é removido e substituído por um volume igual de meio de cultura fresco. O volume de meio de cultivo mantido no reator serve como inóculo inicial. O cultivo em batelada repetida possibilita regular a taxa de alimentação de nutrientes e consequentemente otimizar a produtividade de biomassa (RADMANN; REINEHR; COSTA, 2007).

O cultivo contínuo de microalgas possui vantagens amplamente descritas na literatura, tais como: obtenção de maiores produtividades volumétricas, requer menor espaço, investimento e redução de períodos sem produção. Cultivos contínuos são caracterizados pela alimentação contínua de meio de cultivo fresco e a remoção contínua do meio de cultivo, o volume do meio de cultivo dentro do reator é mantido inalterado. Esse sistema permite um

cultivo constante que mantém as células, após algumas gerações, em um estado de crescimento equilibrado ou estado estacionário (GEADA et al., 2017)

2.7 Fatores essenciais no cultivo de microalgas

A disponibilidade de nutrientes à microalga é essencial para conseguir uma fotossíntese ideal. A falta de nutrientes pode ocasionar distúrbios no metabolismo e a produção desordenada de produtos intermediários da fotossíntese (PULZ, 2008). As microalgas fotoautotróficas têm capacidade de detectar mudanças na intensidade de luz, temperatura e disponibilidade de nutrientes e água, através da percepção da energia produzida pela modulação do transporte de elétrons na fotossíntese. A manutenção da energia celular necessária para manter o equilíbrio metabólico é fundamental para o crescimento e sobrevivência de todas as células vivas (HUNER et al., 2002).

2.7.1 Luminosidade

A luz é a principal fonte de energia para o metabolismo fotoautotrófico, sendo um fator limitante para a fotobiotecnologia. As microalgas, entre elas a *Chlorella*, são capazes de converter energia luminosa em energia química por meio da fotossíntese (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; PATIÑO; JANSSEN; VON STOCKAR, 2007).

As reações fotoquímicas da fotossíntese ocorrem no aparato fotossintético [fotossistema I (FSI) e fotossistema II (FSII)]. Esses fotossistemas, também chamados de centros de reações, são presentes em membranas de organismos fotossintéticos aeróbios. Os FSI e FSII são dois sistemas complexos, formados por inúmeras proteínas contendo os pigmentos necessários para colheita de fótons. Ambos os sistemas são organizados em uma membrana, composta de um núcleo que possui o centro de reação fotoquímica onde o transporte de elétrons é iniciado, e de um sistema de antenas que proporciona elevada captação de luz e regulação do processo fotossintético.

Microrganismos fotossintetizantes geralmente absorvem luz na faixa de espectro entre 400 e 700 nm, chamada de radiação fotossinteticamente ativa (PAR do inglês *Photosynthetically Active Radiation*) e nessa faixa que se inicia uma série de reações fotoquímicas da fotossíntese (BLANKENSHIP, 2002). Os FSII e FSI possuem diferentes espectros de absorção, por isso diferenças na intensidade luminosa geram rapidamente ajustes de absorção nos dois sistemas (GALKA et al., 2012).

A iluminação é um dos fatores mais importantes que controlam o crescimento da célula dentro de um fotobiorreator (WU; MERCHUK, 2004), bem como é imprescindível para indução da carotenogênese (DEL CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007). No ambiente natural, microrganismos fotossintéticos e plantas superiores são frequentemente submetidos a mudanças no fluxo de fótons, que provocam a saturação da cadeia linear de transferência de elétrons, dessa forma a luz absorvida pelos fotossistemas não é suficientemente convertida (CAFFARRI et al., 2014), sendo dissipada em espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}). Ainda que as ERO tenham a função de sinalizadores em espécies fotossintéticas, a produção em excesso pode saturar as defesas antioxidantes, causando danos oxidativos ao aparelho fotossintético (ROACH; KRIEGER-LISZKAY, 2014). Este processo é chamado de fotoinibição.

A fotoinibição é um processo complexo causado por diferentes mecanismos que envolvem aceptores e receptores de elétrons no centro de reação, como os pigmentos antenas (CAFFARRI et al., 2014). A *Chlorella* tem a fotossíntese saturada a partir de intensidade de luz na ordem de $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (KUMAR; DASGUPTA; DAS, 2014). Fatores como controle de pH, incidência luminosa e fornecimento de CO_2 podem contribuir para o controle fotooxidativo em microalgas.

Na produção de microalgas em fotobiorreatores fechados, o controle da iluminação é o parâmetro mais crítico até porque, ao operar em tempo integral, há elevado consumo de energia elétrica, o que gera maior custo de produção (KOC et al., 2010).

Atualmente, a iluminação de estado sólido que explora o uso de diodos emissores de luz (*LED*, do inglês *Light Emitting Diode*) é considerada, potencialmente, como um dos maiores avanços em termos de tecnologia de iluminação. Variadas funções podem ser desempenhadas pelos sistemas *LED*, incluindo-se o emprego em pesquisa de ambiente controlado, iluminação para diferentes tipos de culturas vegetais, iluminação suplementar e de fotoperíodo para estufas e laboratórios (MORROW, 2008).

Os sistemas *LED*, por serem dispositivos de estado sólido, representam a primeira fonte de luz artificial com capacidade de controlar a composição espectral. Além disso, são facilmente integrados aos sistemas de controle digital, o que auxilia organização e manejo de programas de iluminação especiais, sendo mais seguros de operar do que com os sistemas das lâmpadas fluorescentes ou de vapor de mercúrio, porque não contêm mercúrio e não possuem

envelopes de vidro ou altas temperaturas de contato (MORROW, 2008, BARATA, 2016). À medida que evoluem, os dispositivos *chip-on-board* de *LED* multicoloridos de alta densidade têm custo reduzido, o que permite que os sistemas *LED* se tornem viáveis economicamente (MORROW, 2008).

As fontes de luz nos sistemas *LED* são adequadas para uso em fotobiorreatores. No entanto, o requerimento de PAR de microalgas, parâmetro importante porque afeta a produção de microalgas, deve ser ponderado no momento da elaboração e implantação do projeto de sistemas de iluminação *LED* em fotobiorreatores (KOÇ et al., 2010).

As luzes dos sistemas *LED* têm bandas de comprimento de onda relativamente estreitas, o que lhes permite produzir um comprimento de onda mais específico e com isso proporcionar significativos benefícios na produção de microalgas, especialmente no cultivo em ambiente de iluminação controlada (KOÇ et al., 2010).

Os sistemas *LED* têm potencial de redução do estresse causado pela luz excessiva nos organismos vivos (KOÇ et al., 2010). Além disso, mostram vantagens sobre outras fontes luminosas empregadas na iluminação artificial porque têm alta eficiência, baixo consumo de energia e longa vida útil (KOÇ et al., 2010). Sistemas *LED* de luz vermelha e branca se mostram eficazes para o crescimento de microalgas. Maiores intensidades de luz resultaram em crescimento celular significativamente maior (TANG et al., 2011), porém a luz *LED* vermelha se revela mais eficiente no ganho de peso das células e a luz *LED* azul produz células maiores do que as outras fontes de luz (KOÇ et al., 2010).

2.7.2 Temperatura

A temperatura é, depois da iluminação, considerada um dos fatores essenciais para o desenvolvimento e crescimento das microalgas tanto em sistemas abertos quanto fechados (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Os organismos fotossintéticos procuram manter o equilíbrio do sistema fotossintetizante frente às condições ambientais adversas. O crescimento de organismos fotossintéticos fora da sua faixa ótima de temperatura pode gerar alterações no mecanismo fotossintético. Entre essas alterações, é possível que haja mudança na captação de luz para diminuição da luz absorvida, aumento da taxa do ciclo de transporte de elétrons, aumento na taxa de fotorrespiração e na taxa de fixação do CO₂ (MAXWELL et al., 1994).

As alterações na temperatura exercem influência no perfil de ácidos graxos. Quando a temperatura está abaixo daquela considerada temperatura ótima de crescimento, os ácidos graxos poli-insaturados são metabolizados, mas quando a temperatura está acima do ponto ótimo essa alteração bioquímica não ocorre (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Várias microalgas podem suportar variações de temperatura inferior a 15 °C em relação a sua temperatura ótima de crescimento. Mas não suportam temperaturas entre 2 °C a 4 °C e acima da sua temperatura ótima de crescimento, podendo resultar na perda total do cultivo (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Kim et al. (2017) relataram que a microalga *Heteroclorella luteoviridis* foi capaz de tolerar as temperaturas variando entre 10 °C a 25 °C, quando cultivada sob baixa intensidade luminosa ($40 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$) e ciclo claro escuro (16:8 h).

2.7.3 Nitrogênio

Os nutrientes são imprescindíveis à duplicação de microalgas, e são eles os que mais oneram a produção em grande escala, envolvendo recursos naturais e uso de energia. Dessa forma é necessário otimizar os nutrientes indispensáveis para o cultivo das microalgas, diminuindo assim, os custos de produção (BLAIR; KOKABIAN; GUDE, 2014).

O nitrogênio, depois do carbono, é um nutriente essencial para o crescimento de biomassa de microalgas, e pode representar entre 1 % e 10 % da massa seca (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Formas de nitrogênio orgânico possivelmente são encontradas em diversas substâncias biológicas tais como peptídeos, proteínas, enzimas, clorofilas, moléculas de transferência de energia (ADP, ATP), entre outras (RAMANNA et al., 2014).

As microalgas são capazes de utilizar diferentes fontes de nitrogênio, principalmente íon amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) e ureia $[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]$, como também extrato de levedura, peptona, aminoácidos (PEREZ-GARCIA et al., 2011). No entanto, o nitrato é a forma dominante de nitrogênio disponível para a maioria dos organismos fotossintetizantes (YANG; HUA; SHIMIZU, 2000).

A assimilação do nitrato realizada pelas algas eucarióticas pode ser dividida em etapas: primeiramente, o nitrato é reduzido a nitrito pela enzima nitrato redutase utilizando a forma reduzida de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH) para transferência de elétrons, em seguida o nitrito é reduzido a amônia pelo nitrito redutase utilizando ferredoxina (Fd) como doador de elétrons. Por fim, o nitrogênio na forma de amônia é utilizado na síntese de L-

glutamina pela ação da glutamina sintetase (GS) e trifosfato de adenosina como demonstrado na Figura 2.5 (CAI; PARK; LI, 2013).

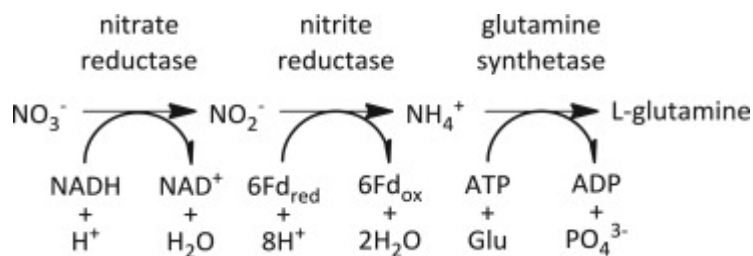


Figura 2.5. Diagrama resumido da assimilação do nitrogênio inorgânico (Cai; Park; Li, 2013).

Algumas microalgas apresentam tendência maior na utilização de amônio para obtenção do nitrogênio orgânico (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Essa preferência durante a assimilação do nitrogênio inorgânico ocorre porque a reação de óxido-redução não é necessária, pois dessa forma necessita de menos de energia (CAI; PARK; LI, 2013). Porém, há relatos da diminuição do crescimento e, como consequência, redução no rendimento da biomassa em cultivos de microalgas que utilizam sais de amônia como fonte de nitrogênio sem controle de pH (CHOUL-GYUN, 2002; SHI; ZHANG; CHEN, 2000).

A utilização de sais de amônio necessita de maiores cuidados durante o cultivo de microalgas do que em cultivos que utilizam sais de nitrato como fonte de nitrogênio (BOROWITZKA; MOHEIMANI, 2010). Além disso, o nitrato é dominante em ambientes aquáticos oxidados por ser altamente oxidado e estável. Não obstante, o nitrato é considerado essencial para microalgas, porque sua presença provoca aumento da atividade da enzima nitrato redutase (CAI; PARK; LI, 2013). A nitrato redutase desempenha papel fundamental no controle da via de assimilação do nitrato (HUBER et al., 1992).

O nitrato tem sido utilizado comumente em meios de cultivo como fonte de nitrogênio para *Chlorella*. A comparação entre amônio e nitrato como fonte de nitrogênio para *Chlorella* indica que o nitrato proporciona melhor indução na síntese proteínicas e no crescimento celular (SHI; ZHANG; CHEN, 2000). Na comparação com biomassa formada durante o cultivo com limitação de nitrogênio, foi obtida concentração de biomassa de *Chlorella zofingiensis* aproximadamente 81 % maior em cultivo com maior fornecimento de nitrogênio (ZHU et al., 2014).

A necessidade interna de nitrogênio pelas microalgas marinhas ocasiona limitação de nitrogênio quando este nutriente não é fornecido, o que gera diminuição na atividade de

fotossíntese e, como consequência a redução no fornecimento de energia devida à diminuição das clorofilas e aumento dos carotenoides (RAVEN, 1981). Além disso, a limitação de nitrogênio atinge diretamente a síntese de proteínas, localizadas nos centros de reações FSI, que se expressa como resposta comum ao estresse da limitação de nitrogênio em organismos fotossintéticos (BERGES et al., 1996).

O estresse causado pela limitação de nitrogênio é utilizado favoravelmente para produção de lipídeos (CONVERTI et al., 2009; MUJTABA et al., 2012; SINGH et al., 2014; YEH; CHANG, 2012). A falta de nitrogênio afeta a composição celular como o conteúdo de lipídeos e a composição dos ácidos graxos (RAMANNA et al., 2014), sendo eficaz na indução ao acúmulo de lipídeos no interior das células de microalgas (SINGH et al., 2014).

2.7.4 Carbono

As microalgas têm, em sua maioria, a capacidade de crescer tanto em condições autotróficos quanto heterotróficos ou, ainda, algumas espécies tem a capacidade de combinar a fotossíntese com degradação de compostos orgânicos, cujo modelo é chamado de mixotrófico (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2014).

Os organismos heterotróficos não necessitam de luz para fixação de carbono (LIANG; SARKANY; CUI, 2009), pois utilizam somente compostos orgânicos dissolvidos no meio de cultivo como fonte de carbono para o crescimento (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2014; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Geralmente, as fontes de carbono orgânico utilizadas são açúcares e ácidos orgânicos (LIANG; SARKANY; CUI, 2009).

Espécies de *Chlorella* demonstraram eficiência na formação de biomassa quando foram cultivadas heterotroficamente no escuro utilizando glicose como fonte de carbono (KIM et al., 2013; LI et al., 2015). Outras fontes de carbono orgânico como acetato (LIANG; SARKANY; CUI, 2009) e o glicerol (LIANG; SARKANY; CUI, 2009; O'GRADY; MORGAN, 2010) foram relatadas em cultivos heterotróficos de *Chlorella*. Embora haja aumento na produção de biomassa e de lipídeos em cultivos heterotróficos, essa condição apresenta algumas desvantagens como o elevado custo da glicose, que encarece a produção de biomassa de microalgas (PEREZ-GARCIA et al., 2011; TURON et al., 2014), bem como há limitação de espécies de microalgas capazes de crescer em condições heterotróficas, possibilidade de contaminação com outros microrganismos (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

No crescimento autotrófico, as algas utilizam o CO_2 (carbono inorgânico) como sua única fonte de carbono e a luz como fonte de energia para gerar energia química necessária à manutenção e crescimento celular por meio da fotossíntese (CHEN et al., 2011a; CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2014). As formas de carbono inorgânico dissolvido existentes em meio aquoso são CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-} e H_2CO_3 . Porém, apenas as formas de CO_2 e HCO_3^- são usadas pelas microalgas (ZHAO; SU, 2014).

A reação empírica da fotossíntese de microrganismos fotoautotrófico é exemplificada na Equação 2.1, a seguir (HO et al., 2014; ZHAO; SU, 2014):



As reações de fixação de CO_2 ocorrem através do Ciclo de Calvin-Benson, independente de luz (HO et al., 2014; ZHAO; SU, 2014). Nessa etapa da fotossíntese de microalgas e cianobactérias, o fluxo de assimilação de carbono inorgânico ocorre por meio da entrada direta de CO_2 através da membrana plasmática via transporte ativo. Há evidências também do transporte do íon bicarbonato pela membrana plasmática, porém o fluxo é menor, quando comparado ao do CO_2 . Tanto o CO_2 como o HCO_3^- são transportados para os cloroplastos. Ao entrar nos cloroplastos, o CO_2 é rapidamente convertido no íon bicarbonato, acumulando-se nos estromas alcalinos. O HCO_3^- acumulado é novamente convertido a CO_2 pela anidrase carbônica (SPALDING, 2008). Na Figura 2.6 está representado o esquema da fotossíntese junto a assimilação do carbono inorgânico.

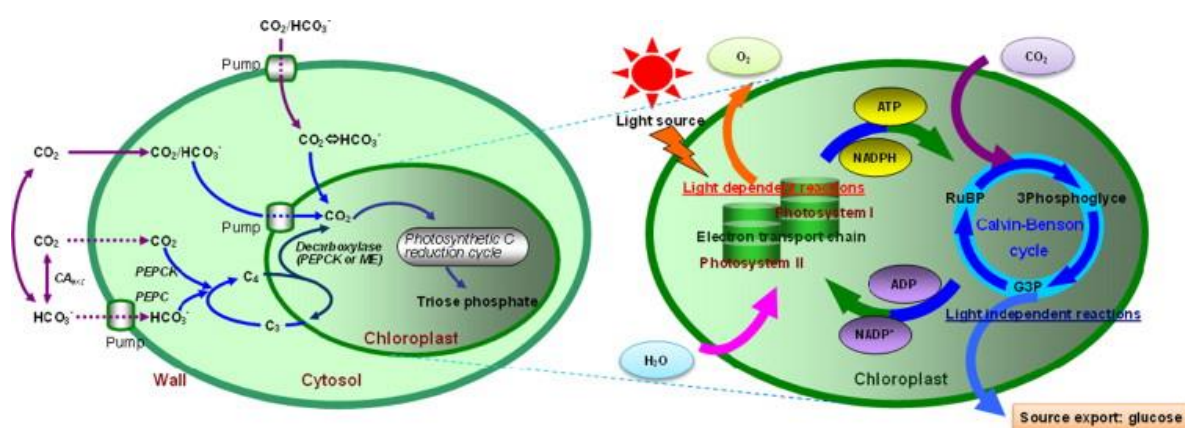


Figura 2.6. Esquema da fixação de CO_2 em microalgas e resumo da fotossíntese (à direita) (ZHAO; SU, 2014)

O nível elevado de CO₂ em cultivos autotróficos de microalgas favorece a eficiência fotossintética e, como consequência, a biomassa é produzida em menor tempo (CHEAH et al., 2015; SCOTT et al., 2010). Diferentes concentrações de CO₂ (2 %; 5 %; 10 %; 15 %) misturadas com ar a 0,25 v v m⁻¹ (volume de ar injetado no meio de cultura pelo volume do meio de cultura por minuto) foram testadas no cultivo *Chlorella* sp. Nesse experimento, os autores observaram 68 % de aumento na concentração de biomassa no cultivo que utilizou 2 % de CO₂, na comparação com o cultivo que utilizou somente ar. Esse resultado confirma que o aumento da disponibilidade de carbono no meio de cultivo eleva a concentração da biomassa. No entanto, em concentrações superiores a 5 % de CO₂, o crescimento celular foi quase totalmente inibido (CHIU et al., 2008). Por outro lado, a microalga *Chlorella* PY-ZU1 foi capaz de crescer em 15 % (v/v) de CO₂, sob 6 klx de iluminação (CHENG et al., 2013).

Diversas microalgas possuem capacidade de adaptação aos parâmetros de cultivo, porém alterações nas condições de cultivo determinam a eficiência da fixação de CO₂ para produção de biomassa (CHEAH et al., 2015). Em culturas fotoautotróficas, as diferenças entre espécies de microalgas (ZHAO; SU, 2014), a luz e a densidade das células influenciam expressivamente na taxa de fixação de CO₂ e na produção de biomassa (CHENG et al., 2013; CHIU et al., 2008).

O crescimento fotoautotrófico em microalga é comumente utilizado para cultivo de microalgas porque todas as suas espécies são fotossintéticas (CHEN et al., 2011a; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Além disso, esse sistema de cultivo tem contribuído expressivamente para o ciclo global do carbono, através da fixação biológica de CO₂ (YEN et al., 2013).

2.7.5 Fixação biológica de CO₂ por microalgas

O grande potencial econômico dos países desenvolvidos conduz ao emprego extensivo de energia e, por sua vez, mais resíduos são produzidos que podem levar a problemas ambientais (SAIDI; HAMMAMI, 2015). O CO₂ é fortemente relacionado como um dos gases causadores do efeito estufa (SAIDI; HAMMAMI, 2015; SHAFIEI; SALIM, 2014).

A maioria das fontes de emissão de CO₂ é provinda do consumo de combustíveis fósseis. Segundo *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC), em 2013, as emissões globais de dióxido de carbono provenientes da queima de combustíveis fósseis atingiram 36,1 bilhões de toneladas, 2,3 % a mais quando comparado com 2012. No Brasil, as emissões de carbono no ano de 2011 atingiram o equivalente a mais de 488 milhões de toneladas de CO_{2eq}.

grande parte desse número vem do uso da terra e florestas, da agropecuária e da produção de energia. Os processos da economia nacional que menos emitem CO₂ atmosférico, comparados com os demais, são os setores industriais e o tratamento de resíduos (MCTI, 2014).

Embora o CO₂ seja considerado um dos gases causadores do aquecimento global, esse gás é fundamental à sobrevivência de organismos autotróficos (CHEAH et al., 2015). O CO₂ provindo da atmosfera e da combustão de gases gerado pela intensa atividade humana é transformado em biomassa e outros metabólitos por algas e plantas através da fotossíntese e do Ciclo de Calvin (YEN et al., 2013). Contudo, a capacidade de fixação de CO₂ pelas algas é muito mais eficiente e na ordem de 10 a 50 vezes maior do que as plantas terrestres (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2014; YEN et al., 2013). Dessa forma, o cultivo de algas foi considerado um processo comercialmente viável para mitigação de CO₂, (ČERVENÝ et al., 2009; YEN et al., 2013).

Sistemas de cultivo de microalgas que utilizam o CO₂ são considerados sistemas mais rentáveis e ambientalmente sustentáveis quando comparado com sistemas de produção de plantas convencionais. Aproximadamente metade da massa seca de biomassa de microalgas é composta por carbono derivado a partir do CO₂, sendo que o crescimento de duas toneladas dessa biomassa representa consumo de uma tonelada de CO₂ (XU; ISOM; HANNA, 2010).

O cultivo de microalgas em sistemas abertos permite a absorção do CO₂ do ambiente. Contudo, a concentração de CO₂ do ar atmosférico, cerca de 0,03 % a 0,06 %, é limitante à fotossíntese. O uso de fotobiorreatores para crescimento fotoautotrófico de microalgas é uma escolha para aumentar a eficiência de captura do CO₂, visto que a dissolução e retenção do CO₂ é maior do que em sistema aberto (YEH; CHANG, 2011). Não obstante, diversas fontes de CO₂ (abrangendo o CO₂ atmosférico, gases residuais de processos industriais e sais como o carbonato solúvel) podem ser utilizadas de maneira eficiente pelas microalgas a fim de aumentar a produção de biomassa (WANG et al., 2008).

Espécies de microalgas como *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. e *Arthrospira* sp. são identificadas pela sua boa capacidade em biofixação do CO₂, relacionada com elevada taxa de crescimento, boa tolerância a diversos fatores ambientais e pela sua composição química. A *Chlorella* sp. é relatada como boa fixadora de CO₂ independente das condições de cultivo, quer seja lagoa aberta ou fotobiorreator (CHEAH et al., 2015).

2.7.6 Fontes alternativas de CO₂ biológico para cultivo de microalgas

As fontes de carbono inorgânico que são frequentemente utilizadas no cultivo de microalgas incluem: CO₂ atmosférico, CO₂ provindo de efluentes gasosos industriais e CO₂ fixado obtido de carbonatos solúveis, como NaHCO₃ e Na₂CO₃ (KUMAR et al., 2010). O CO₂ puro também pode ser utilizado no cultivo de microalgas, porém encarece a produção, e, na maioria das vezes é impraticável na produção industrial (SUN et al., 2015).

Alternativas pesquisadas para baratear os custos de produção das microalgas são inúmeras, dentre elas a utilização de fontes de carbono de emissões gases de combustão (ZHAO; SU, 2014), a utilização de CO₂ proveniente da fermentação alcoólica da produção de etanol, usando como matéria prima o melaço de cana de açúcar (FERREIRA et al., 2012; XU; ISOM; HANNA, 2010), como também o uso de CO₂ gerado pela fabricação de bebidas fermentadas, como a cerveja (CHAGAS et al., 2015) e o vinho.

A produção mundial de vinhos em 2017 foi de 246,7 milhões de hectolitros (AGÊNCIA FRANCE-PRESSE, 2017). O Estado do Rio Grande do Sul concentra a maior produção de vinho do país. No ano de 2017, foi produzido o equivalente a 485 milhões de litros entre vinhos especiais e vinhos de mesa, o que representa 90% do total da produção nacional (AGÊNCIA ESTADO, 2018). Diante desses quantitativos e da preocupação da indústria com os impactos ambientais gerados pela produção vinícola (CHRIST; BURRITT, 2013), a mitigação de CO₂ durante a fase industrial de fabricação de vinho pode ser uma alternativa viável para a redução das emissões de CO₂ atmosféricos (BOSCO et al., 2011).

O vinho é a bebida resultante da fermentação alcoólica completa ou parcial da uva fresca. Na fase de fermentação alcoólica, uma das etapas principais na fabricação de vinho, ocorre o processo de conversão dos açúcares naturais da uva em álcool e dióxido de carbono que são produzidos pelas leveduras (SMYTH; RUSSELL, 2009). Durante a fermentação alcoólica, a produção de etanol está relacionada com a produção de CO₂, exatamente porque a produção de CO₂ é equivalente à produção de etanol: 0,96 gramas de CO₂ por grama de etanol (FERREIRA et al., 2012). Considerando que o total da produção de vinho no Estado do Rio Grande do Sul foi de 485 milhões em 2017, e que o teor alcoólico do vinho é em média 12 % de volume, estima-se que a produção de CO₂ provindo da fermentação alcoólica de vinho, no Brasil, foi de 44 milhões de quilogramas de CO_{2eq} por ano. Portanto, o CO₂ biológico oriundo da fermentação alcoólica, principalmente o gerado na viticultura sobre o qual há poucos relatos de seu reaproveitamento, torna-se fonte promissora de carbono inorgânico, que pode ser

reaproveitado no cultivo de microalgas, gerando compostos de alto valor comercial e ambientalmente sustentável.

2.8 Modelagem matemática para sistemas de cultivo

A modelagem matemática e a simulação preditiva têm por objetivo prever o comportamento dinâmico e estacionário do processo em foco (em condições testadas ou não), com a finalidade de possibilitar a determinação das condições operacionais economicamente ótimas do sistema, auxiliar no projeto e ajuste de algoritmos de controle adotado no modelo matemático formulado (SCHMIDELL, AQUARONE, BORZANI, 2001).

No cultivo de microalgas, a modelagem matemática também é utilizada na predição e controle das complexas interações entre fatores biológicos da espécie cultivada e fatores físico-químicos relativos às condições de cultivo. Na literatura se encontram modelos preditivos de crescimento de microalgas e síntese de bioprodutos, desenvolvidos para diversas espécies de microalgas sob diferentes condições de crescimento (YANG ET AL., 2017), que se mostram adequados para avaliação dos efeitos de parâmetros como salinidade, temperatura, iluminação e consumo de nitrogênio e para controle e otimização da produção comercial de culturas em fotobiorreatores (YUAN et al., 2014).

Os modelos cinéticos de Monod (1949), Droop (1968) e logístico (VERHULST, 1838) são os mais discutidos e usados para descrever o crescimento de algas em resposta à concentração de substrato (ADESANYA, et al. 2014).

O modelo preditivo de Monod (1949) partiu do pressuposto que o nutriente é consumido e instantaneamente transformado em biomassa (VATCHEVA et al., 2006). Na fórmula de Monod, a velocidade de crescimento (μ) é associada principalmente à concentração de um único substrato limitante do crescimento, através da constante de saturação do substrato (k_s) e taxa de crescimento máxima específica (μ_{max}) (He et al. 2016). As equações que compõem o modelo de Monod são descritas na Tabela 2.1, onde S é a concentração do substrato limitante, ρ é a velocidade de absorção de nutriente e Y é o rendimento da biomassa celular em relação ao consumo do substrato (VATCHEVA et al., 2006).

Tabela 2.1. Modelos matemáticos

Modelos	Crescimento celular (X)	Substrato (S)	Cota intracelular (q)	Referência
Droop	$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$ (2.1) $\mu = \mu_m \cdot \left(1 - \frac{k_q}{q}\right)$ (2.2)	$\frac{dS}{dt} = -\rho \cdot X$ (2.3) $\rho = \rho_{max} \cdot \left(\frac{S}{S + k_S}\right)$ (2.4)	$\frac{dq}{dt} = \rho - \mu \cdot q$ (2.5)	DROOP (1968)
Monod	$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$ (2.1) $\mu = \mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{S + k_S}\right)$ (2.7)	$\frac{dS}{dt} = -\rho \cdot X$ (2.8) $\rho = \left(\frac{1}{Y}\right) \cdot \mu$ (2.9)		MONOD (1949)
Logístico	$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$ (2.1) $\mu = \mu_m \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)$ (2.10)			VERHULST (1838)

Caracterizado como modelo simples, pois considera apenas o efeito gerado pela limitação pelo substrato, para se adequar à finalidade de múltiplos processos e descrever a velocidade de crescimento celular, o modelo original de Monod (1949) é constantemente adaptado. A limitação do crescimento celular pela quantidade de biomassa consiste em um exemplo de ampliação realizada no modelo original. Na prática, essa ampliação é muito comum, especialmente em processos regidos por regime batelada (VATCHEVA et al., 2006).

O modelo clássico proposto por Droop é comumente usado para descrever a dinâmica de crescimento de algas e consumo de nitrogênio (BERNARD, 2011; ZHOU et al., 2014). O modelo de Droop (Equações 2.1 a 2.5) caracteriza-se por desassociar a taxa de crescimento específico (μ) da concentração externa do substrato limitante (S) através da introdução da cota intracelular do substrato limitante (q), além desses parâmetros, as equações são compostas pela cota celular mínima (k_q) e a taxa máxima de absorção de nutrientes (ρ_{max}) (VATCHEVA et al. 2006). O modelo de Droop possui limitações para descrever culturas fotolimitadas, devido a não considerar o efeito da luz sobre a taxa de crescimento (BERNARD et al. 2015).

O modelo de crescimento logístico (VERHULST, 1838) é uma equação independente do substrato, que pode descrever com precisão as fases *lag*, exponencial e estacionária do crescimento de microalgas sob diferentes condições de cultura (CHANG et al., 2016). Esse

modelo mostra que o crescimento exponencial de qualquer população não pode continuar indefinidamente e a taxa de aumento populacional depende do tamanho da população. Assim, o efeito da densidade deve ser considerado para melhorar a compreensão sobre a produtividade das microalgas (XU; BOEING, 2014). A equação logística (Equação 2.10) que descreve a taxa de crescimento das microalgas é composta por três parâmetros, a produção de biomassa máxima (X_{max}) representa a capacidade de suporte do ambiente (HE et al., 2016), X representa a concentração real de biomassa no tempo e μ_{max} representa a taxa de crescimento máxima específica (CHANG et al., 2016).

Além da equação logística amplamente usada para modelar o crescimento populacional em um ambiente limitado (ARINO; WANG; WOLKOWICZ, 2006). Diversos modelos têm levado em consideração outros aspectos do cultivo de microalgas, entre os quais, concentração de nitrogênio (CONCAS et al., 2016; FRÉ et al., 2016), distribuição da luz (CORNET; DUSSAP, ; YUN; PARK, 2003) e dependência da temperatura (BÉCHET; SHILTON; GUIEYSSE, 2013).

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo apresenta um fluxograma geral do estudo utilizando a microalga *H. luteoviridis* cultivada sob diferentes regimes de operação do fotobiorreator (batelada, batelada repetida e contínuo) e com condições controladas de concentração de nitrogênio no meio de cultivo, temperatura, regime de iluminação. A descrição detalhada de cada experimento está apresentada nos capítulos 4, 5, 6 e 7 deste documento e o detalhamento dos métodos analíticos utilizados neste estudo estão no apêndice.

3.1 Fluxograma geral do estudo

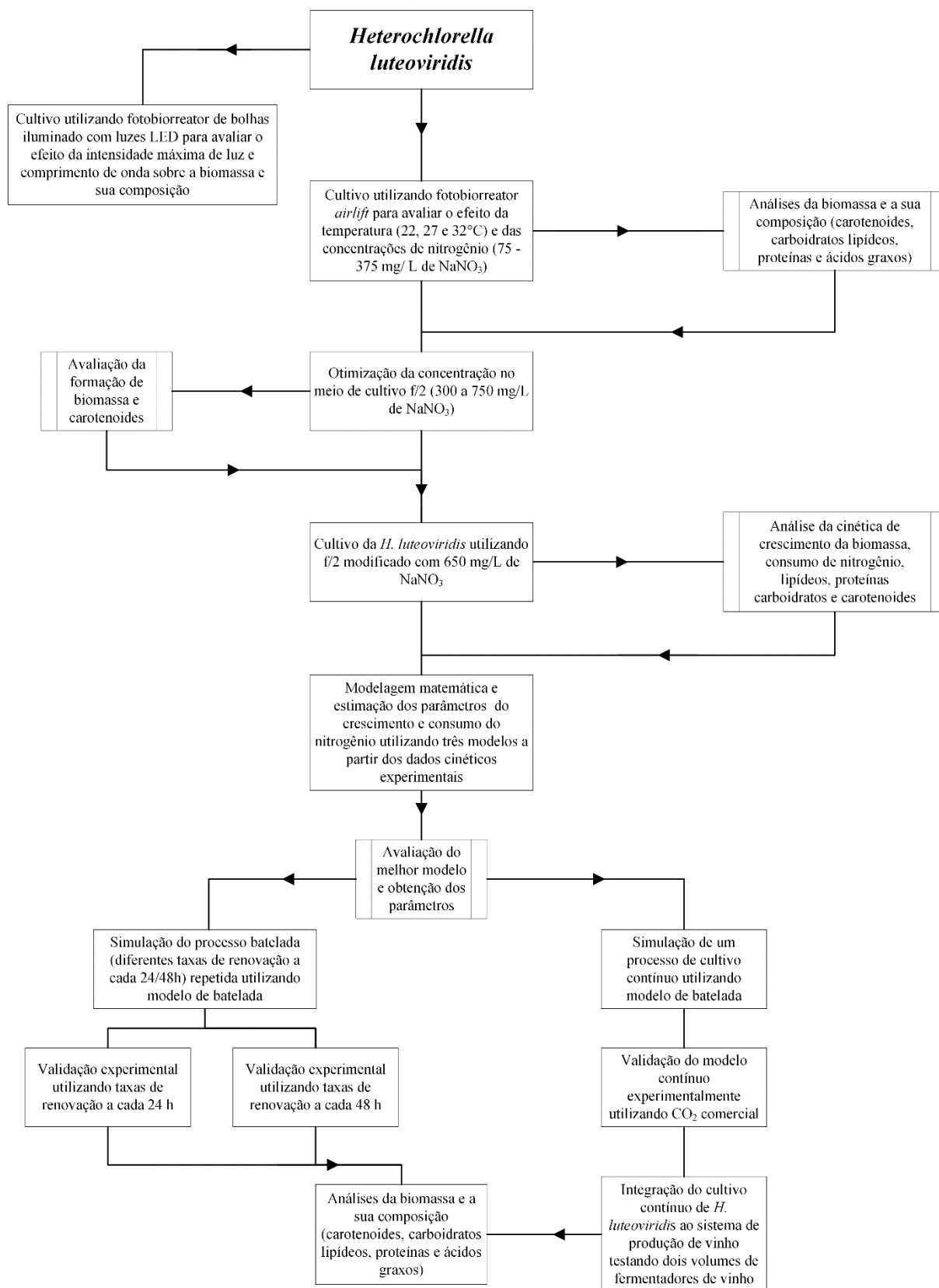


Figura 3.1. Fluxograma geral do estudo

3.2 Microrganismo e manutenção celular

O microrganismo objeto desse experimento foi a microalga *Chlorella* sp., posteriormente identificada como *Heterochlorella luteoviridis* (Anexo 1) e codificada pelo Laboratório de Bioengenharia como BE 002. Essa cepa foi doada pelo Professor Sérgio Lourenço, do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas, Departamento de Biologia Marinha, da Universidade Federal Fluminense (UFF), localizada na cidade de Niterói, Estado do Rio de Janeiro. A microalga é mantida em Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio de cultura de f/2 (GUILLARD; RYTHER, 1962) sob a temperatura de 22 °C e fotoperíodo de 12/12 h (claro/escuro), no Laboratório de Bioengenharia do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS), em Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul.

3.3 Meio de cultivo e preparo do inóculo

A formulação do meio de cultivo f/2 (GUILLARD; RYTHER, 1962) empregada foi a seguinte: 34 g L⁻¹ de sal marinho (Red Sea Salt®) e concentrações variadas de nitrato de sódio (NaNO₃) de acordo com cada experimento. O meio preparado foi suplementado com 1 mL L⁻¹ de solução de fosfato (NaH₂PO₃.H₂O), 1 mL L⁻¹ de solução de silicato (Na₂SiO₃.9H₂O), 1 mL L⁻¹ de solução de metais-traço, 1 mL L⁻¹ de solução de vitaminas e 1 mL L⁻¹ de solução-tampão TRIS (C₄H₁₁NO₃). As soluções foram preparadas de acordo com Lourenço (2006), seguindo as concentrações conforme Tabela 3.1.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e esterilizadas em autoclave (121 °C por 15 min). As vitaminas foram esterilizadas por filtração em membrana de celulose 0,22 µm.

O inóculo foi preparado de maneira igual para os experimentos dos Capítulos 4, 5 e 6 e 7 deste trabalho. O inóculo foi cultivado em um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 240 mL de volume de cultura (diluição de 1:10 (volume de cultura : volume de meio de cultura)) utilizado meio de cultura f/2 (GUILLARD; RYTHER, 1962) modificado na concentração de nitrogênio (300 mg L⁻¹ de NaNO₃). O inóculo foi mantido em agitador rotatório (Oxylab, Oxy 304 T) nas seguintes condições: 28 °C durante 7 dias, iluminação contínua 5,0 klx (equivalente a 70 µE m⁻² s⁻¹) e pH inicial 8,5.

Tabela 3.1. Concentração das soluções para suplementação do meio base

Solução estoque	Composto	Concentração (mg L ⁻¹)
Solução de fosfato	NaH ₂ PO ₃ .H ₂ O	5 000
Solução de silicato	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	30 000
Solução de TRIS/HCL	C ₄ H ₁₁ NO ₃	250 000
Solução de metais-traço	CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	22
	CoCl ₂ .6H ₂ O	10
	MnCl ₂ .4H ₂ O	180
	Na ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	6,3
	Na ₂ EDTA	4,36
	FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15
Solução de vitaminas	Tiamina	100
	Cianocobalamina	0,5
	Biotina	0,5

CAPÍTULO 4 – EFEITO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO NA COMPOSIÇÃO DE BIOMASSA DA *HETEROCHLORELLA LUTEOVIRIDIS*

Article 1. Effect of temperature and nitrogen concentration on biomass composition of *Heterochlorella luteoviridis*

Tania MENEGOL¹, Andressa Bacalau DIPRAT¹, Eliseu RODRIGUES¹, Rosane RECH^{1*}

¹ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author: rrech@ufrgs.br

Published by Food Science and Technology, Campinas, SP, BR, 37(Special issue): 28-37, Dec. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.13417>

Abstract

The interest in microalga as a food supplement has grown due their high contents of carotenoids, polyunsaturated fatty acids and proteins. This study evaluated the effect of different temperatures (22, 27 or 32 °C) and sodium nitrate concentrations (12, 24, 36, 48 or 60 mg L⁻¹ of N-NO₃) in culture medium on *Heterochlorella luteoviridis* biomass production and composition. The highest biomass concentration (3.35 g L⁻¹) was observed at the highest N-NO₃ concentration. The N-NO₃ concentration positively affected protein, carbohydrate and carotenoids contents of biomass. On the other hand, cells cultured at the lowest N-NO₃ concentration showed a slight increment in lipid content. The major carotenoid was lutein (30.7 ± 1.4 % of total carotenoids), and the polyunsaturated fatty acids were 37±2 % of total fatty acids. Low temperature improved the biosynthesis of ω3 type fatty acids by lowering the ω6:ω3 ratio. Overall, our results indicate *H. luteoviridis* can yield high biomass concentration under autotrophic growth, resulting in a biomass rich in carotenoids, mainly lutein, and ω3 polyunsaturated fatty acids.

KEYWORDS: nitrogen; temperature; lipids; omega-3; carotenoids; microalga.

4.1 Introduction

Microalgae are photosynthetic microorganisms that require light energy and carbon dioxide (CO₂) for their growth and production of high value compounds, such as carotenoids and polyunsaturated fatty acids. Microalgae biomasses can also be rich in proteins, lipids and carbohydrates (BOROWITZKA, 1992; MARKOU & NERANTZIS, 2013; METTING & PYNE, 1986; PANCHA et al., 2014). Microalgae lipids contain important polyunsaturated fatty

acids, such as linoleic acid (LA), α -linolenic acid (ALA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) (HULTBERG et al., 2014; MARKOU & NERANTZIS, 2013). All-trans-lutein (xanthophyll) and all-trans- β -carotene are among the major carotenoids found in microalgae biomass (RODRIGUES et al., 2014).

The growing demand of natural foods has increased the interest on carotenoids as colorants by the food industry (CHACÓN-LEE & GONZÁLEZ-MARIÑO, 2010; JIN et al., 2003; SAHU et al., 2013). In the last decades, several authors have studied carotenogenesis in order to improve carotenoid biosynthesis efficiency and evaluate microorganisms, such as microalgae, bacteria and cyanobacteria (SCHROEDER & JOHNSON, 1995), fungi and yeast (AKSU & EREN, 2005; BUZZINI et al., 2005) to increase pigments production on an industrial scale. However, culture medium composition, such as carbon and nitrogen sources (AKSU & EREN, 2005), and the presence of metals, salts and chemical agents (BUZZINI et al., 2005) are factors that still need research in order to optimize the process of carotenoids production in different species of microorganisms. Some investigations have shown an increase in carotenoid content of *Dunaliella salina* cultured under several light intensities (ORSET & YOUNG, 1999) and micronutrient stress, such as, iron, zinc and manganese (SAHA et al., 2013).

Temperature plays an important role in microalgae metabolism, particularly in the lipids synthesis, which affects fatty acid composition (RENAUD et al., 2002; SUSHCHIK et al., 2003; VENKATA et al., 2014). Nitrogen is essential for protein and chlorophyll synthesis, which is another key factor that affects microalgae growth (CHENG et al., 2013). Nitrogen concentration limitation during cultivation is responsible for altering cellular metabolism and exerting a significant function in lipid synthesis accumulation in microalgae biomass, specially saturated and monounsaturated fatty acids (CONVERTI et al., 2009; OLOFSSON et al., 2014).

In addition to specific factors of cultivation, the selection of microalgae is another important factor, because the biochemical and physiological responses to changes in the cultivation conditions vary according to specific species (SINGH et al., 2015). The basic knowledge of algal physiology is important, since the success of algal biotechnology depends on choosing the right algae with the required properties for a specific product or culture conditions (PULZ & GROSS, 2004).

The microalga specie *Chlorella luteoviridis* was commercialized as food supplement in the European Union market prior to 1997, so it is not subject to the Novel Food Regulation (EC) No. 258/97 (CHAMPENOIS et al., 2014). After a taxonomic revision, *C. luteoviridis* was

recently reclassified as *Heterochlorella luteoviridis* (NEUSTUPA et al., 2009). Considering that information on the metabolic versatility of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* (former *Chlorella luteoviridis*) are few, this study investigated the effect of temperature and nitrogen concentration on biomass composition of *H. luteoviridis*, namely, proteins, lipids, carbohydrates and carotenoids.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Microalgae and cultivation condition

The microalgae *Heterochlorella luteoviridis* BE002 was obtained from the culture collection of the Department of Marine Biology, Federal University Fluminense (Niterói, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), where certified stocks are kept and can be requested. The cells were maintained in the Bioengineering Laboratory (ICTA/UFRGS) in f/2 medium (GUILLARD; RYTHER, 1962) at 22 °C in a germination chamber under a 12/12 h (light/dark) photoperiod. The inoculum (240 mL) was grown in rotatory shaker at the following conditions: 28 °C, 14 days, continuous illumination 5.0 klx (equivalent to 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and initial pH 8.5.

The cultures were performed in flat-plate airlift photobioreactors (PBRs) with 2.4 L working volume (KOCHEM et al., 2014), aerated at 1 L min^{-1} of CO₂-enriched air (1% volume fraction) and continuously illuminated at 18.0 klx at the riser side by a panel of electronic lamps (24 × 13 W cool light, equivalent to 252 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The microalga was grown in f/2 medium modified in its NaNO₃ concentration according to a hexagonal experimental design (DOEHLERT, 1970) using two variables: temperature (22, 27 and 32 °C) and NaNO₃ content (75, 150, 225, 300 and 375 mg L⁻¹), which contains 16.4 % of nitrogen (N-NO₃), corresponding to 12, 24, 36, 48 and 60 mg L⁻¹ of N-NO₃, respectively. These values were chosen based on data previously reported (JARENKOW et al., 2015; SINGH & SINGH, 2015).

During the cultivations, 1 mL L⁻¹ of phosphate solution and 1 mL L⁻¹ of trace metals solution, prepared according to Chagas et al. (2015), were added daily to the PBRs. All cultures were performed 4 times. During the cultures, the biomass concentration was measured by optical density at 750 nm (OD_{750}) (CHAGAS et al., 2015) and correlated with dry cell weight (X) by the following equation:

$$X \left(\text{g L}^{-1} \right) = 0.81 \times OD_{750} \quad \left(R^2 = 0.979 \right) \quad (4.1)$$

At the end of 7 days, the biomass content of the PBRs was centrifuged ($10\,000 \times g$, 10 min), frozen, lyophilized and stored ($-22\text{ }^{\circ}\text{C}$) for further analysis. Biomass productivity was determined as the biomass difference between the end of the growth phase and the beginning of the culture, divided by the respective cultivation time.

4.2.2. Determination of lipids and fatty acid methyl esters (FAMES)

The total lipid content was measured by the method described by Bligh & Dyer (1959) using 0.50 g of freeze-dried biomass. For FAME identification, the extracted lipids were methylated with a 14 % BF_3 -methanol solution at an ebullition temperature for 30 min under a N_2 atmosphere following the method of Joseph & Ackman (1992). The fatty acids were identified using gas chromatography (GC Model 2010, Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with automated sampler and injector, flame ionization detector and a capillary column of fused silica (SBL 100, Shimadzu, $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm i.d.}$, $0.25\text{ }\mu\text{m}$ film thickness). The solvent used was hexane, and the injector temperature was set at $240\text{ }^{\circ}\text{C}$. The carrier gas was H_2 at a constant flow of 1 mL min^{-1} . The flame ionization detector (FID) was set at $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ with a H_2 flow of 40 mL min^{-1} and air flow at 400 mL min^{-1} . The oven temperature was set at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min and then increased to $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a gradient of $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

The identification of each fatty acid was performed comparing the retention time with a standard mixture of fatty acid methyl esters (FAME-MIX 37 standard Sigma[®]). Moreover, the identification was confirmed by the injection of the sample in a gas chromatography with mass spectrometer detector (GC-MS Model QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japan). The quantification of the fatty acids was performed according to the AOAC method (AOCS, 1997).

4.2.3 Determination of carbohydrates and proteins

The carbohydrate content was measured after acid hydrolysis of the microalgae biomass. The supernatant was used for carbohydrate measurement by the phenol-sulfuric acid method (DUBOIS et al., 1956). The protein solution was prepared as described by Li et al. (2015) with modifications. Firstly, the biomass was hydrated overnight at with 5 mL of distilled water ($T < 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). The biomass-water suspension was centrifuged ($3000 \times g$, 10 min) and 1 mL of NaOH (1 N) was added to the pellet, mixed using a vortex, and heated to $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min. The alkaline lyse was neutralized with 0.5 mL of HCl (1.6 N). The samples were cooled to room temperature and centrifuged ($3000 \times g$, 10 min). The protein content was measured in the

supernatant by the Lowry method (LOWRY et al., 1951). The calibration curve was prepared using BSA dissolved in distilled water.

4.2.5 Determination of carotenoids

The extraction was conducted according to the adapted method described by Mandelli et al. (2012) using 20 mg of freeze-dried biomass. To determine the carotenoids' composition, the dry extract was dissolved in MeOH/MTBE (70:30, v/v) and analyzed by HPLC-DAD-MS². The carotenoids were separated on a C₃₀ YMC column (5 µm, 250 x 4.6 mm i.d.) (Waters, Wilmington, USA) at a flow rate of 0.9 mL min⁻¹ and column temperature at 29 °C using a linear gradient mobile phase of methanol/MTBE from 95:5 to 70:30 in 30 min, followed by 50:50 in 20 min and maintaining this proportion for 15 min (RODRIGUES et al., 2014). The carotenoids were identified in an HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with binary pump (model LC-20AD) and an online degasser connected in series with a diode array detector (DAD) and a mass spectrometer (MS) with an iron trap analyzer and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source (Bruker Daltonics, Esquire model 6000, Bremen, Germany). The HPLC-DAD-MS² parameters were set using the same conditions as previously described by De Rosso & Mercadante (2007). The quantification of carotenoids was performed using a Waters HPLC 2695 series system (Wilmington, EUA) equipped with a diode array detector (Waters 2998 dual series). The carotenoids were quantified using a nine-point analytical curve of all-*trans*-β-carotene (0.13 to 15 mg L⁻¹). The analytical curve was linear ($R^2 = 0.998$), the detection limit was 0.9 mg L⁻¹ and the quantification limit was 2.8 mg L⁻¹.

4.2.6 Statistical analysis

The effects of variables (temperature and nitrogen) on each response were evaluated by multiple linear regression using a quadratic model and validated by analysis of variance (ANOVA). Fatty acids composition was analysed using principal component analysis. The results were also compared using the Tukey test at a 5 % significance level. All statistical analyses were performed using Statistic 12.0 (StatSoft, Inc.).

4.3. Results and Discussion

4.3.1 Biomass

The biomass concentration was only affected by the nitrogen concentration ($p=2.9 \times 10^{-9}$, $R^2=0.75$). The culture with the highest nitrogen concentration presented the highest final biomass (3.35 g L^{-1}), which was 2.3-fold higher than the biomass of the culture with the lowest nitrogen concentration (1.43 g L^{-1}) (Figure 4.1a). According to Juneja et al. (2013), nitrogen deficiency leads to nutritional changes associated with stress conditions, causing a decrease on biomass formation.

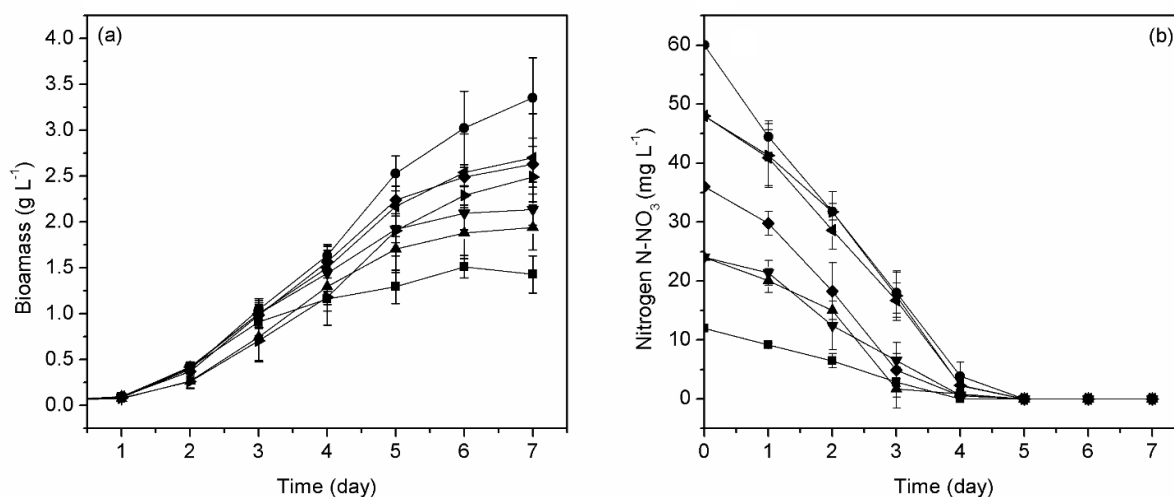


Figure 4.1. Kinetics of (a) biomass growth and (b) nitrogen consumption of *H. luteoviridis* cultured under different temperatures and initial NaNO_3 concentrations. (■) $12 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$, 27°C ; (▲) $24 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$, 22°C ; (▼) $24 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$, 32°C ; (◆) $36 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$, 27°C ; (►) $48 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$, 22°C ; (◄) $48 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$, 32°C ; (●) $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$, 27°C . Error bars represent the standard deviation between the four repetitions of each culture condition ($n = 4$)

The biomass concentration of 3.35 g L^{-1} is considered high for autotrophic culture (CO_2 as sole carbon source) and was achieved in a relatively short time (7 days), biomass productivity of $0.48 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. The high productivity can be attributed to the innate characteristics of *H. luteoviridis*, which have been poorly explored up to now, but they can also be attributed to the photobioreactor performance, which already allowed high specific growth rates using other microalgae species (KOCHEM et al., 2014). Similar biomass concentrations using autotrophic cultures were achieved with other *Chlorella* species, however, with lower productivities. Autotrophic culture is the usual condition to grow microalgae (CHEN et al., 2011; PEREZ-GARCIA & BASHAN, 2015), although *Chlorella vulgaris* biomass increased

4.8 times in an heterotrophic culture (using organic carbon) when compared to an autotrophic culture (PEREZ-GARCIA et al., 2010). However, heterotrophic cultures require costly carbon, which raises the long-term operation cost of the process (PEREZ-GARCIA & BASHAN, 2015). Autotrophic cultures contribute to a reduction of the greenhouse effect by using CO₂ as the carbon source, and the optimization of nutrients and cultures conditions can increase biomass productivity.

4.3.2 Biomass composition: carbohydrates, proteins and lipids

The composition of *H. luteoviridis* BE002 biomass was affected by growth conditions. Nitrogen concentration and temperature affected both the carbohydrate ($p = 3.7 \times 10^{-5}$, $R^2 = 0.68$) and protein ($p = 5.8 \times 10^{-9}$, $R^2 = 0.87$) contents of the biomass. At low temperature, the nitrogen concentration did not affect the carbohydrate content, while at high temperatures, increases in nitrogen concentration increased carbohydrate content (Figure 4.2a). The protein content also increased with the nitrogen concentration; however, this behavior was stronger at low temperatures (Figure 4.2b). The highest protein content (138 mg g⁻¹) was found in the culture with the highest nitrogen concentration (60 mg L⁻¹ N-NO₃). This value was 45 % higher than that observed in the culture with the lowest nitrogen concentration (12 mg L⁻¹ N-NO₃) when both were at 27 °C. The effect of the temperature was less pronounced and dependent of nitrogen concentration. At low nitrogen concentration, the protein content increased with temperature, while for high nitrogen concentration, the protein content decreased as the temperature increased.

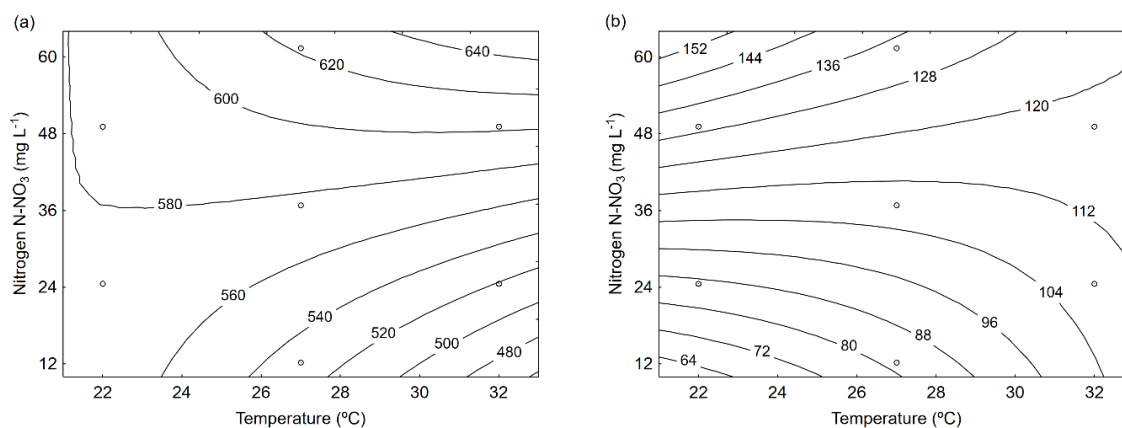


Figure 4.2. Response surfaces for (a) total carbohydrate (mg g⁻¹) and (b) protein (mg g⁻¹) contents in the biomass of *H. luteoviridis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations

Similar results were found for other microalgae genus, such as *Chlorella zofingiensis*, *Isochrysis* sp. and *Prymnesiophyte* (NT19). The reduction in the protein content of *Isochrysis* sp. (T.ISO) and *Prymnesiophyte* (NT19) biomasses was attributed to elevated temperatures (33 °C to 35 °C), and this result may be associated to the breakdown of protein structure and interference with enzyme regulators (RENAUD et al., 2002). Nitrogen is essential for protein synthesis (IKARAN et al., 2015; JUNEJA et al., 2013; ZHU et al., 2014), so the decrease in protein synthesis by microalga cells is a natural response to nitrogen starvation (ZHU et al., 2015).

The synthesis of carbohydrates was also affected by nitrogen concentration. Similar to protein, the highest carbohydrate content (631 mg g⁻¹) was observed in the culture with the highest nitrogen concentration (60 mg L⁻¹ N-NO₃) at 27 °C. This value was 19.3 % higher than that observed in the cultivation with the lowest nitrogen concentration (529 mg g⁻¹) at the same temperature. These results are different than those found by other authors, who reported an increase in carbohydrate content of microalgae biomass culture under nitrogen starvation (PANCHA et al., 2014).

Microalgae metabolism under nitrogen starvation decreases protein biosynthesis (ZHU et al., 2015) and directs it to lipid and carbohydrate biosynthesis (FAN et al., 2012; HO et al., 2012). As carbohydrate synthesis requires less energy, carbohydrates are synthesized before lipids in a rapid response to environmental stress (ZHU et al., 2014). However, after a long period under nitrogen starvation, photosynthesis efficiency decreases, and cells start to metabolize carbohydrates as energy and carbon sources (WANG et al., 2014). This may explain the lower carbohydrate content in cultures with low nitrate concentrations, since in these cultures, nitrogen reached zero at about 72 h of culture (Figure 4.1b) and persisted longer under nitrogen stress compared to cultures with high nitrate concentration, where nitrogen reached zero between 96 h and 120 h.

Persisting longer under nitrogen starvation during microalgae cultivation can lead to high lipid synthesis. A study demonstrated that the lipid synthesis rate started to increase after 120 h nitrogen starvation (ZHU et al., 2014). In our study, the lipid content of biomass decreased with increased nitrogen concentration ($p = 0.0016$, $R^2 = 0.70$, Figure 4.3), ranging between 82.5 mg g⁻¹ and 99.1 mg g⁻¹ as nitrogen decreased from to 60 mg L⁻¹ to 12 mg L⁻¹ N-NO₃ (Figure 4.3). This negative effect of nitrogen concentration on lipid synthesis by microalgae is well described in the literature (CONVERTI et al., 2009; JUNEJA et al., 2013; PANCHA et al., 2014). The temperature showed no effect on lipid synthesis by *H. luteoviridis*

BE002. However, a study with *Chlorella vulgaris* showed a 40 % decrease on lipid content in the biomass when temperature increased from 25 to 30 °C (CONVERTI et al., 2009).

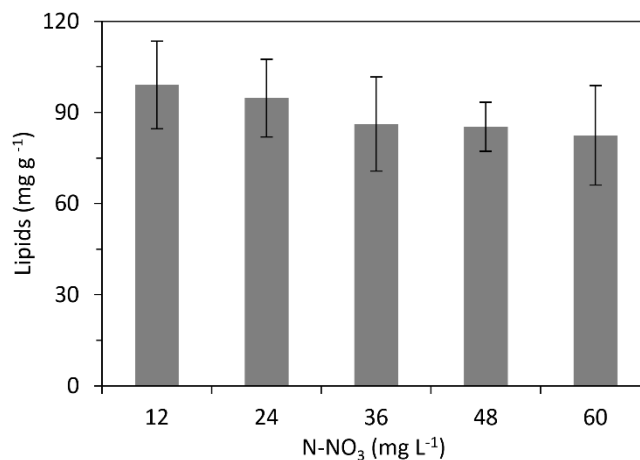


Figure 4.3. Lipid content in biomass of *H. luteoviridis* grown under different of nitrogen concentrations. Error bars represent the standard deviation between the four repetitions of each culture condition (n = 4)

4.3.3 Identification and quantification of lipid fraction

The lipid fraction was characterized by the identification and quantification of carotenoids and fatty acids.

4.3.3.1 Carotenoids

Eleven carotenoids were identified in *H. luteoviridis* biomass (Table 4.1, Figure 4.1a). The major carotenoids were all-trans-lutein, all-trans- α -carotene, all-trans- β -carotene and all-trans-zeaxanthin. Both nitrogen concentration and temperature affected the content of carotenoids in the biomass. The highest carotenoid content of the biomass (2.47 mg g⁻¹) was achieved in culture with the highest nitrogen concentration (60 mg L⁻¹ N-NO₃ at 27 °C). It was 1.5-fold higher than the carotenoid content in the culture with standard medium (12 mg L⁻¹ of N-NO₃). Nitrogen starvation interferes on carotenoid accumulation. There may be a change in the balance of enzymes that leads to a change in the synthesis of chlorophyll and, therefore, an increase in carotenoids (CHRISTAKI et al., 2013; JUNEJA et al., 2013).

The carotenoids were separated into two groups: xanthophylls and carotenes. The content of the xanthophylls increased linearly with nitrogen concentration and slightly decreased with temperature ($p = 3.6 \times 10^{-6}$, $R^2 = 0.70$, Figure 4.4a), whereas the content of the

carotenes was not affected by temperature. The content of the carotenes increased with nitrogen concentration ($p = 6.1 \times 10^{-7}$, $R^2 = 0.74$), and the highest contents were in the range of 36 mg L^{-1} to $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$ (Figure 4.4b).

The highest values found for all-trans- α -carotene and all-trans- β -carotene contents were 0.40 mg g^{-1} and 0.39 mg g^{-1} of biomass, respectively. The all-trans- β -carotene content showed little variation among the tested conditions, while the all-trans- β -carotene increased with nitrogen concentration.

Table 4 1 Composition of carotenoids (mg g⁻¹) *H. luteoviridis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations*

Temperature (°C)	27	27	22	32	32	22	27
Nitrogen (mg L ⁻¹)	12	60	24	24	48	48	36
all- <i>trans</i> -violaxanthin	0.03 ± 0.01 ^c	0.11 ± 0.05 ^{ab}	0.03 ± 0.01 ^c	0.05 ± 0.01 ^{bc}	0.13 ± 0.04 ^a	0.06 ± 0.02 ^{bc}	0.08 ± 0.01 ^{abc}
<i>cis</i> -violaxanthin	0.04 ± 0.00 ^d	0.11 ± 0.01 ^{ab}	0.10 ± 0.02 ^{abc}	0.07 ± 0.01 ^{cd}	0.12 ± 0.03 ^a	0.09 ± 0.02 ^{abc}	0.08 ± 0.01 ^{bc}
9- <i>cis</i> -violaxanthin	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^a
13- <i>cis</i> -lutein	0.05 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0.06 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.01 ^a
13'- <i>cis</i> -lutein	0.02 ± 0.00 ^b	0.03 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^{ab}
all- <i>trans</i> -lutein	0.44 ± 0.06 ^b	0.76 ± 0.06 ^a	0.71 ± 0.14 ^a	0.61 ± 0.09 ^{ab}	0.77 ± 0.09 ^a	0.70 ± 0.13 ^a	0.65 ± 0.05 ^a
all- <i>trans</i> -zeaxanthin	0.24 ± 0.02 ^b	0.35 ± 0.02 ^a	0.36 ± 0.04 ^a	0.23 ± 0.02 ^b	0.19 ± 0.01 ^b	0.35 ± 0.01 ^a	0.19 ± 0.02 ^b
<i>cis</i> -zeaxanthin	0.01 ± 0.00 ^c	0.02 ± 0.00 ^{ab}	0.01 ± 0.00 ^{abc}	0.01 ± 0.00 ^{bc}	0.02 ± 0.00 ^{bc}	0.02 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^{bc}
15- <i>cis</i> -β-carotene	0.03 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	0.04 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a
all- <i>trans</i> -α-carotene	0.24 ± 0.04 ^d	0.35 ± 0.03 ^{ab}	0.27 ± 0.08 ^{cd}	0.30 ± 0.05 ^{bcd}	0.40 ± 0.04 ^a	0.27 ± 0.03 ^{bcd}	0.32 ± 0.04 ^{bc}
13- <i>cis</i> -β-caroteno	0.07 ± 0.01 ^d	0.14 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.04 ^{ab}	0.07 ± 0.01 ^{cd}	0.10 ± 0.00 ^{bc}	0.12 ± 0.01 ^{ab}	0.13 ± 0.02 ^{ab}
all- <i>trans</i> -β-carotene	0.30 ± 0.03 ^b	0.36 ± 0.03 ^{ab}	0.35 ± 0.06 ^{ab}	0.33 ± 0.04 ^{ab}	0.39 ± 0.02 ^a	0.35 ± 0.03 ^{ab}	0.39 ± 0.02 ^a
9- <i>cis</i> -β-carotene	0.13 ± 0.02 ^c	0.18 ± 0.00 ^{ab}	0.18 ± 0.05 ^{ab}	0.14 ± 0.02 ^{bc}	0.15 ± 0.00 ^{abc}	0.18 ± 0.04 ^{ab}	0.19 ± 0.03 ^a
Total xantophylls	0.84 ± 0.09 ^c	1.44 ± 0.11 ^a	1.29 ± 0.15 ^{ab}	1.06 ± 0.11 ^{bc}	1.38 ± 0.06 ^{ab}	1.33 ± 0.08 ^{ab}	1.16 ± 0.09 ^{abc}
Total carotenes	0.76 ± 0.09 ^a	1.06 ± 0.04 ^a	0.94 ± 0.20 ^a	0.87 ± 0.09 ^a	1.08 ± 0.05 ^a	0.95 ± 0.07 ^a	1.06 ± 0.04 ^a
Total carotenoids	1.59 ± 0.17 ^b	2.50 ± 0.10 ^a	2.23 ± 0.35 ^a	1.93 ± 0.18 ^{ab}	2.46 ± 0.10 ^a	2.28 ± 0.15 ^a	2.22 ± 0.06 ^{ab}

*Mean ± standard deviation; means with the same letter in the same line does not present significant difference by Tukey test at a significance level of 5 %.

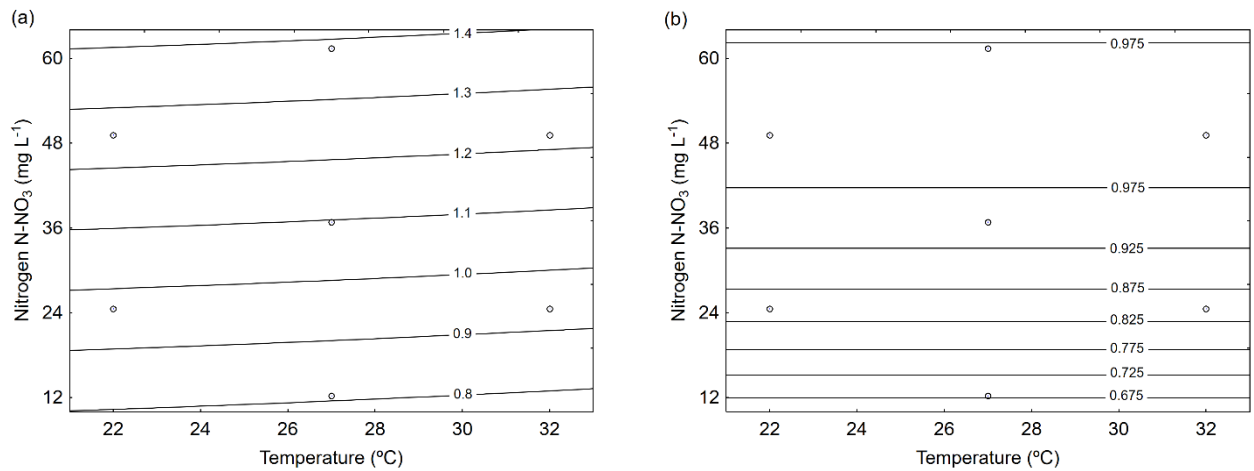


Figure 4.4. Response surfaces for (a) xanthophyll (mg g^{-1}) and (b) carotene (mg g^{-1}) contents in the biomass of *H. luteoviridis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations

The highest values found for all-trans-lutein and all-trans-zeaxanthin were 0.77 mg g^{-1} and 0.39 mg g^{-1} , respectively. The results indicate a strong negative effect of temperature on all-trans-zeaxanthin than on all-trans-lutein contents. *Porphyridium purpureum* biomass also showed high zeaxanthin content when cultured between $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (GUIHÉNEUF and STENGEL, 2015).

The positive effect of nitrogen on xanthophyll accumulation by *H. luteoviridis* could be linked to the positive effect of nitrogen on biomass growth, i.e., high xanthophylls content helps to keep protein synthesis in optimal growth conditions (CORDERO et al., 2011). The results showed the possibility of increasing levels of lutein in the biomass by increasing the concentration of nitrogen in optimal growth conditions.

4.3.3.2 Total fatty acids

The qualitative profile of fatty acids of the microalgae *H. luteoviridis* was similar in all growth conditions (Table 4.2). The same fatty acids were also identified in other microalga species (PRAVEENKUMAR et al., 2012; ZHUKOVA & AIZDAICHER, 1995). The changes in fatty acid composition were statistically analysed Tukey test. The saturated fatty acids (SFA) were about 50 % of the total fatty acids, i.e., the hexadecanoic acid (C16:0) the major SFA identified in all culture conditions, followed by octadecanoic acid (C18:0); C16:0 content was

higher at high temperatures and low nitrogen concentration, while C18:0 content increased at low temperatures and high nitrogen.

The monounsaturated fatty acids (MUFA) content ranged from 9.6 % to 14.7 % of the total fatty acids. The major MUFA was C18:1n-6, followed by C16:1n-9 and C18:1n-9. The two formers were favoured at high temperatures, while C18:1n9 increased in the biomass cultured at low temperature.

The polyunsaturated fatty acids (PUFA) content ranged from 34.4 % to 40.7 % of total fatty acids. The essential fatty acids linoleic acid (LA, C18:2n-6) and α -linolenic acid (ALA, C18:3n3) constitute the major components of PUFAs. Other important PUFAs as eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA 22:6n-3) were also present among *H. luteoviridis* PUFAs. ALA and DHA synthesis were favored when cells grew at low temperatures, while LA was synthesized at high temperatures. The relationship between temperature and the contents of MUFAs and PUFAs may be explained by changes in the fluidity of the phospholipids of the cellular membrane layers, which depends on the unsaturation degree of the fatty acids. EPA content was independent of the temperature and favoured when cells are cultured at high nitrogen concentrations.

The ingestion of omega 3 fatty acids (ω 3) such as ALA, EPA and DHA are associated with low incidence of myocardial infarction, chronic inflammation and autoimmune disorders and in high doses to cardiovascular diseases (CALDER, 2008; SCHACKY, 2000; SIMOPOULOS, 2002). LA is an essential omega 6 fatty acid (ω 6). Besides being rich in ω 3 fatty acids, *H. luteoviridis* also showed a low ω 6: ω 3 ratio LA:ALA, (Table 4.2) around 2:1. A low ω 6: ω 3 ratio in diet was associated with a reduction of 45 % in deaths from heart diseases, while the high ω 6: ω 3 ratio may increase the risk of inflammatory diseases (RUSSO, 2009; SIMOPOULOS, 2002). Simopoulos (2004) reported an increase in ω 6 consumption in recent decades, with an actual ω 6: ω 3 ratio ranging from 10:1 to 20:1. This increase in ω 6 consumption is mainly linked to the use of vegetable oils (BHATTACHARYA et al., 2007; CALDER, 2008).

Table 4.2. Fatty acids composition of *H. luteoviridis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations *

Temperature (°C)	27	27	22	32	32	22	27
Nitrogen (mg L ⁻¹)	12	60	24	24	48	48	36
Saturated fatty acids (% of total fatty acids)							
14:0	1.4 ± 0.1 ^{ab}	1.5 ± 0.1 ^{ab}	2.0 ± 0.0 ^a	0.7 ± 0.1 ^{ab}	0.8 ± 0.1 ^b	1.7 ± 0.0 ^{ab}	1.4 ± 0.1 ^{ab}
16:0	47.6 ± 0.9 ^a	42.6 ± 0.2 ^{cd}	44.1 ± 0.0 ^{bc}	46.6 ± 0.2 ^{ab}	44.2 ± 0.7 ^{bc}	40.9 ± 1.4 ^d	44.7 ± 1.8 ^{bc}
18:0	2.7 ± 0.3 ^{bc}	4.8 ± 0.4 ^a	4.3 ± 0.4 ^{ab}	2.0 ± 0.4 ^c	2.7 ± 0.8 ^{bc}	4.8 ± 0.4 ^a	4.0 ± 1.0 ^{ab}
20:0	0.1 ± 0.0 ^{ab}	0.1 ± 0.0 ^{ab}	0.2 ± 0.1 ^a	0.1 ± 0.0 ^{ab}	0.1 ± 0.0 ^b	0.1 ± 0.0 ^b	0.1 ± 0.0 ^{ab}
22:0	0.5 ± 0.0 ^{ab}	0.6 ± 0.0 ^{ab}	0.7 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	0.3 ± 0.1 ^b	0.5 ± 0.2 ^{ab}	0.5 ± 0.2 ^{ab}
24:0	0.7 ± 0.0 ^{bc}	0.5 ± 0.0 ^c	1.1 ± 0.0 ^a	0.4 ± 0.0 ^d	0.3 ± 0.0 ^d	1.0 ± 0.3 ^a	0.8 ± 0.1 ^b
Total	52.9 ± 1.2 ^a	50.0 ± 0.7 ^{bc}	52.2 ± 0.5 ^{ab}	50.2 ± 0.7 ^{bc}	48.5 ± 0.6 ^c	49.0 ± 1.2 ^c	51.4 ± 0.7 ^{ab}
Monounsaturated fatty acids (% of total fatty acids)							
14:1	0.3 ± 0.0 ^{ab}	0.4 ± 0.0 ^{ab}	0.4 ± 0.0 ^{ab}	0.4 ± 0.0 ^{ab}	0.4 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.1 ^b	0.3 ± 0.1 ^{ab}
16:1n-9	2.2 ± 0.5 ^{bc}	2.6 ± 0.6 ^{bc}	1.6 ± 0.2 ^c	3.1 ± 0.5 ^{ab}	3.8 ± 0.4 ^a	1.7 ± 0.8 ^c	2.6 ± 0.9 ^{abc}
16:1n-7	0.2 ± 0.0 ^b	0.3 ± 0.0 ^{ab}	0.3 ± 0.0 ^{ab}	0.3 ± 0.0 ^{ab}	0.4 ± 0.0 ^a	0.4 ± 0.2 ^{ab}	0.2 ± 0.0 ^{ab}
18:1n-6	7.2 ± 0.6 ^{ab}	5.4 ± 1.1 ^{bcd}	4.0 ± 0.2 ^{cd}	8.8 ± 0.4 ^a	7.2 ± 1.6 ^{ab}	3.3 ± 0.8 ^d	6.0 ± 1.2 ^{bc}
18:1n-9	2.7 ± 0.0 ^b	3.2 ± 0.1 ^b	3.3 ± 0.1 ^b	2.7 ± 0.1 ^b	3.0 ± 0.0 ^b	4.6 ± 0.7 ^a	2.8 ± 0.2 ^b
Total	12.5 ± 0.1 ^{abc}	11.7 ± 1.6 ^{abc}	9.6 ± 0.5 ^c	15.2 ± 0.9 ^a	14.7 ± 2.1 ^{ab}	10.3 ± 2.7 ^{bc}	12.0 ± 2.0 ^{abc}
Polyunsaturated fatty acids (% of total fatty acids)							
18:2n-6	20.6 ± 0.9 ^b	21.0 ± 0.2 ^b	18.8 ± 0.4 ^c	23.8 ± 0.4 ^a	25.3 ± 0.2 ^a	18.5 ± 0.2 ^c	20.4 ± 0.8 ^b
18:3n-6	0.4 ± 0.0 ^{cd}	0.8 ± 0.2 ^b	0.7 ± 0.1 ^{bc}	0.4 ± 0.0 ^d	0.6 ± 0.2 ^{bcd}	1.1 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.2 ^{bcd}
18:3n-3	8.3 ± 0.2 ^b	9.5 ± 0.1 ^b	11.2 ± 0.5 ^a	5.1 ± 0.5 ^c	5.5 ± 0.7 ^c	12.4 ± 1.1 ^a	8.8 ± 0.7 ^b
20:4n-6	1.4 ± 0.1 ^{cd}	2.3 ± 0.2 ^{bc}	2.8 ± 0.1 ^{ab}	1.1 ± 0.1 ^d	1.3 ± 0.2 ^d	3.8 ± 0.6 ^a	2.6 ± 0.9 ^b
20:3n-3	0.2 ± 0.0 ^a	0.1 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^a	0.1 ± 0.0 ^{ab}	0.1 ± 0.0 ^b	0.2 ± 0.0 ^{ab}	0.1 ± 0.0 ^{ab}
20:5n-3	1.6 ± 0.0 ^d	2.7 ± 0.0 ^{ab}	1.9 ± 0.0 ^{cd}	2.4 ± 0.0 ^{abc}	2.7 ± 0.4 ^a	2.6 ± 0.1 ^{ab}	2.2 ± 0.3 ^{bc}
22:4n-3	1.2 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.0 ^a	1.5 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.2 ^a	1.3 ± 0.4 ^a
22:6n-3	0.8 ± 0.1 ^c	0.5 ± 0.0 ^d	1.2 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^e	0.2 ± 0.0 ^e	1.0 ± 0.0 ^b	0.6 ± 0.0 ^d
Total	34.4 ± 1.31 ^c	38.3 ± 0.9 ^{ab}	38.2 ± 0.5 ^{ab}	34.6 ± 0.3 ^c	36.8 ± 1.7 ^{bc}	40.7 ± 1.7 ^a	36.8 ± 1.5 ^{bc}
LA:ALA (ω6:ω3)	1.87	1.71	1.40	2.74	2.79	1.35	1.81

*Mean ± standard deviation; means with the same letter in the same line does not present significant difference by Tukey test at a significance level of 5 %.

4.4. Conclusion

In summary, *Heterochlorella luteoviridis* proved to be an important source of bioactive compounds such as xanthophylls, carotenes and polyunsaturated fatty acids. Our results show that it was possible to improve the growth conditions and, at the same time, induce the biosynthesis of these compounds of interest. High nitrogen concentration in culture medium induces biomass growth along with proteins, carotenoids and EPA biosynthesis. Although temperature did not affect biomass growth, low temperature induced ω 3 fatty acids biosynthesis, such as ALA and DHA, and lowered ω 6: ω 3 ratio. As large-scale microalgae production shifts towards the use of photobioreactors instead of open systems, the careful control of growth conditions can be used to optimize microalgae production as well to enrich microalgae biomass with the target compounds.

CAPÍTULO 5 – MODELAGEM CINÉTICA DA CULTURA DE *HETEROCHLORELLA LUTEOVIRIDIS* EM BATELADA E EM BATELADA REPETIDA: EFEITO SOBRE A BIOMASSA E CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Article 2. Kinetic modelling of *Heterochlorella luteoviridis* in batch and repeated-batch culture: effect over biomass and concentration of bioactives compounds

Tania Menegol, Carolina F. Gonçalves, Eliseu Rodrigues, Rosane Rech*

Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Phone 55 51 3308 1356

*E-mail: rrech@ufrgs.br

Abstract

Microalgae are an important source of a diversity of biocompounds, however there is still a lack of information on the effect of engineering parameters on microalgae growth and composition. *Heterochlorella luteoviridis* growth was maximized by studying nitrogen concentration in batch culture. The experimental data were used to estimate the parameters for biomass growth and nitrogen consumption using different kinetic models. The best model was used to simulate repeated-batch cultures using several dilution rates. The highest predicted productivities were achieved in the simulations using dilution rates of 0.8 L every 24 h (0.014 h^{-1}) and 1.3 L every 48 h (0.011 h^{-1}). These conditions were tested experimentally along with the one that prevented nitrogen starvation: dilution rate of 1.0 L every 24 h (0.017 h^{-1}). Repeated-batch cultures 0.8L/24h and 1.0L/24h showed biomass wash-out, while 1.3L/48h culture reached productivities of $0.74 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for biomass, $158 \pm 3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for proteins, and $5.19 \pm 0.13 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for carotenoids. These productivities are, respectively 1.2, 2.4 and 5.7 times higher than the ones from the batch culture. Lutein and α -linolenic fatty acid ($\omega 3$) contents were 4.8 and 3.2 times higher in the biomass from repeated-batch cultivation. The repeated-batch culture not only increased biomass productivity but also improved biomass composition.

Keywords: modeling; repeated-batch; continuous; carotenoids; proteins.

5.1 Introduction

In the last four decades the interest in bioprocesses using microalgae has been increasing considerably, since these organisms represent a promising source for the production of high-value compounds, such as carotenoids and polyunsaturated fatty acids (FERNÁNDEZ et al., 2016; GONG and BASSI, 2016). Substances derived from microalgae can be used as food additives (GARCÍA-CAÑEDO et al., 2016; MINHAS et al., 2016) and have positive

effects on human health (RUSSO, 2009; SIMOPOULOS, 2002), being of great interest for food, nutraceutical, and pharmaceutical industries.

Microalgae production has several advantages compared to conventional vegetal cultures (BERGMANN and TRÖSCH, 2016), such as cultivation in closed systems, higher efficiency in using water resources and nutrients, and higher growth rate. Furthermore, microalgae does not compete for arable soil with conventional crops, and can adapt and change the cellular metabolism under specific growth conditions (ADESANYA et al., 2014; FERNÁNDEZ et al., 2016).

The generation of high value compounds by microalgae requires specific culturing strategies and mainly genres that exhibit extensive metabolic versatility (MOHAMED et al., 2014; KIM, 2015; MULDER et al., 2014). Recent studies on the microalga *Heterochlorella luteoviridis* under autotrophic growth demonstrated its potential as a source of a variety of carotenoids, especially lutein, that corresponds to 30-68 % (mass fraction) of the total carotenoids in the biomass, as well as a high potential of biomass production (DIPRAT et al., 2017; JAESCHKE et al., 2016; MENEGOL et al., 2017). The proper use of light and nutrient, especially nitrogen, is essential to optimize the photoautotrophic production of biomass and carotenoids, among them lutein (CORDERO et al., 2011; GARCÍA-CAÑEDO et al., 2016), a primary carotenoid that undergoes degradation under stress (GONG and BASSI, 2016). In addition to nitrogen, cultivation strategies such as batch, fed-batch, repeated-batch and continuous cultivation, also affect biomass growth rate and composition (XIE et al., 2014). Fed-batch cultivation with pulse-feeding of nitrate was proposed to provide the necessary amount of nitrogen and increase lutein production by *Desmodesmus sp.* (XIE et al., 2013).

Mathematical modeling combined with knowledge of cultures parameters has been used to effectively understand the parameter that affects microalgae growth and product accumulation (ADESANYA et al., 2014; CHANG et al., 2016). The modeling of microalgae growth has become essential for the expansion of the biotechnological process of microalgae cultivation since an accurate model is a prerequisite for predicting process performance and optimization of operating conditions (YUN and PARK, 2003).

The success in kinetic modeling depends on predicting the ability of microalgae uptake nutrients (inorganic nitrogen, phosphorus, vitamins, etc.) (BERNARD, 2011). The model proposed by Monod (1949) assumes that specific growth rate is associated to the concentration of a growth-limiting substrate in culture medium. Despite being used successfully to describe

most biological processes, Monod equation fails to fit a lot of growth processes (HE et al., 2016). The classic model proposed by Droop (1968) is widely used to describe growth and nitrogen absorption in algal cultures (BERNARD, 2011; ZHOU et al., 2014). It uses intracellular storage of nutrients, the cell quota q , to uncouple cell growth and nitrogen consumption. The growth and nutrient consumption rates are limited by nutrient concentration (VATCHEVA et al., 2006). However, Droop fails to model photo-limited cultures, where the light effect on growth rate should be introduced (Bernard et al., 2016). The logistic equation has been described as effective to predict the growth of cultural algae, it considers the effect of culture density as a limiting growth factor (HE et al., 2016; XU and BOEING, 2014). Several models have taken into account other aspects of microalgae, such as nutrient absorption and limitation (CONCAS et al., 2016; DA FRÉ et al., 2016), light distribution (CORNET and DUSSAP, 2009; YUN and PARK, 2003), temperature dependence (BÉCHET et al., 2013) and population growth (HE et al., 2016).

Biotechnological processes are complex, therefore, challenging for structural modeling and control. Efficient optimization of such processes requires accurate model construction. Thereby, the objective of this work was to apply mathematical models to describe the growth and consumption of substrate in batch mode, simulate and optimize different dilution rates for repeated batch mode of operation.

5.2 Materials and Methods

5.2.1 Microalgae and pre-cultivation

The microalgae *Heterochlorella luteoviridis* BE002, was kindly provided by the Department of Marine Biology, UFF (Niterói, Rio de Janeiro, Brazil) and maintained in the Bioengineering Laboratory (ICTA/UFRGS). The microalga was maintained in 250 mL conic flasks with 100 mL of f/2 medium (GUILLARD; RYTHER, 1962), at 22 °C in germination chamber (BOD) under a photoperiod of 12/12 h (light/dark) (ANDERSEN, 2005). The pre-cultures were performed in modified f/2 medium (300 mg L⁻¹ of NaNO₃) (DIPRAT et al., 2017), at a dilution of 1:10 (culture: modified f/2 medium) and grown in a rotatory shaker (28 °C, 7 days, continuous illumination of 5.0 klx).

5.2.2 Batch cultures for the optimum nitrogen concentration

To maximize biomass production, batch cultures were performed in modified f/2 culture medium with different nitrogen concentrations (300 mg L⁻¹ to 750 mg L⁻¹ NaNO₃). The

initial concentration was defined from results obtained in a previous study (MENEGOL et al., 2017). All experiments were performed in duplicate in flat-plate airlift photobioreactors (PBRs) with 2.4 L working volume (KOCHEM et al., 2014), aerated at 1 L min⁻¹ of CO₂-enriched air (1 % volume fraction), and continuously illuminated at 18.0 klx at the riser side. The PBRs, containing 2.16 L of modified f/2 medium (NaNO₃), were inoculated with 240 mL of pre-cultures as specified above. During the cultivations, 1 mL L⁻¹ of phosphate solution and 1 mL L⁻¹ of trace-metals solution were added daily to the PBRs, as described elsewhere (CHAGAS et al., 2015). The cultures were stopped soon after the beginning of the stationary growth phase (9 days of cultivation). Daily samples were collected to determine the concentration of biomass, nitrogen e total carotenoids.

5.2.3 Biomass growth and nitrogen consumption modeling

The best condition of the experiment cited above was repeated in triplicate for 17 days to obtain the experimental data used to estimate the model parameters for biomass growth and nitrogen consumption. Daily samples were withdrawn to determine biomass and nitrogen concentrations, as well as biomass composition: protein, carbohydrate, lipid and total carotenoids contents.

The Droop model (DROOP, 1968) is widely used to reproduce microalgae biomass growth and nitrogen consumption under nitrogen-limited conditions. It was used as the first attempt to model *H. luteoviridis* growth kinetics. The basic Droop model for batch cultivation consists of five equations (5.1-5.6), as described below.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (5.1)$$

$$\frac{dN}{dt} = -\rho \cdot X \quad (5.2)$$

$$\frac{dq}{dt} = \rho - \mu \cdot q \quad (5.3)$$

$$\rho = \rho_{\max} \cdot \left(\frac{N}{N + k_N} \right) \quad (5.4)$$

$$\mu = \mu_m \cdot \left(1 - \frac{k_q}{q}\right) \quad (5.5)$$

$$q = \frac{N_{in} - N}{X} \quad (5.6)$$

Where X (biomass concentration, g L⁻¹), N (nitrogen concentration, g L⁻¹), q (internal nitrogen cell quota, gg⁻¹), ρ (nitrogen uptake rate, g g⁻¹ h⁻¹) and μ (biomass specific growth rate, h⁻¹); and four parameters: ρ_{max} (maximum nitrogen uptake rate, g g⁻¹ h⁻¹), k_N (half saturation constant for nitrogen, g L⁻¹), μ_{max} (maximum biomass specific growth rate, h⁻¹) and X_{max} (maximum biomass concentration, g L⁻¹). The internal nitrogen cell quota (q) was estimated from the difference between the initial nitrogen concentration and the nitrogen concentration in the culture medium over time (equation 5.6) (DA FRÉ et al., 2016).

However, as it will be shown in the Results section, Droop model failed to fit biomass growth and nitrogen consumption, probably because, at the culture conditions of high initial nitrogen concentration used in this study, growth was not limited by nitrogen starvation, but it was probably limited by the high final biomass concentration, due to the shadowing effect. Two models were used to describe this phenomenon. ModNXmax was successfully used to predict biomass formation and nitrogen consumption kinetics of *Dunaliella tertiolecta* growth in high initial nitrogen concentration medium and considers that nitrogen uptake rate is catalyzed by nitrogen concentration by an n-order reaction (DA FRÉ et al., 2016). ModNXmax is given by equations (5.1) and (5.2) and the following equations (5.7-5.9):

$$\rho = \left(\frac{\mu}{Y_{XN}} + m_N \right) \cdot N_{dl}^n \quad (5.7)$$

$$N_{dl} = \frac{N}{N_{ref}} \quad (5.8)$$

$$\mu = \mu_{max} \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \quad (5.9)$$

Where equation of ρ (nitrogen uptake rate, g g⁻¹ h⁻¹) is defined by μ (biomass specific growth rate, h⁻¹); Y_{XN} a growth-associated term of nitrogen uptake rate (g g⁻¹); a m_N non-growth-associated term (g g⁻¹ h⁻¹); N_{dl} dimension less nitrogen concentration and N_{ref} is the reference

nitrogen concentration (1 g L^{-1}). The estimations showed that n in equation (5.7) is approximately 1 (data not shown), thus n was simplified in the equation system.

Equation (5.9) is called Logistic equation (VERHULST, 1838) and is widely used to model population growth in a limited environment. The parameter X_{max} represents the carrying capacity of the environment (ARINO et al., 2006), i.e., the maximum biomass concentration limited by light availability. Finally, the Logistic equation was used to predict the specific growth rate in Droop model. The DroopLog model is given by equations (5.1-5.4, 5.6) and equation (5.9). The model parameters were estimated using EMSO software (SOARES and SECCHI, 2003).

5.2.4 Process optimization by repeated-batch cultures

The model that presented the best fitting to the experimental data was used to simulate the biomass growth and nitrogen consumption in repeated-batch cultivations using several dilution rates. The biomass productivity was determined for each condition using equation 5.10, where V_R is the renewal volume, X is the biomass concentration, t_R is the time between two batches and V is the PBR volume.

$$P_X = \frac{V_R X}{V t_R} \quad (5.10)$$

Experimental repeated-batch cultures were performed according to optimum productivities predicted by the simulations. The assays started as the batch cultures. After the initial growth, the repeated-batch mode started by withdrawing a definite volume of culture medium and replacing it with the same amount of new one, in 24-h or 48-h intervals. Before and after replacing the culture medium, liquid samples were collected to determine biomass concentration, total carotenoids and nitrate concentration in culture medium. The culture medium removed from the PBR was centrifuged and the biomass was washed twice and lyophilized for further analysis (protein, carbohydrates and lipids).

5.2.5 Analytical methods

Microalgae biomass, nitrate, total carotenoids, proteins and lipids were determined along the cultures. During the cultivation, biomass concentration was measured by optical density (750 nm) and correlated with dry cell weight (DCW). Daily samples of the PBRs were collected and centrifuged ($10,000 \times g$; 10 min), and the supernatant and the pellet were stored

separately ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$). The nitrate concentration was determined in the supernatant according to the method described by Cataldo et al. (1975). The total carotenoid content was determined spectrophotometrically by extracting cell pellets with ethanol (95 %) and a measure of absorbance at of 665 nm, 649 nm and 470 nm (LICHTENTHALER and BUSCHMANN, 2001). For total protein content determination, samples of the cell pellet were re-suspended in 1 mL of 1 M NaOH and boiled for 20 min of according to the adapted method described by Li et al. (2015). This solution was used for measure the protein content by Lowry method (LOWRY et al., 1951). Carbohydrates were determined after acid hydrolysis using 1 mL of sulfuric acid 80 % (v/v) during overnight, the sample was centrifuged ($10,000 \times g$, 10 min), and the supernatant was used for carbohydrate measurement by the phenol-sulfuric acid method (DUBOIS et al., 1956). The synthesis of total lipid was determined by sulpho-phospho-vanillin (SPV) method (MISHRA et al., 2014) using 200 μL volume of liquid culture to perform the analysis. The results were analyzed by Tukey test at 5 % significance level. The carbohydrate, protein and lipid contents were expressed in milligrams per gram of dry biomass (mg g^{-1}).

5.2.5.1 Determination of carotenoids by HPLC-DAD-MS/MS

The extraction was conducted according to the adapted method described by Mandelli et al. (2012). The carotenoids were exhaustively extracted from the freeze-dried biomass (20 mg) with 2 mL of ethyl acetate followed by extraction with 2 mL of methanol. The quantification of carotenoids was performed using a Waters HPLC 2695 series system (Wilmington, DE) equipped with a diode array detector (Waters 2998 dual series). The carotenoids were separated on a C₃₀ YMC column (5 μm , 250 x 4.6 mm i.d.) (Waters, Wilmington, USA) at a flow rate of 0.9 mL min^{-1} and column temperature at 29 $^{\circ}\text{C}$, using a linear gradient mobile phase of methanol/MTBE from 95:5 to 70:30 in 30 min, followed by 50:50 in 20 min and maintaining this proportion for 15 min (RODRIGUES et al., 2014). The carotenoids were quantified using a nine-point analytical curve of all-*trans*- β -carotene (0.13 to 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The analytical curve was linear ($R^2 = 0.998$), the detection limit was 0.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and the quantification limit was 2.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The carotenoid content was expressed in milligrams of carotenoids per gram of dry biomass (mg g^{-1}).

5.2.5.2 Determination of lipids and fatty acid methyl esters (FAMES)

The total lipid content was measured by the method described by Bligh and Dyer (1959), using 0.50 g of freeze-dried biomass. For FAME identification, the extracted lipids

were methylated with a 14 % BF_3 -methanol solution at boiling temperature for 30 min under an N_2 atmosphere following the method of Joseph and Ackman (1992). The fatty acids methyl esters were determined using gas chromatography (GC Model 2010, Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with automated sampler and injector, flame ionization detector and a capillary column of fused silica (Rtx-Wax, Restek, 30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness). The solvent used was hexane, and the injector temperature was set at 240 $^\circ\text{C}$. The carrier gas was H_2 at a constant flow of 1 mL min^{-1} . The detector flame ionization (FID) was set at 260 $^\circ\text{C}$ with an H_2 flow of 40 mL min^{-1} and air flow at 400 mL min^{-1} . The oven temperature was set at 50 $^\circ\text{C}$ for 1 min and then increased to 250 $^\circ\text{C}$ at a gradient of 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$.

The identification of each fatty acid was performed comparing the retention time with a standard mixture of fatty acid methyl esters (FAME-MIX 37 standard Sigma[®]). Moreover, the identification was confirmed by the injection of the sample in gas chromatography with mass spectrometer detector (GC-MS Model QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japan). The quantification of the fatty acids was performed according to the AOAC method (AOCS, 1997).

5.3 Results and Discussion

5.3.1 Optimum nitrogen concentration and kinetics of biomass growth and composition

The first set of experiments was performed to determine the optimum nitrogen concentration in culture medium for biomass production. The biomass increased gradually with nitrate concentration until 550 mg L^{-1} NaNO_3 (Table 5.1).

The highest biomass concentration (5.3 ± 0.2 g L^{-1}) and productivity (0.59 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$) was achieved in the ninetieth day of cultivation in the cultures with nitrogen concentration between 550 mg L^{-1} and 750 mg L^{-1} NaNO_3 , this value was 47 % higher than the one achieved in cultures with 300 mg L^{-1} to 400 mg L^{-1} NaNO_3 . Several factors may have affected the stabilization of the biomass production above 550 mg L^{-1} NaNO_3 , mainly light availability. During the culture, light availability decreases due to shadowing effect as biomass increases, negatively affecting biomass production (WU and MERCHUK, 2004). Unlike biomass concentration, the carotenoid content in the biomass did not present a significant difference between the cultures with nitrogen concentration between 300 mg L^{-1} and 600 mg L^{-1} NaNO_3 . A slight increase in carotenoid content was observed in the cultures with 600 mg L^{-1} NaNO_3 or more. Therefore, the concentration of 650 mg L^{-1} de NaNO_3 was defined for the further experiments.

The batch culture with 650 mg L⁻¹ NaNO₃ was repeated in triplicate for 17 days (408 h) to obtain sufficient data to estimate the model parameters to describe the kinetics of biomass growth and nitrogen consumption. At the end of the growth phase, the biomass concentration was 5.537 ± 0.003 g L⁻¹ with biomass productivity of 0.615 g L⁻¹ d⁻¹. The observed specific maximum growth rate (μ_{max}) reached 0.033 h⁻¹ while nitrogen was available in the culture medium. The biomass specific growth rate began to decelerate soon after the nitrogen depletion in the culture medium (± 96 h), nevertheless, biomass continued to grow until around 216 h of culture. This phenomenon of luxury absorption of nutrients and storage for further growth is well described in the literature, therefore, confirms the hypothesis that extracellular nitrogen concentration is not determinant for algal cell growth, but the intracellular nitrogen (DROOP, 1983).

Table 5.1. Biomass and total carotenoids content in biomass of *H. luteoviridis* grown in PBR, at 27 °C and 18.0 klx, under different of nitrogen concentrations

Nitrogen concentration (NaNO ₃) (mg L ⁻¹)	Biomass (g L ⁻¹)	Total Carotenoids (mg g ⁻¹)
300	3,75 ± 0,01 ^e	1,66 ± 0,09 ^d
350	3,96 ± 0,06 ^{de}	1,79 ± 0,04 ^{cd}
400	4,27 ± 0,04 ^{cde}	1,85 ± 0,05 ^{cd}
450	4,47 ± 0,05 ^{cd}	1,91 ± 0,15 ^{bcd}
500	4,70 ± 0,07 ^{bc}	2,00 ± 0,31 ^{abcd}
550	5,09 ± 0,16 ^{ab}	1,82 ± 0,08 ^{cd}
600	5,16 ± 0,02 ^{ab}	1,96 ± 0,10 ^{abcd}
650	5,26 ± 0,30 ^{ab}	2,06 ± 0,06 ^{abc}
700	5,39 ± 0,26 ^a	2,29 ± 0,08 ^a
750	5,61 ± 0,23 ^a	2,25 ± 0,06 ^{ab}

Averages of the repeated cultures (450; 600 mg L⁻¹ NaNO₃).

* Different letters in the same line are significantly different by Tukey test ($p < 0.05$).

The kinetics of the main biomass components (proteins, lipids, and carbohydrates) in addition to the carotenoids were strongly affected by nitrogen starvation (Figure 5.1a-b). The highest content of carotenoids and proteins (3.81 mg g⁻¹ and 274.8 mg g⁻¹) respectively, was achieved at 56 h of culture when nitrogen was still available in the culture medium.

However, carotenoids and proteins content began to decrease when nitrogen was depleted in the culture medium. In contrast, during the nitrogen starvation phase, there was a rapid increase in carbohydrate content, reaching 480 mg g⁻¹ in biomass. Only after that, around 250 h of culture, a progressive increase in lipid content was observed. Similar behavior of lipid kinetics was reported for *Chlorella vulgaris* and *Isochrysis zhangjiangensis* (IKARAN et al., 2015; WANG et al., 2014). Only a few studies present the kinetics of carotenoid accumulation

and its relationship with nitrogen concentration and other changes in cellular composition. Nitrogen is an important macronutrient, thus variations in its concentration cause not only changes in cell growth but also in cell composition (ÖRDÖG et al., 2012; ZHU et al., 2015). The decrease in protein synthesis in response to nitrogen deprivation is well described in the literature (IKARAN et al., 2015; ZHU et al., 2014). Microalgae are capable of fast changes in their metabolism; several authors report that cells under nitrogen stress use nitrogen-rich compounds such as proteins and chlorophylls to support growth processes (KIM, 2015; MULDER et al., 2014; WANG et al., 2014). Therefore, the use of intracellular nitrogen could explain the increase in biomass concentration after nitrogen starvation, generating biomass richer in carbon compounds, like carbohydrates and lipids.

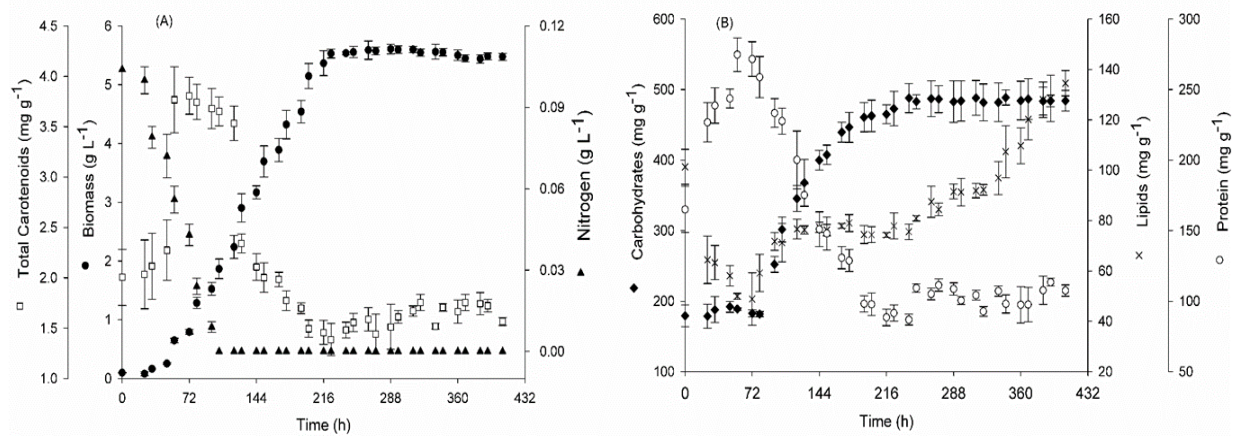


Figure 5.1. Cultivation of *H. luteoviridis* in photobioreactors enriched with CO₂ and nitrogen (650 mg L⁻¹ N-NO₃). (a): kinetics of biomass growth, total carotenoids and nitrogen consumption; (b) protein, lipid and carbohydrate contents in biomass during growth

5.3.2 Mathematical modeling

Droop model is widely used to model substrate-limited microalgae growth, whereas the logistic equation used in ModNXmax and DroopLog models, is used to predict the behavior of self-limiting growth. The results of the parameters estimation of Droop, DroopLog and ModNXmax models based on the experimental data are displayed in Table 5.2. In Figure 5.2, the experimental biomass and nitrogen curves are presented with the curves predicted by the different models.

Table 5.2. Results for model parameter values from the experimental data

Parameters	Unit	Droop	DroopLog	ModNXmax
μ_{\max}	h^{-1}	0.03446	0.03346	0.03348
ρ_{\max}	h^{-1}	0.6943	0.2833	-
k_N	g L^{-1}	3.011	4.842	-
k_q	g g^{-1}	0.01922	-	-
X_{\max}	g L^{-1}	-	5.550	5.548
Y_{XN}		-	-	41.01
m_N		-	-	0.07348
$R^2 X$		0.9939	0.9946	0.9946
$R^2 N$		0.7739	0.9964	0.9866
$R^2 q$		0.8531	0.7923	-

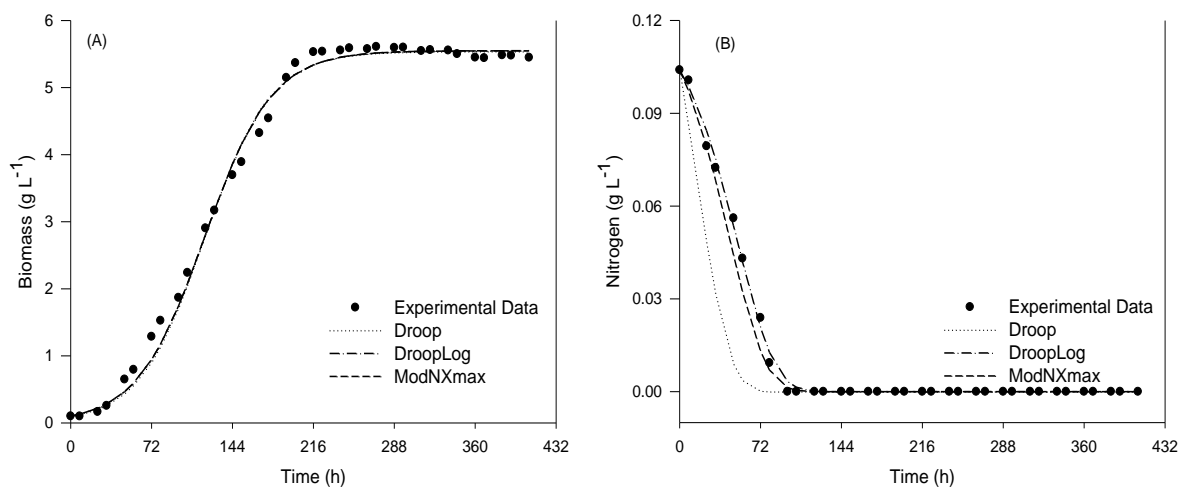


Figure 5.2. Model simulation results for (A) biomass concentration and (B) nitrogen concentration with time for experimental data and the tested models

All models were successfully capable of predicting *H. luteoviridis* growth (Figure 5.2a) and showed high value of the de R^2 , above 0.99. Moreover, the maximum specific growth rate estimated by all models (Table 5.2) was similar to the experimental average value ($\mu_{\max} = 0.033 \text{ h}^{-1}$).

However, regarding nitrogen data, Droop model was unable to describe the nitrogen data, as shown by its lack of data fitting ($R^2 = 0.8531$) (Figure 5.2b). On the other hand, the DroopLog model fitted well the behavior of nitrogen consumption curve, showing a good agreement to the experimental data, as indicated by its high determination coefficient ($R^2 = 0.9964$). This model uses the same principle of Droop model, using an auxiliary variable, the internal nitrogen cell quota q , to describe nitrogen consumption kinetics. Da Fré et al. (2016) also showed the inability of Droop model to predict nitrogen consumption kinetics in *Dunaliella tertiolecta* cultures grown under high nitrogen conditions. However, the ModNXmax model proposed by these authors was tested in this study but showed a lower fitting of nitrogen curve ($R^2 = 0.9866$) than the DroopLog model, proposed in this work.

5.3.3 Optimization experimental model repeated-batch

Following the modeling of the batch-culture data, the DroopLog model was used to simulate repeated batch cultures, testing several dilution rates, i.e., several renewal volumes at every 24 h or 48 h. The estimated biomass productivities are shown in Figure 5.3.

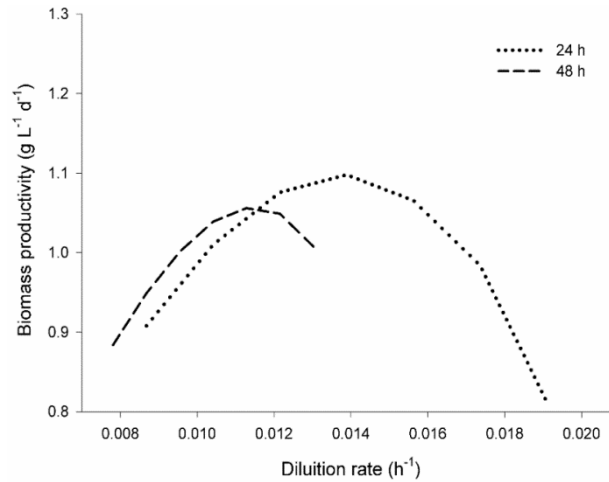


Figure 5.3. Biomass maximum productivity obtained per simulation of model of growth of population of *H. luteoviridis* with renovation rates of 0.009 up to 0.019 h⁻¹ and 0.008 up to 0.013 h⁻¹ for repeated batch cultivation

The highest predicted productivities were achieved with dilution rates of 0.014 h⁻¹ (renewal of 0.8 L every 24 h, biomass productivity 1.096 gL⁻¹ d⁻¹) and 0.011 h⁻¹ (renewal of 1.3 L every 48 h, biomass productivity 1.056 g L⁻¹ d⁻¹). Therefore, these two conditions were tested experimentally in bench-scale cultures, along with the condition that prevented nitrogen starvation dilution rate (dilution rate of 0.017 h⁻¹, renewal of 1.0 L every 24 h, biomass productivity 0.984 g L⁻¹ d⁻¹) aiming biomass with high protein and carotenoid content. The repeated-batch cultures enable biomass growth at a high stationary specific growth rate, helping to achieve a stable metabolic state. The dilution rate is a fundamental operational variable to optimize biomass productivity (BELLO et al., 2017).

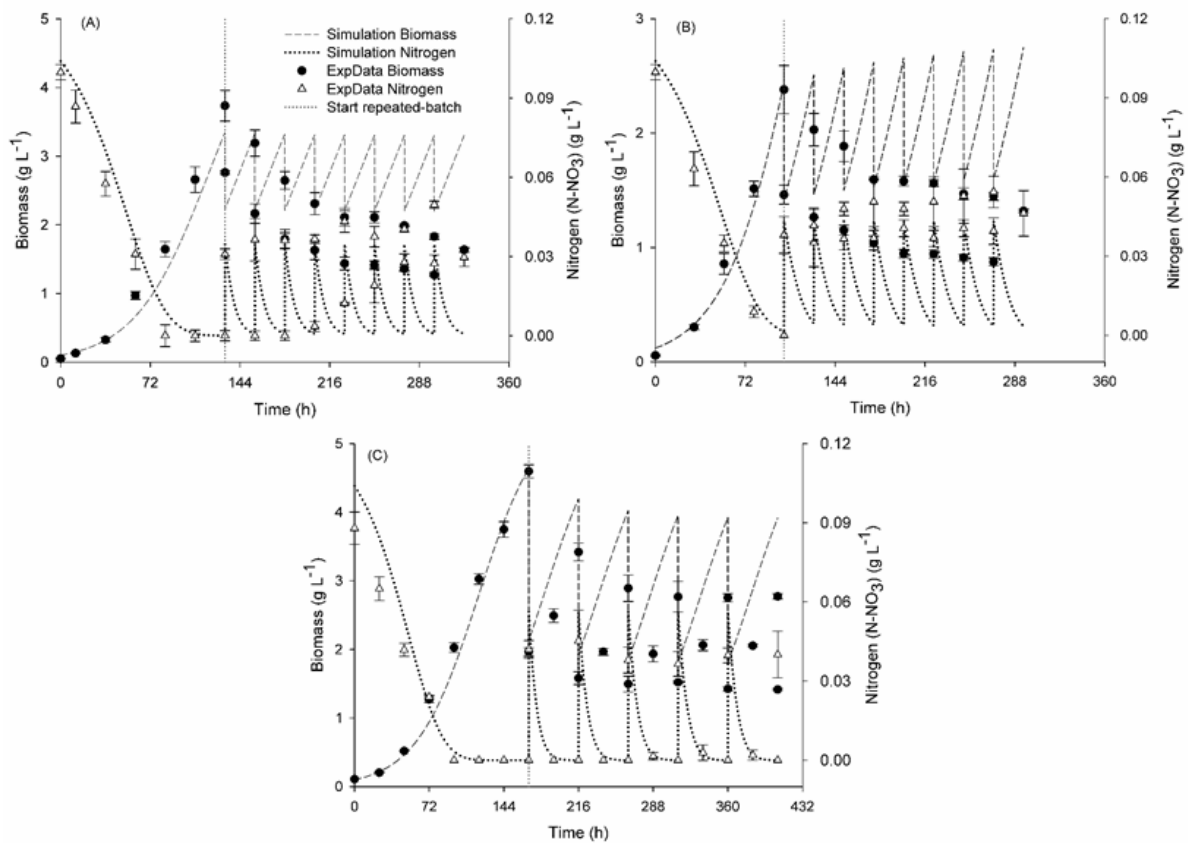


Figure 5.4. Growth kinetics and the consumption of nitrogen experimental and simulation *H. luteoviridis* in dilution rate of $0.8 \text{ L } 24 \text{ h}^{-1}$ (A), $1.0 \text{ L } 24 \text{ h}^{-1}$ (B) and $1.3 \text{ L } 48 \text{ h}^{-1}$ (C) for repeated batch cultivation

The experimental data of biomass growth and nitrogen consumption did not agree with the predicted values. The experimental biomass concentration at the end of each consecutively batch decreased in the $0.8 \text{ L } 24 \text{ h}^{-1}$ and $1.0 \text{ L } 24 \text{ h}^{-1}$ cultures, while nitrogen started to accumulate along the batches (Figures 5.4 a-b). High dilution rates, like those used in this study, result in low biomass concentration and avoid the self-shading effect, but must be supported by fast-growing cells (GRIMA and FEMTIDEZ, 1996). The decrease in the biomass concentration was expected due to the short residence time in the photobioreactor (CAMACHO-RODRÍGUEZ et al., 2015), however, it was expected to stabilize along the batches. To understand why biomass behavior was not as expected, biomass growth was monitored hourly during a cycle; it was observed the existence of a lag growth phase, which was not predicted by DroopLog model. The average specific growth rate during the 24 h cycle was 0.013 h^{-1} (data not shown), lower than the dilution rates applied in $0.8 \text{ L } 24 \text{ h}^{-1}$ and $1.0 \text{ L } 24 \text{ h}^{-1}$ cultures (0.014 h^{-1} and 0.017 h^{-1}), leading to biomass wash-out, i.e., the decrease in biomass

concentration due to a dilution rate (short residence time) higher than the specific growth rate (DISCART et al., 2014).

The experimental data of the kinetics of biomass concentration and nitrogen consumption of the repeated-batch cultures using dilution rate $1.3 \text{ L } 48 \text{ h}^{-1}$ are shown in Figure 5.4-c. The biomass concentration at the end of each cycle decreased until the third cycle and reached a steady state concentration ($2.79 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$) lower than the predicted one (3.29 g L^{-1}), due to the same lag phase observed in the $0.8 \text{ L } 24 \text{ h}^{-1}$ and $1.0 \text{ L } 24 \text{ h}^{-1}$ cultures. The experimental biomass productivity of $0.739 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, approximately 70 % of the value predicted by simulation, $1.056 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, was about 1.2 times higher than the one achieved at the end of growth phase during batch culture (Table 5.3). Moreover, unlike the growth data, the experimental data of nitrogen consumption was similar to the predicted values, i.e., the nitrogen was totally consumed during the consecutive batches.

The repeated-batch operation mode presents operational and economic advantages, such as the maintenance of a constant inoculum and growth rate, at the same time, that it is possible to regulate the feed rate of nutrients to optimize the productivity of biomass and composition (MATSUDO et al., 2009; WANG et al., 2015). Although mathematical modeling of batch culture was effective in the optimization of biomass productivity in repeated-batch cultivations, the model should be adjusted to improve the fitting at the beginning of the cultures.

Table 5.3 – Content and Productivity of biomass and biochemical composition of *H. luteoviridis* grown under repeated batch and batch cultivation

	Concentration		Productivity	
	Batch	Repeated Batch $1.3 \text{ L } 48 \text{ h}^{-1}$	Batch	Repeated Batch $1.3 \text{ L } 48 \text{ h}^{-1}$
Biomass	$5.54 \pm 0.00^a \text{ g L}^{-1}$	$2.79 \pm 0.03^b \text{ g L}^{-1}$	$0.62 \pm 0.000^b \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	$0.74 \pm 0.01^a \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$
Lipids	$130 \pm 1^a \text{ mg g}^{-1}$	$102 \pm 2^b \text{ mg g}^{-1}$	$79.7 \pm 0.6^a \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	$75.8 \pm 1.5^b \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$
Protein	$109 \pm 3^b \text{ mg g}^{-1}$	$214 \pm 3^a \text{ mg g}^{-1}$	$67.3 \pm 1.6^b \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	$158 \pm 3^a \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$
Fatty acids	$28.6 \pm 4.4^a \text{ mg g}^{-1}$	$33.9 \pm 0.3^a \text{ mg g}^{-1}$	$17.5 \pm 2.7^b \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	$25.1 \pm 0.2^a \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$
Total carotenoids	$1.47 \pm 0.18^b \text{ mg g}^{-1}$	$7.02 \pm 0.18^a \text{ mg g}^{-1}$	$0.90 \pm 0.11^b \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	$5.19 \pm 0.13^a \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Different lowercase letters indicate significant differences among the experimental groups (p -value < 0.05).

5.3.4 Effect of cultivation mode on biomass composition

The biomass composition of *H. luteoviridis* was deeply affected by cultivation mode (Table 5.3). The biomass protein content was almost doubled in the repeated-batch culture, reaching protein productivity of $158 \pm 3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, 2.3 times higher than in batch culture. It is known that nitrogen is essential for protein synthesis (IKARAN et al., 2015; ÖRDÖG et al., 2012) and nitrogen regularly supplied during the repeated-batch culture. On the other hand, for the same reason, lipid biosynthesis was inhibited under repeated-batch cultivation, once lipids biosynthesis and storage is generally associated with nitrogen starvation during microalgae cultivation (KIM, 2015; MULDER et al., 2014; YEH and CHANG, 2012; ZHU et al., 2015). Nevertheless, lipid productivity was similar between repeated-batch ($75.8 \pm 1.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) and batch culture ($79.7 \pm 0.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

The total carotenoids content in *H. luteoviridis* biomass cultured in repeated-batch mode ($7.02 \pm 0.18 \text{ mg g}^{-1}$) increased 4.8 times compared to the biomass from batch cultures ($1.47 \pm 0.18 \text{ mg g}^{-1}$), indicating that the periodic nitrogen supply affected positively carotenoids synthesis (Table 5.3). Thirteen carotenoids were identified in *H. luteoviridis* biomasses, indicating that culture mode had no effect over the carotenoid profile, under the conditions used in this study (Figure 5.5). The major carotenoids in *H. luteoviridis* biomass cultured under repeated-batch operation were all-trans-lutein, all-trans-violaxanthin, all-trans- α -carotene and all-trans- β -carotene, representing, respectively, around 27 %, 22 %, 13 % and 11 % (mass fraction) of the total carotenoid content. These are the same major carotenoids reported by Diprat et al. (2017) for *H. luteoviridis* grown in batch culture without the use of CO₂-enriched air. However, the carotenoid profile of the *H. luteoviridis* biomass from this study's batch cultures showed zeaxanthin instead of violaxanthin among the major carotenoids. In general, primary carotenoids such as lutein and violaxanthin were favored in repeated-batch cultivation probably due to the periodic nitrogen supply. The xanthophyll cycle, which involves the synthesis of zeaxanthin via conversion of violaxanthin, is favored during nitrogen starvation (JIN et al., 2003), which explains the low violaxanthin concentration (4.4 % of the total carotenoids) observed in *H. luteoviridis* biomass from batch culture.

Although the lutein proportion in total carotenoids was lower in repeated-batch than in batch cultures biomass, the amount of lutein ($1.85 \pm 0.13 \text{ mg g}^{-1}$) in repeated-batch biomass was about 3 times higher than the one from the batch one ($0.06 \pm 0.00 \text{ mg g}^{-1}$), presenting lutein productivity of $1.36 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Figure 5.5). Xanthophylls perform several functions in photosynthetic organisms; primary xanthophylls are associated mainly with photosynthetic

efficiency and cell growth. Therefore culture conditions that trigger growth, as nitrogen supply, may positively affect carotenoid synthesis (SCHÜLER et al., 2017; GARCÍA-CAÑEDO et al., 2016). This fact explains the lutein accumulation observed in the present study. A similar effect was observed for *Scenedesmus incrassatulus*, the lutein productivity was 1.4 times higher in fed-batch culture (nitrogen feeding) compared to batch culture (GARCÍA-CAÑEDO et al., 2016).

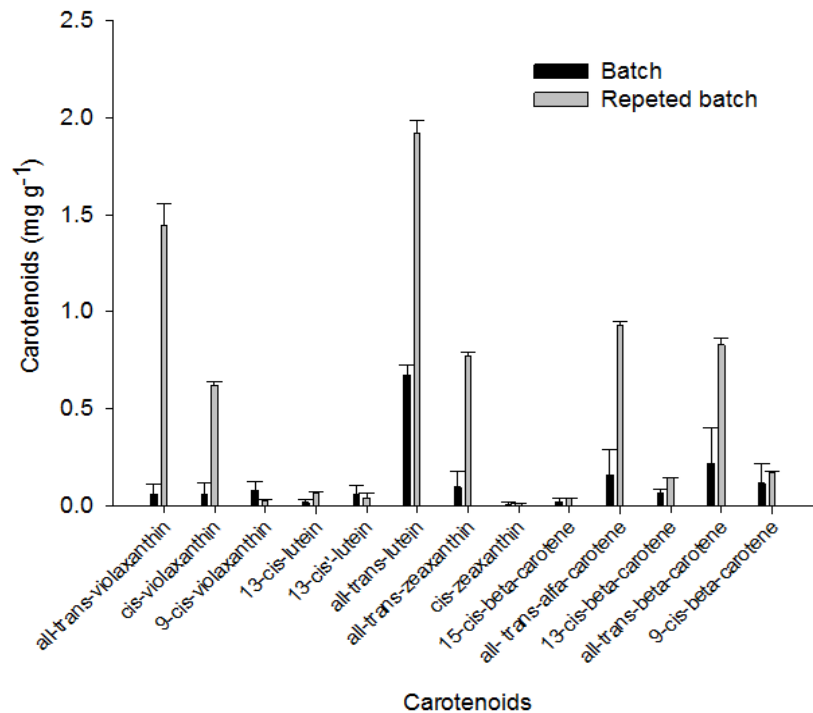


Figure 5.5. Concentration of the carotenoids of biomass of *H. luteoviridis* grown under dilution rate of 1.3 L 48 h⁻¹ for repeated batch and batch cultivation

Regarding to fatty acids (FA) composition, repeated-batch cultivation favored polyunsaturated fatty acids (PUFA) synthesis, mainly the α -linolenic acid (ALA, C18:3n-3), an omega-3 (ω 3) essential FA (Table 5.4), while saturated fatty acids (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA) were not affected by cultivation mode. In general, SFA and MUFA contents increase under stress conditions such as high intensity of light (HE et al., 2015), nutrient limitation such as nitrogen (YEH and CHANG, 2012; ZHU et al., 2015), and the combined effect of low nitrogen concentration and temperature (27-32 °C) (MENEGOL et al., 2017). In this experiment the PUFA fraction (15.9 ± 0.155) in biomass from repeated-batch cultures was about 42 % higher than one in biomass from batch cultures, with ALA content being about 3.2 times higher. The constant supply of nitrogen provided by the continuous culture mode of operation may explain this increase in PUFAs in this experiment. Several authors have observed that sufficient nitrogen supply showed a positive influence on the lipid composition, mainly on PUFA content in biomass (LI et al., 2008; MENG et al., 2015; KIM; MULDER et al., 2014).

Table 5.4. Concentration de fatty acids (Saturated fatty acids (STA); monounsaturated fatty acids (MUFA); polyunsaturated fatty acids (PUFA)) content of biomass of *H. luteoviridis* grown under dilution rate of 1.3 L 48 h⁻¹ for repeated batch and batch cultivation

	Batch (mg g⁻¹)	Repeated Batch 1.3 L 48 h⁻¹ (mg g⁻¹)
SFA	12.9 ± 1.90 ^a	13.7 ± 0.748 ^a
MUFA	4.31 ± 0.626 ^a	4.17 ± 0.168 ^a
PUFA	11.2 ± 1.81 ^b	15.9 ± 0.155 ^a
Essential FA		
LA	8.37 ± 1.33 ^a	8.14 ± 0.10 ^a
ALA	1.92 ± 0.339 ^b	6.17 ± 0.01 ^a
Ratio ω-6 - ω-3	4.37 ± 0.08	1.32 ± 0.02

Different lowercase letters indicate significant differences among the experimental groups (p -value < 0.05).

The content of the α -linoleic acid (LA, C18:2n-6), an essential omega-6 (ω 6) FA, was similar in both culture modes. However, the ω 6: ω 3 ratio (LA:ALA) was significantly lower in biomass from repeated-batch cultures (1.31 ± 0.01) compared to the one from batch culture (4.37 ± 0.08). A low ω 6: ω 3 ratio is well described in the literature as promoting benefits to human health (CALDER, 2008; SIMOPOULOS, 2002). Moreover, ALA is the precursor in the synthesis of eicosapentaenoic fatty acid (EPA, C20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3), which are important ω 3 fatty acids with nutraceutical and pharmaceutical applications (SCHÜLER et al. 2017; PALIWAL et al., 2017).

5.4 Conclusion

The microalga *H. luteoviridis* showed great potential to be used in biotechnological processes. Biomass concentration under autotrophic growth achieved 5.3 ± 0.2 g L⁻¹ in batch culture, and repeated-batch culture showed biomass productivity of 0.74 g L⁻¹ d⁻¹. The growth and nitrogen consumption kinetics were successfully modeled by the DroopLog model, proposed in this work, although the model should be improved to better describe the beginning of the growth curve. The mathematical simulation showed to be a useful tool to predict and optimize a repeated-batch culture based on batch results. Additionally, *H. luteoviridis* biomass from repeated-batch cultures was richer in proteins, carotenoids and omega 3 fatty acids.

This study shows that cultivation strategies as repeated-batch not only increase biomass productivity but also affect positively microalgae biomass composition. Other cultures strategies as fed-batch and continuous cultures should be carefully studied to improve biomass productivity and composition in microalgae processes.

CAPÍTULO 6 – CULTIVO CONTÍNUO DE *HETEROCHLORELLA LUTEOVIRIDIS* UTILIZANDO CO₂ DE FERMENTAÇÃO DO VINHO

Article 3. Continuous cultivation of *Heterochlorella luteoviridis* using CO₂ from wine fermentation

Tania Menegol, Carolina F. Gonçalves, Daniela V. Barros, Vitor Manfroi, Eliseu Rodrigues, Rosane Rech*

Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Phone 55 51 3308 1356

*E-mail: rrech@ufrgs.br

Abstract

This work presents an integrated process where the CO₂ generated during wine fermentation is used as carbon source for microalgae growth. Results of a study that used a phenomenological model of *Heterochlorella luteoviridis* growth in batch culture was implemented for a continuous process and used to predict the dilution rate to maximize microalga biomass productivity. Continuous experiments were performed using the predicted dilution rate (0.401 d⁻¹). The microalgae cultures were enriched with CO₂ provided by wine fermenters coupled to the photobioreactors. Two volume ratios between the photobioreactors and the wine fermenters were tested (5.0:1 and 2.5:1), along with a control culture with commercial CO₂. Biomass concentration and productivity of the 2.5:1 culture (2.73 ± 0.03 g L⁻¹ and 1.09 ± 0.01 g L⁻¹ d⁻¹) were similar to the predicted ones (2.80 g L⁻¹ and 1.11 g L⁻¹ d⁻¹) and higher than the ones from 5.0:1 and CC control cultures. The biomass from the continuous cultures also showed higher contents of protein (254 ± 6 mg g⁻¹) and carotenoids (5.67 ± 0.17 mg g⁻¹) compared to the biomass from batch cultures reported in the literature. Our results showed the feasibility of an integrated process between microalgae culture and wine fermentation, as well the importance of mathematical models in predicting and optimizing processes.

Keywords: mathematical modeling; continuous culture; carotenoids; fatty acids

6.1 Introduction

Carbon dioxide (CO₂) is among the major gases generated by extensive anthropogenic action. In particular, about 65 % of the sources of CO₂ emissions come from the burning of fossil fuels and industrial processes (IPCC, 2014). In an attempt to reduce CO₂ emissions by

the burning of fossil fuels, new technologies are employed, such as biofuels, solar and wind power, fuel cells to reduce atmospheric emissions, processes such as CO₂ capture and storage and gas conversion in chemical products (ALONSO-MORENO and GARCÍA-YUSTE, 2016). However, capture and storage methodologies by employing physical and chemical methods often require large investments, which makes them economically challenging, as well as risks due to leakage over time (ZHAO; SU, 2014).

Researches developed since the middle of the 20th century reveal that microalgae are promising technology for CO₂ mitigation (YEN et al., 2013). These microorganisms have high photosynthetic efficiency in the CO₂ bioconversion (CHEAH et al., 2015). The production of 100 t of microalgae biomass is capable of fixing 1.83 t of CO₂ (CHISTI, 2007). In addition, the cycle of CO₂ use by microalgae does not generate any additional emissions of this gas (YEN et al., 2013a).

Although, microalgae are widely exploited for the CO₂ bioconversion of flue gases from industrial processes (SUN et al., 2015; WANG et al., 2008; ZHAO; SU, 2014), CO₂ from other industrial sources, such as the beverage industry, are still little explored. The ethanol production in beverages such as wine and beer represents only a small fraction of CO₂ emissions, about 19.4 million tons (Mt), but generates a CO₂ stream with high purity (ALONSO-MORENO and GARCÍA-YUSTE, 2016). Recently, *Dunaliella tertiolecta* was successfully cultivated using CO₂ from beer fermentation (CHAGAS et al., 2015).

More recent research focuses on the ability of microalgae to produce high-value bioproducts such as polyunsaturated long chain fatty acids (PUFAs), proteins and carotenoids (ÖRDÖG et al., 2013). Proteins from microalgae are considered of high quality, as they are source of essential amino acid, with promising use by the pharmaceutical industry (KHANRA et al., 2018). Algal carotenoids have great potential for application in the health, pharmaceutical, cosmetic and food industries (GONG and BASSI, 2016; RIO-CHANONA et al., 2017), especially lutein. Lutein from microalgae is exclusively found in *Chlorophyta* and in some green *Dinophyta* (MULDERS et al., 2014) and it is the major carotenoid found in *Heterochlorella luteoviridis* biomass (DIPRAT et al., 2017; MENEGOL et al., 2017). Lutein has great potential for the food, cosmetics, and pharmaceutical industries. It is estimated that the market demand for carotenoids reached 309 million dollars in 2018 (RIO-CHANONA et al., 2017).

Regulation of biomass production and microalgae metabolism for the production of these compounds is highly dependent on the culture conditions (ADESANYA et al., 2014). Several studies indicate that continuous cultures have some advantages over batch cultivation, among them the higher volumetric yields, lower investments in operation and uniform biomass composition. However, continuous operations are considered complex due to factors such as reactor hydrodynamics, substrate consumption and product formation in addition to photosynthetic capture. Studies have shown that mathematical models capable of predicting the dynamics of microalgae cultures under different growth conditions helps in optimizing process performance and operating conditions (FERNANDES et al., 2015).

Optimizing the execution process within a control scheme can dramatically improve process profitability (RIO-CHANONA et al., 2017). Traditionally, kinetic modelling based on the Droop, Monod and Logistic models has been used to predict algal growth in response to substrate concentration, such as nitrogen (ADESANYA et al., 2014). However, it is fairly recent the use of mathematical modelling in predictive control and optimization of cultivation of microalgae, which opens large field for research, especially, in the sense to build robust models capable of predicting with the greatest possible precision, the dynamics of continuous photoautotrophic production system, long-term, for growth of microalgae and production of lutein throughout the process (SUN et al., 2015).

This work proposes the use of CO₂ from wine production as carbon source for *H. luteoviridis* cultivation. A phenomenological model was used to determine the optimal dilution rate for biomass production in continuous culture. The microalga culture was integrated to wine fermenters, testing different volume ratios. Finally, the microalgae biomass was characterized to its protein, lipids, fatty acids and carotenoids contents.

6.2 Materials and Methods

6.2.1 Computer simulation and optimization of the continuous culture

Before the bench-scale experiments, the continuous culture of *Heterochlorella luteoviridis* was simulated and optimized for maximal biomass productivity using the DroopLog model, proposed by Menegol et al. (unpublished results), to describe the kinetics of biomass growth and nitrogen consumption. DroopLog model is based on the classic Droop model (DROOP, 1968), replacing the expression for biomass specific growth rate by a logistic

equation. The DroopLog model applied for a continuous culture is described by the following equations (6.1 – 6.5):

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D)X \quad (6.1)$$

$$\frac{dN}{dt} = D(N_F - N) - \rho X \quad (6.2)$$

$$\frac{dq}{dt} = \rho - \mu X \quad (6.3)$$

$$\rho = \rho_{max} \frac{N}{N + k_N} \quad (6.4)$$

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \quad (6.5)$$

The DroopLog model has five variables: X (biomass concentration, g L^{-1}), N (nitrogen concentration, g L^{-1}), q (internal nitrogen cell quota, g g^{-1}), ρ (nitrogen uptake rate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) and μ (biomass specific growth rate, h^{-1}); and four parameters: ρ_{max} (maximum nitrogen uptake rate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$), k_N (half saturation constant for nitrogen, g L^{-1}), μ_{max} (maximum biomass specific growth rate, h^{-1}) and X_{max} (maximum biomass concentration, g L^{-1}). The DroopLog model has also two specified variables: D (dilution rate, h^{-1}) and N_F (nitrogen concentration in the feed stream, g L^{-1}). The model parameters estimated for a batch culture of *H. luteroviridis* grown under the same conditions applied in this study are shown in Table 6.1. The five equations of DroopLog model were implemented in EMSO software (Environmental for Modelling, Simulation and Optimization) for optimization and simulation steps (SOARES; SECCHI, 2003).

Table 6.1. Parameters estimated for DroopLog model (Menegol et al., results not published)

Parameters	Value
ρ_{max}	0.2833 h^{-1}
k_N	4.842 g L^{-1}
μ_{max}	0.03346 h^{-1}
X_{max}	5.550 g L^{-1}

Firstly, DroopLog model was used to maximize biomass productivity of a continuous process using the EMSO Optimization entity. Along with DroopLog model equations, an additional expression for biomass productivity (P_X , $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) was used:

$$P_X = D \cdot X \quad (6.6)$$

The optimization was performed using the parameters of Table 6.1, N_F of 0.104 g L^{-1} , considering steady-state ($dX/dt = 0$; $dN/dt = 0$; $dq/dt = 0$) and freeing D .

After the optimization step, the estimated D value was used to simulate a continuous culture. The simulation started as a batch culture, followed a continuous feeding. The values of the specified variables and the start values of the dynamic variables are shown in Table 6.2.

Table 6. 2.Values for the specified variables and start values for the dynamic variables for the continuous simulation of *H. luteoviridis* culture

Variables	Batch	Continuous
	(0 h – 168 h)	(168 h – 408 h)
Specified variables		
D (h^{-1})	0	0.0167
N_F (g L^{-1})	0.104	0.104
Start values of dynamic variables		
X (g L^{-1})	0.100	4.635
N (g L^{-1})	0.104	0
q (g g^{-1})	0.020	0.0223

6.2.2 Cultivation of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* in continuous operation mode using CO_2 from alcoholic fermentation.

This study used the microalgae *Heterochlorella luteoviridis* BE002, originally isolated by the Department of Marine Biology of the Fluminense Federal University (Niterói, Rio de Janeiro, Brazil). The culture stock is maintained in f/2 medium with sea water (GUILLARD; RYTHER, 1962) at $22 \text{ }^\circ\text{C}$. The pre-culture was grown in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 270 mL of culture medium and 30 mL of the microalga from the culture stock. The culture medium was modified f/2 medium ($300 \text{ mg L}^{-1} \text{ NaNO}_3$) (MENEGOL et al., 2017). The cultures were maintained on a rotary shaker at $28 \text{ }^\circ\text{C}$ under a constant illumination of $50 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, for 7 days.

The assays were conducted in duplicate in flat-plate airlift photobioreactors (PBRs) with 2.4-L working volume (KOCHEM et al., 2014), continuously illuminated at $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the riser side and airflow rate of 1 L min^{-1} . The PBRs containing 2.16 L of modified f/2 medium (0.650 g L^{-1} of NaNO_3) (MENEGOL et al., 2017) were inoculated with 240 mL of inoculum as specified above. The culture started as batch culture until the end of the growth phase (168 h), then the process was changed to continuous mode, with constant feed rate (F) of 0.96 L d^{-1} of modified f/2 medium (0.650 g L^{-1} of NaNO_3) using peristaltic pumps (Watson-Marlow model 120U/DM3). The feed rate was determined from the dilution rate estimated for maximum biomass productivity, as described in the previous section, using equation (6.7), where V is the PBR working volume.

$$F = D \cdot V \quad (6.7)$$

During the batch phase, the airflow was enriched with synthetic CO_2 , whose flow was adjusted to maintain the culture pH around 7.0. During the continuous operation, the CO_2 source was from wine fermentation; every 24 h a new wine fermenter was started, and each fermenter remained coupled to the PBRs for 48 h., i.e., there were always two wine fermenters coupled to each PBR. The CO_2 generated during the ethanol production was directly bubbled into the PBRs. In this system the amount of CO_2 delivered to the photobioreactor depends on the ratio between the photobioreactor volume (V_{PBR}) and the wine fermenter (V_{wine}). Two $V_{PBR}:V_{wine}$ ratios were tested: 5:1 and 2.5:1, wine fermenter volumes of 480 mL and 960 mL, respectively. A control photobioreactor aerated with CO_2 -enriched air was also performed. All cultures were done in duplicate. The cultures were daily supplemented with 1 mL L^{-1} of trace-metals and 1 mL L^{-1} of phosphate solutions. The cultures ended soon after reaching the steady-state, at 10 days of continuous operation mode. Daily samples were collected to determine biomass and nitrogen concentrations. During the continuous operation, the exit streams from the PBRs were collected in refrigerated dark flasks. Every 24 h, the accumulated exit stream was centrifuged and lyophilized for further analysis.

6.2.3 CO_2 production from wine fermentation

Wine production was performed using commercial pasteurized grape juice without preservatives (produced in the state of Rio Grande do Sul – Brazil) and commercial lyophilized *Saccharomyces cerevisiae* (Blastosel FT 95®, Verona, Italy). The yeast was weighed

aseptically (0.04 g L^{-1}) in sterile 0.5 L e 1 L flasks and hydrated with 2 mL of sterile distilled water for 30 min. After the hydration time, the juice amounts of 480 mL and 960 mL of juice were added to the flasks (0.5 L and 1.0 L respectively). The flasks were closed with a silicone cap with a gas exit connected to a silicone tube (1.5 mm internal diameter) to bubble the CO_2 directly into the PBRs. To determine CO_2 production kinetics, the wine fermentation was performed in triplicate, and samples were taken at 3-h intervals for ethanol and glucose determinations. The CO_2 production was estimated stoichiometrically, considering that 1 mol of CO_2 is formed for each 1 mol of ethanol produced. The kinetics CO_2 production was derived to obtain the CO_2 production rate during fermentation (CHAGAS et al., 2015).

6.2.5 Analytical methods

During the cultivation, biomass concentration was measured by optical density (750 nm) and correlated with dry cell weight (DCW). Daily samples of the PBRs were collected and centrifuged ($10,000 \times g$; 10 min), and the supernatant and the pellet were stored separately ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$). The nitrate concentration was determined in the supernatant according to method described by Cataldo et al. (1975). For total protein content determination, samples of the cell pellet were re-suspended in 1 mL of 1 M NaOH and boiled for 20 min of according to the adapted method described by Li et al. (2015). This solution was used for measure the protein content by Lowry method (LOWRY et al., 1951). The lipids, carotenoids identification and fatty acid methyl esters (FAMEs) quantification were performed in the lyophilized biomass. The total lipids were analyzed of according to the adapted method described by Bligh and Dyer, (1959) using 0.5 g of biomass. The extracted lipids were used for FAMEs identification and quantification according to method described by Menegol et al. (2017) using a capillary column of fused silica (Rtx-Wax, Restek, $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.}$, $0.25 \text{ } \mu\text{m}$ film thickness). Determination of carotenoids was conducted according to the method described by Menegol et al. (2017). The results were analyzed by Tukey test at 5 % significance using Statistica 12 software.

6.3 Results and Discussion

6.3.1 Kinetics of CO_2 production from alcoholic fermentation in wine production

During the wine fermentation, the CO_2 production started between 3 and 6 h of fermentation, and the rate of CO_2 production increased quickly reaching $2.31 \pm 0.13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at

21 h of fermentation, followed by a decrease and reaching zero at 36 h. The total CO₂ produced was 51.9 ± 0.6 g for every 1 L of wine at 36 h of fermentation (Figure 6.1). To maintain the CO₂ supply over the continuous cultivation of *H. luteoviridis* a new wine fermenter was coupled to the PBR every 24 h and remained for 48 h, so there were always two wine fermenters coupled to each PBR, with a 24-h delay between them.

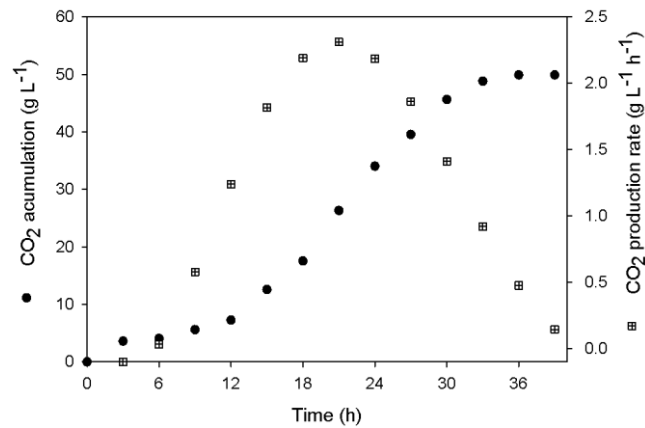


Figure 6.1. Kinetics of CO₂ accumulated and CO₂ production rates from wine production

6.3.2 Continuous culture of *Heterochlorella luteoviridis* using CO₂ from alcoholic fermentation

The mathematical optimization of a steady-state continuous culture based on DroopLog model for maximizing biomass productivity resulted in a dilution rate (D) of 0.0167 h^{-1} (0.401 d^{-1}), with a predicted biomass productivity of $0.0464 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($1.11 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

This dilution rate was used to simulate continuous cultures using the DroopLog model, as well as to perform bench-scale microalgae cultures. The CO₂ for *H. luteoviridis* growth was provided by wine fermenters. Two different ratios between the PBR volume and the wine fermenter volume ($V_{PBR}:V_{wine}$) were tested (5.0:1 and 2.5:1) as well as a control culture using air enriched with commercial CO₂, as shown by the scheme in Figure 6.2.

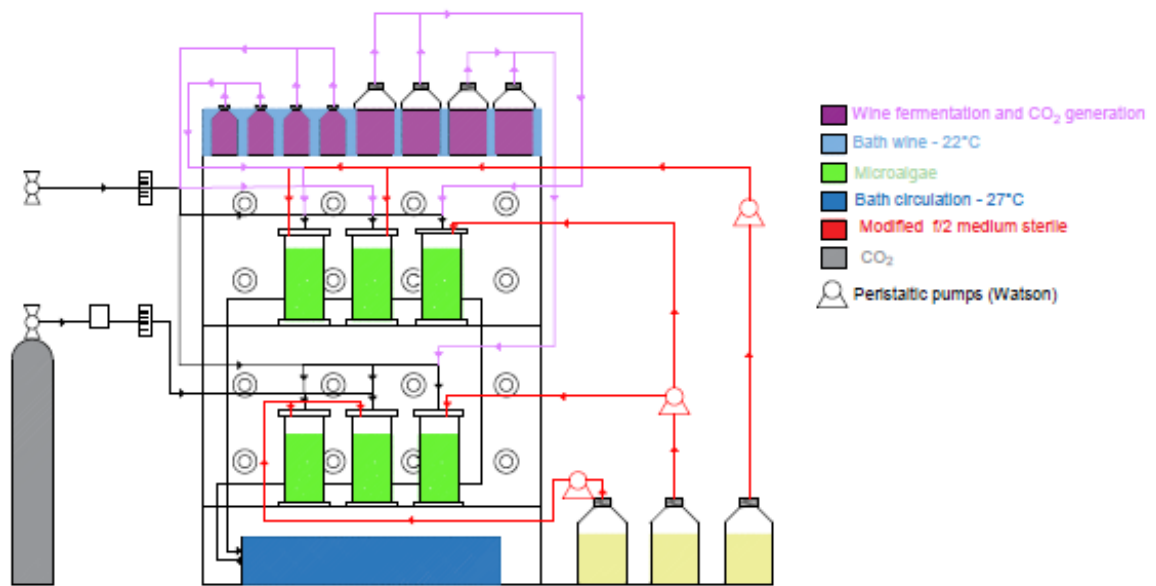


Figure 6.2. Schematic design of the integrated system between photobioreactors and wine fermenters

The experimental results of biomass and nitrogen kinetics along the continuous cultures agreed well with the behaviour predicted by DroopLog model (Figure 6.3), both qualitatively and quantitatively. The maximum standard deviation between the predicted and experimental biomass, during the last three days of culture, were 0.33 g L^{-1} , 0.25 g L^{-1} and 0.07 g L^{-1} , for control culture (CC), $V_{PBR}:V_{wine} 5.0:1$ (R_{5.0:1}) and $V_{PBR}:V_{wine} 2.5:1$ (R_{2.5:1}) cultures, respectively. This result indicates that R_{2.5:1} culture showed a slight closeness to the predicted values. Overall, the use of a mathematical model developed for a batch culture was successfully applied to optimize a continuous culture, predicting the experimental results with very low error.

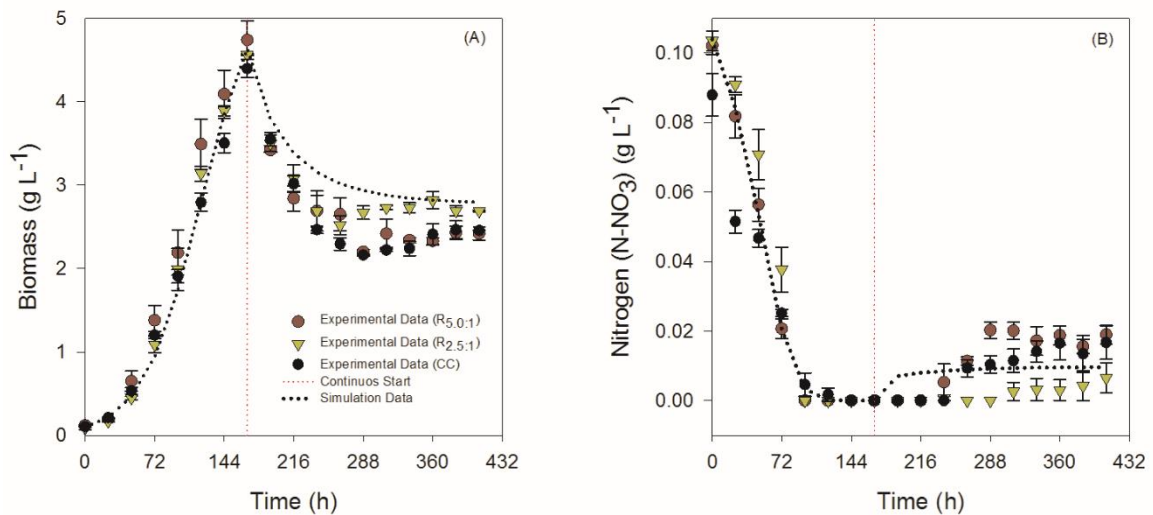


Figure 6.3. Biomass (A) and Nitrogen (B) concentration during continuous cultivation of *H. luteoviridis* ($D = 0.401 \text{ d}^{-1}$) in photobioreactors enriched with commercial CO_2 (CC) and CO_2 from wine fermentation using $V_{PBR}:V_{wine} = 5.0:1$ ($R_{5.0:1}$) and $V_{PBR}:V_{wine} = 2.5:1$ ($R_{2.5:1}$)

Regarding CO_2 source, the use of CO_2 from wine fermentation was at least as efficient as commercial CO_2 for biomass growth and productivity (Table 6.3). There was no significant difference in biomass concentration and productivity between CC and $R_{5.0:1}$ cultures, and $R_{2.5:1}$ presented significant higher values for these parameters (biomass concentration $2.73 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ and productivity $1.09 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), very close to the ones predicted by DroopLog model. The CO_2 source, alcoholic fermentation of sugarcane molasses or commercial CO_2 , had also no effect on biomass productivity in continuous culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (MATSUDO et al., 2011). Chagas et. al (2015) studied the effect of CO_2 from alcoholic fermentation of different glucose concentrations (20, 40 or 60 g L^{-1}) in YPD medium and beer production in batch cultures using *Dunaliella tertiolecta*, and achieved higher productivities, between 0.16 and $0.22 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, in the cultures with different strategies of biological CO_2 usage compared to the control culture without CO_2 ($0.11 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

Table 6.3. Results for biomass concentration and biomass productivity obtained in this work for *H. luteoviridis* grown under continuous cultivation ($D = 0.401 \text{ d}^{-1}$), and comparison with other reports

Culture	Biomass Concentration (g L^{-1})	Biomass Productivity ($\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	Reference
CC	2.44 ± 0.07^c	0.98 ± 0.03^b	This work
R5.0:1	2.39 ± 0.05^c	0.96 ± 0.02^b	This work
R2.5:1	2.73 ± 0.03^b	1.09 ± 0.01^a	This work
DroopLog model	2.80	1.11	This work
Batch culture	5.54 ± 0.00^a	0.62 ± 0.00^d	Menegol et al. (unpublished)
Repeated-batch culture (1.3 L/48 h)	2.79 ± 0.03^b	0.74 ± 0.01^c	Menegol et al. (unpublished)

The values refer to the average of the last three days in steady state cultivation.

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences by Tukey test ($p\text{-value} < 0.05$).

Some authors reported differences in biomass growth or even growth inhibition linked pH changes in the culture medium when supplying the culture with different CO_2 concentrations, which can hinder nitrate assimilation by microalgae (RUANGSOMBOON; PRACHOM; SORNCHAI, 2017; SHENE et al., 2016). In this study, the CO_2 supply of the CC was adjusted to maintain the culture pH in 7.0. However, the pH of the R_{5.0:1} and R_{2.5:1} cultures were not controlled; the biological CO_2 generated during wine production was injected directly into the PBRs (Figure 6.4). During the continuous culture, the pH values of R_{5.0:1} and R_{2.5:1} decreased until 6.5 indicating that CO_2 supply was higher in R_{5.0:1} and R_{2.5:1} cultures than in the control one (Figure 6.5).

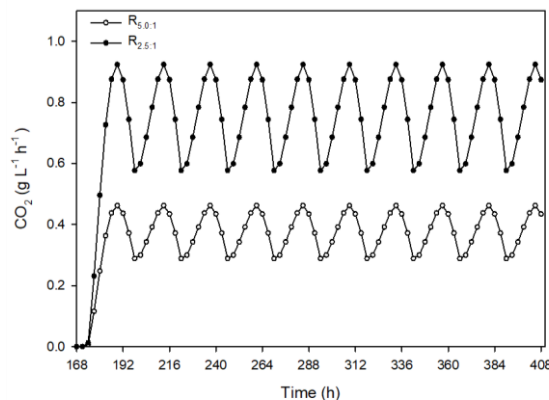


Figure 6.4. Estimated profile of CO_2 form vine fermentation for R_{5.0:1} and R_{2.5:1} cultures during continuous cultivation of *H. luteoviridis* in photobioreactors. The results are in grams per hour of CO_2 that enters in 1 L of photobioreactor ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

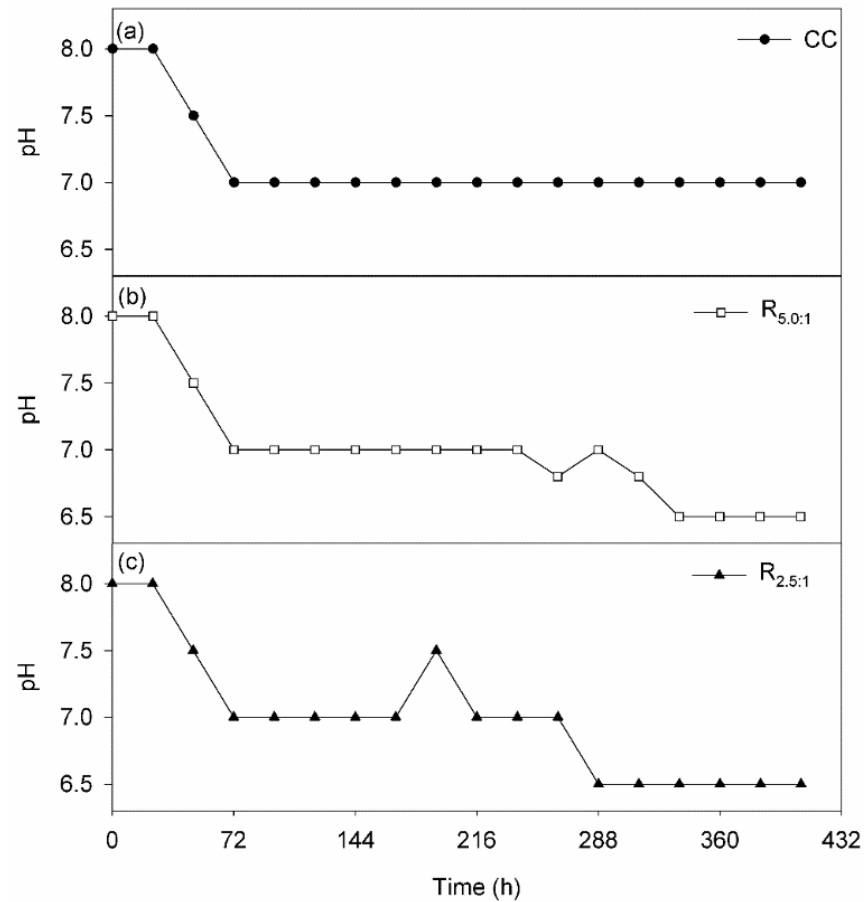


Figure 6.5. Measurement of pH during continuous cultivation of *H. luteoviridis* in photobioreactors enriched with (a) commercial CO₂ (CC) and CO₂ from wine fermentation using (b) $V_{PBR}:V_{wine} = 5.0:1$ (R_{5.0:1}) and (c) $V_{PBR}:V_{wine} = 2.5:1$ (R_{2.5:1})

The slightly acid pH during the continuous phase did not impair biomass growth. Some mechanisms are suggested to explain the microalgae's ability to tolerate low pH and maintain its metabolic processes: (1) the cytoplasmic pH is kept neutral by a decrease in cations uptake rate and an increase in anions uptake rate; (2) the anions nitrate and phosphate can directly neutralize excess H⁺ within the cell (RAI; RAI; MALLICK, 1996; RUANGSOMBOON; PRACHOM; SORNCHAI, 2017).

Continuous cultures (R_{2.5:1}) also showed biomass productivity 43 % and 32% higher than the ones achieved in batch and repeated-batch cultures, respectively. In general, several microalgae tend to show higher productivity in continuous or semi-continuous cultures when compared to batch cultures (BENVENUTI et al., 2016; CARVALHO, MALCATA, 2005). In continuous cultures under an adjusted dilution rate, cell concentration can be maintained around

an optimal value, allowing to maintain irradiance permanently at a specific level that allows high specific growth rate. Therefore these cultures are not limited light and present high productivities (FERNANDES et al., 2015; HO et al., 2014).

6.3.2 Biomass composition of *H. luteoviridis* grown in continuous cultures using CO₂ from alcoholic fermentation

Continuous cultivation allows not only to increase biomass productivity and but also obtain a biomass with constant composition (FERNANDES et al., 2015). The biomass composition in terms of lipids, fatty acids, carotenoids and proteins was similar between CC and R_{5.0:1} cultures, while R_{2.5:1} showed lower fatty acids and higher protein contents compared to CC (Table 6.4). These results are probably linked to differences in CO₂ availability during the cultures. Although the importance of nitrogen for protein synthesis is clearly known (SAN PEDRO et al., 2013), a balanced of C:N ratio improves protein synthesis in microalgae biomass (VENKATA SUBHASH et al., 2017), explaining the highest protein content ($254 \pm 6 \text{ mg g}^{-1}$) in the biomass from the culture with the highest CO₂ supply (R_{2.5:1}).

There was no significant difference in total carotenoids content in the biomasses from the different continuous cultures, and the value was similar to the carotenoid content of *H. luteoviridis* biomass from a repeated-batch culture and higher than the one from a batch culture.

However, carotenoid productivity of continuous cultures ($5.98 - 6.84 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) were 86 % and 24 % higher than the ones achieved in batch and repeated-batch cultures respectively. This higher carotenoid productivities are linked to the higher biomass productivities of continuous cultures. The main carotenoids in the biomasses were all-trans-violaxanthin, lutein and α -carotene representing small concentration variations between 21-23 %, 25-26 % and 13-16 % (mass fraction) respectively (Figure 6.6). This carotenoid profile is slightly different of the ones reported by Diprat et al. (2017) and Menegol et al. (2017), were a high content of zeaxanthin, instead of violaxanthin, was found.

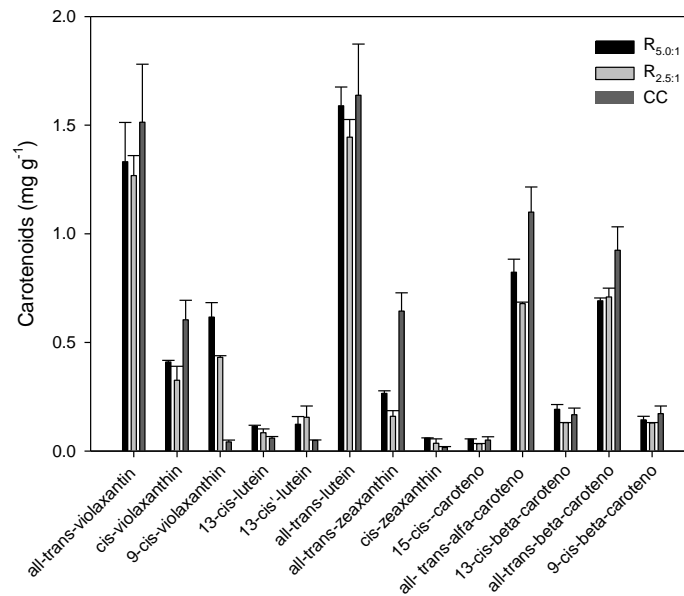


Figure 6.6. Carotenoid profile in *H. luteoviridis* biomass grown under continuous cultivation ($D = 0.401 \text{ d}^{-1}$) in photobioreactors enriched with commercial CO_2 (CC) and CO_2 from wine fermentation using $V_{PBR}:V_{wine} = 5.0:1$ ($R_{5.0:1}$) and $V_{PBR}:V_{wine} = 2.5:1$ ($R_{2.5:1}$)

The synthesis of primary carotenoids is related to exponential growth (GONG and BASSI, 2016), when there is no nutrient deficiency. In continuous culture, this condition is reached when the culture reached steady state, therefore $\mu = D$. As shown in Figure 6.3, the cultures remained steady state and nitrogen was not depleted in the culture medium. Thus, continuous cultures with regular supply of nutrients are suitable to maximize the productivity of primary carotenoids like lutein.

The carotenoids, protein productivity in continuous cultures was about 4 times higher than the productivity achieved in batch culture. This increase was clearly linked to the continuous supply of nitrogen in continuous cultures. Additionally, in batch cultures, the proteins related to photosystem II are commonly damaged by nitrogen limitation, decreasing its content (REMMERS et al., 2017).

Despite the lower lipid content, continuous cultures showed the highest productivities for each biomass component (Table 6.4). The lipid productivity in continuous cultures was higher (28 % and 32 %) when compared to batch and repeated-batch cultures, respectively. Similar results were reported by Wen et al. (2014) when cultivating *Chlorella pyrenoidosa*. The authors observed a 33 % increase in lipid productivity of the continuous culture

(96.28 mg L⁻¹ d⁻¹), compared to batch productivity. It was suggested that continuous cultures can simultaneously maintain biomass growth and lipid accumulation.

Table 6.4. Results for lipids, fatty acids, carotenoids and proteins contents and productivities obtained in this work for *H. luteoviridis* grown under continuous cultivation ($D = 0.401 \text{ d}^{-1}$), and comparison with other reports

Culture	Content				Productivity				Reference
	Carotenoids	Protein	Lipids	Fatty acids	Carotenoids	Protein	Lipids	Fatty acids	
	(mg g ⁻¹)	(mg g ⁻¹)	(mg g ⁻¹)	(mg g ⁻¹)	(mg L ⁻¹ d ⁻¹)	(mg L ⁻¹ d ⁻¹)	(mg L ⁻¹ d ⁻¹)	(mg L ⁻¹ d ⁻¹)	
CC	6.98 ± 1.00 ^a	228 ± 5 ^{bc}	097 ± 4 ^c	48.4 ± 1.7 ^a	6.84 ± 0.98 ^a	223 ± 01 ^b	095 ± 7 ^b	47.4 ± 1.6 ^a	This work
R5.0:1	6.23 ± 0.43 ^{ab}	241 ± 11 ^{ab}	102 ± 3 ^{bc}	44.6 ± 6.8 ^{ab}	5.98 ± 0.41 ^{ab}	231 ± 07 ^b	101 ± 3 ^b	42.6 ± 5.8 ^a	This work
R2.5:1	5.67 ± 0.17 ^b	254 ± 6 ^a	105 ± 3 ^b	37.0 ± 1.7 ^{bc}	6.18 ± 0.19 ^{ab}	277 ± 10 ^a	112 ± 3 ^a	40.0 ± 1.5 ^a	This work
Batch culture	1.57 ± 0.13 ^c	109 ± 3 ^d	130 ± 1 ^a	28.4 ± 4.34 ^c	0.90 ± 0.11 ^c	67.3 ± 1.6 ^d	79.7 ± 0.6 ^c	17.6 ± 2.7 ^b	Menegol et al. (unpublished results)
Repeated-batch culture (1.3 L/48 h)	7.08 ± 0.18 ^a	214 ± 3 ^c	102 ± 2 ^{bc}	33.9 ± 0.48 ^c	5.19 ± 0.13 ^b	158 ± 3 ^c	75.8 ± 1.5 ^c	25.1 ± 0.2 ^b	Menegol et al. (unpublished results)

The values refer to the average of the last three days in steady state cultivation.

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences by Tukey test (p-value < 0.05).

The predominant fatty acids in *H. luteoviridis* biomass were palmitic acid (16:0), linoleic acid (LA, C18:2n-6) and α -linolenic acid (ALA, C18:3n-3) (Figure 6.7). This result is similar to that reported by Jaeschke et al (2016) and Menegol et al (2017) for *H. luteoviridis* grown in batch culture.

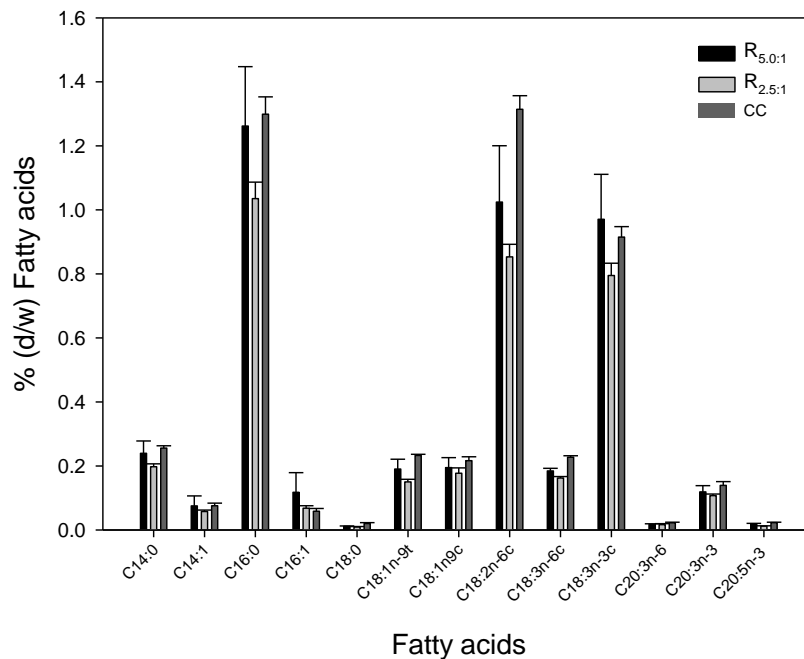


Figure 6.7. Fatty acids profile in *H. luteoviridis* biomass grown under continuous cultivation ($D = 0.401 \text{ d}^{-1}$) in photobioreactors enriched with commercial CO_2 (CC) and CO_2 from wine fermentation using $V_{PBR}:V_{wine} = 5.0:1$ (R_{5.0:1}) and $V_{PBR}:V_{wine} = 2.5:1$ (R_{2.5:1})

LA and ALA are high-value ω -6 and ω -3 essential fatty acids used by nutraceutical and pharmaceutical industries. They are precursors in the biosynthesis of the omega 3 eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) (SCHÜLER et al. 2017). EPA and DHA fatty acids are widely recognized as nutritional components for the prevention of various cardiac disorders (MENG et al., 2015). The high content of polyunsaturated fatty acids found in this study is explained by the continuous presence of nitrogen in the culture medium. San Pedro et al (2013) evaluated the productivity of different microalgae under several growing conditions. The authors reported that the highest PUFAs content was found in the biomass produced continuously without nitrogen limitation. However, under conditions of nitrogen starvation in discontinuous culture, the FA profile was directed to the production of saturated and monounsaturated fatty acids, reducing the content of polyunsaturated fatty acids (PUFA).

6.4 Conclusion

The use of CO₂ from wine fermentation can be an attractive alternative to maintain productivity in microalgae cultivation and decrease the environmental impact of the wine industry. Continuous cultures resulted in a biomass with higher content of polyunsaturated fatty acids, important carotenoids such as lutein, as well as improved protein content, in addition to the increase in microalgae productivity. It is also notable the importance of mathematical modelling and optimization of biotechnological processes, that allowed to predict the optimum value of process parameters to maximize productivity. Experimental validation of the continuous process on bench-scale have allowed the stable production of biochemical compounds, and this data can be used as a starting point for future scale-up studies.

CAPÍTULO 7 – EFEITO DA ILUMINAÇÃO DE DIODOS EMISSORES DE LUZ SOBRE O CRESCIMENTO E A FORMAÇÃO DE PRODUTOS DE ALTO VALOR DE MICROALGA *HETEROCHLORELLA LUTEOVIRIDIS* CULTIVADA EM FOTOBIORREATOR DE COLUNA DE BOLHAS

Artigo 4. Efeito da iluminação de diodos emissores de luz sobre o crescimento e a formação de produtos de alto valor de microalga *Heterochlorella luteoviridis* cultivada em fotobiorreator de coluna de bolhas

T. Menegol^b R. Rech^b E. Rodrigues^b L.López-Rosales^a *M. Cerón García^a F.García-Camacho^a
E.Molina Grima^a

^a Chemical Engineering Area, University of Almería, 04120 Almería, Spain. *mcceron@ual.es

^b Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Phone 55 51 3308 1356

*E-mail: rrech@ufrgs.br

Resumo

O uso de fotobiorreatores iluminados por diodos emissores de luz (*LED*) tem sido apresentado como tecnologia viável, capaz de otimizar a produção de microalgas e produtos derivados de alto valor comercial. O objetivo foi avaliar os efeitos da luz *LED* no crescimento da microalga *Heterochlorella luteoviridis* em cultivos em modo batelada. Essa avaliação foi conduzida em um sistema conectado aos fotobiorreatores para controle da intensidade de luz, a fim de simular o ciclo circadiano de radiação solar. O efeito de diferentes intensidades de luz branca e a luz composta por diferentes porcentagens de luz *LED* vermelha e azul sobre a produção de biomassa e composição bioquímica da microalga *Heterochlorella luteoviridis*. Os resultados indicam que o crescimento e a composição da microalga *H. luteoviridis* foram influenciados pelos comprimentos de onda específicos e pela intensidade de irradiação máxima. As luzes *LED* brancas com intensidade de irradiação máxima $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram maiores produtividades de biomassa ($0,29 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). A luz *LED* vermelha melhorou o crescimento da *H. luteoviridis*, no entanto, houve diminuição no conteúdo de carotenoides totais, tanto na luz vermelha quanto azul de 37-53 % e 21 %, respectivamente, quando comparado com maior valor obtido neste experimento. Isto é devido à característica específica de cada microalga quanto à capacidade de fotoadaptação e fotoproteção sob comprimentos de onda específicos.

Palavras chave: *LED*, intensidade luminosa, compostos bioativos, *LED*, Fotobiorreator de colunas de bolhas.

7.1 Introdução

As microalgas fotoautotróficas possuem na sua estruturação molecular fotossistemas, permitindo que elas obtenham nutrientes pela fotossíntese com auxílio tanto da luz solar quanto da luz artificial (HU et al., 2008).

Apesar dos cultivos de microalgas com luz solar para fins de exploração comercial serem mais economicamente viáveis, com o uso da luz artificial é possível modular a densidade de fluxo de fótons, fotoperíodo e comprimentos de onda específicos de luz, o que resulta em maior produtividade de biomassa e compostos de interesse, como ácidos graxos poli-insaturados e carotenoides (VÍLCHEZ et al., 2011; SCHULZE et al., 2014; SATHASIVAM; KI, 2018). Alguns estudos têm mostrado que o comprimento de onda pode influenciar a composição celular das microalgas quanto à produção de proteínas, carotenoides e lipídeos (KOÇ; ANDERSON; KOMMAREDDY, 2012).

A iluminação de estado sólido, que explora o uso de diodos emissores de luz (*LED*), é considerada, potencialmente, como um dos maiores avanços em termos de tecnologia de iluminação artificial no cultivo de microalgas (SHU et al., 2012). Além de serem mais seguros de operar do que com os sistemas das lâmpadas fluorescentes ou de vapor de mercúrio, os *LED* facilitam a organização e manejo de programas de iluminação especiais (MORROW, 2008, BARATA, 2016), têm a capacidade de controlar a composição espectral e podem ser facilmente integrados aos sistemas de controle digital (MORROW, 2008). A combinação de *LED* multiespectrais permite imitação da irradiação incidente da luz do sol (DARKO et al., 2014; LÓPEZ-ROSALES et al., 2016), especialmente útil no cultivo em ambiente de iluminação controlada (KOÇ, VATANDAS; KOÇ, 2009; KOÇ; ANDERSON, 2010).

A pesquisa com o uso de *LED* no cultivo de microalgas tem incentivado discussões acerca do comprimento da onda da luz *LED*, principalmente em relação aos espectros da azul, verde, vermelha e branca (PÉREZ-PAZOS; FERNÁNDEZ-IZQUIERDO, 2011; SCHULZE et al., 2014; CAMACHO-RODRÍGUEZ et al., 2014; COWARD et al., 2016).

No cultivo de *Chlorella kessleri* sob condições controladas de iluminação foi observado que as células de microalgas cultivadas na luz *LED* azul se mostraram mais circulares do que as cultivadas sob outras luzes. Nesse estudo, a luz *LED* vermelha se revelou mais eficiente em termos de concentração celular (KOÇ; ANDERSON; KOMMAREDDY, 2012). Outro estudo mostrou variação no comprimento da onda e na intensidade ideais de luz no cultivo de *Chlorella kessleri* quando observadas a formação de biomassa e lipídeos. A luz *LED* vermelha a 1000 lux foi mais eficaz na produção de biomassa e o *LED* azul a 1000 lux se

revelou ideal para a formação de lipídeos (SHU et al., 2012). No cultivo de *Chlorella sp.* evidenciou-se que sob luz *LED* vermelha (concentração de 0,5 g.L⁻¹ de CaCO₃ e fotoperíodo 6:18) há maior taxa de crescimento, porém foi observada a maior taxa na produção de lipídeos quando as microalgas foram cultivadas sob luz *LED* azul (1,5 g.L⁻¹ de CaCO₃ e fotoperíodo 18:6) (PÉREZ-PAZOS; FERNÁNDEZ-IZQUIERDO, 2011)

Apesar dos resultados atraentes sobre as aplicações de luzes *LED*, ainda são poucos estudos que investigam os efeitos da iluminação *LED* nos cultivos da maioria das microalgas exploradas economicamente (LÓPEZ-ROSALES et al., 2016). Neste contexto, objetivou-se avaliar se os efeitos da luz *LED* no crescimento e na composição da microalga *Heterochlorella luteoviridis* em cultivos em modo batelada.

7.2 Materiais e Métodos

7.2.1 Microalga e inóculo

A microalga *Heterochlorella luteoviridis* BE002 (isolada pelo Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense – Niterói, Rio de Janeiro, Brasil) foi mantida em estoque em frascos de 500 mL contendo 300 mL de cultura sob iluminação 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ciclo claro/escuro (12h/12h). O inóculo foi cultivado em um frasco Erlenmeyer de 1 L contendo 800 mL da cultura (diluição de 1:10) em sala climatizada a 25 °C, sob iluminação com fluxo de fótons incidentes (PFD) constante de 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e continuamente borbilhado com ar a 0,5 v.v⁻¹ min⁻¹. O meio de cultura utilizado para o crescimento foi o meio f/2 modificado (GUILLARD; RYTHER, 1962), com a seguinte composição: 1 g L⁻¹ de NaNO₃, 0,300 g L⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O, 0,03 g L⁻¹ de Na₂SiO₃·9H₂O, 0,2 g L⁻¹ de TRIS HCl 1M pH 7,2 0,00315 g L⁻¹ de FeCl₃·6H₂O, 0,0000063 g L⁻¹ de Na₂MoO₄·2H₂O, 0,000180 g L⁻¹ de MnCl₂·6H₂O, 0,00022 g L⁻¹ de ZnSO₄·7H₂O, 0,00001 g L⁻¹ de CoCl₂·6H₂O, 0,0000098 g L⁻¹ de CuSO₄·5H₂O, 0,00436 g L⁻¹ de EDTA, 0,0001 g L⁻¹ de tiamina, 0,0005 mg L⁻¹ de biotina e 0,0005 mg L⁻¹ de cianocobalamina.

7.2.2 Otimização da concentração de nitrogênio e fósforo no meio f / 2

Os experimentos para otimizar as concentrações de nitrogênio e fósforo foram realizados em batelada em frascos esféricos de 1 L de capacidade, utilizado o meio f/2 modificado como meio de cultura. Os experimentos foram conduzidos fixando a concentração

de N-NO₃ a 7,4 mM (concentração 650 mg L⁻¹ de NaNO₃). A concentração de P-PO₄ foi variada para estudar o efeito sobre o crescimento e a concentração de carotenoides. Os cultivos foram realizados utilizando quatro relações de N:P iniciais para obter as razões molares N:P de 20:1, 15:1, 10:1 e 5:1 correspondendo a concentrações de fósforo de 0,36, 0,49, 0,73 e 1,45 mM (50 a 200 mg L⁻¹ de NaH₂PO₄). A temperatura foi mantida a 25 °C e a iluminação contínua foi estabelecida a 100 μmol m⁻² s⁻¹. Amostras diárias foram coletadas para determinar a concentração de biomassa, nitrogênio e fosfato. Quando as culturas atingiram o estado estacionário, as amostras de biomassa foram, então, coletadas para análise. A biomassa foi recolhida através da centrifugação a 7500 rpm durante 5 min (SIGMA 4-15 Sartorius, Goettingen, Alemanha), lavada com solução aquosa 0,5 M de bicarbonato de amônio (Zhu e Lee, 1997) e liofilizada (TELSTAR Cryonos - 50, Madrid, Espanha). A biomassa seca e armazenada a -20 °C para análise de carotenoides.

Posteriormente, utilizando as mesmas condições, três concentrações de nitrogênio 9,1, 10,3 e 11,4 mM (800 a 1000 mg L⁻¹ de NaNO₃) foram testadas fixando-se a melhor relação N:P previamente estudada. O efeito do aumento da concentração de nitrogênio foi avaliado sobre a produtividade de biomassa e de carotenoides. Os parâmetros de crescimento velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), taxa de crescimento adimensional (μ_D) e produtividade de biomassa adimensional (P_D) foram usados para comparar o efeito de diferentes relações N: P no crescimento de *H. luteoviridis*.

7.2.3 Fotobiorreator de coluna de bolhas com iluminação LED

Os experimentos foram realizados em ambientes fechados, em modo batelada, em fotobiorreatores de colunas de bolhas de vidro com volume de trabalho de 1,8 L, com diâmetro interno de 0,07 m altura total de 0,50 m. A cultura foi misturada com ar filtrado estéril de um compressor (Atlas Copco Airpower BV-GA7FF, Atlas Copco SAE, Madri, Espanha) a uma taxa de 0,5 v v⁻¹ min⁻¹ através de uma entrada na parte inferior da coluna. O topo de cada biorreator foi equipado com mangueiras para uma saída de gás e uma sonda de pH, bem como uma válvula para coleta de amostra. O pH foi mantido na faixa de 7,8 a 8,0 controlado por injeção de CO₂ sob demanda. A temperatura foi controlada em cada fotobiorreator, utilizando um sistema de circulação de água conectada a um banho de circulação refrigerado (Thermo Scientific - Neslab RTE 7, Thermo Scientific, Newington (NH), Estados Unidos) para controle da temperatura 25 ± 1 °C.

O meio de cultura esterilizado foi preparado com água do mar, como indicado na sessão anterior. Os fotobiorreatores foram envoltos com uma faixa de *LED* coloridos de 7,5 m (vermelho, azul, verde e branco quente, coletivamente chamados de RGBW) (*LEDs*; Edison Opto Co., Taiwan) idênticos aos relatados em um estudo recente com *Karlodinium veneficum* e *Amphidinium carterae* (LÓPEZ-ROSALES et al., 2016b; MOLINA-MIRAS et al., 2018). As tiras de *LED* foram fixadas horizontalmente ao redor de toda a coluna de bolhas (Figura 7.1).

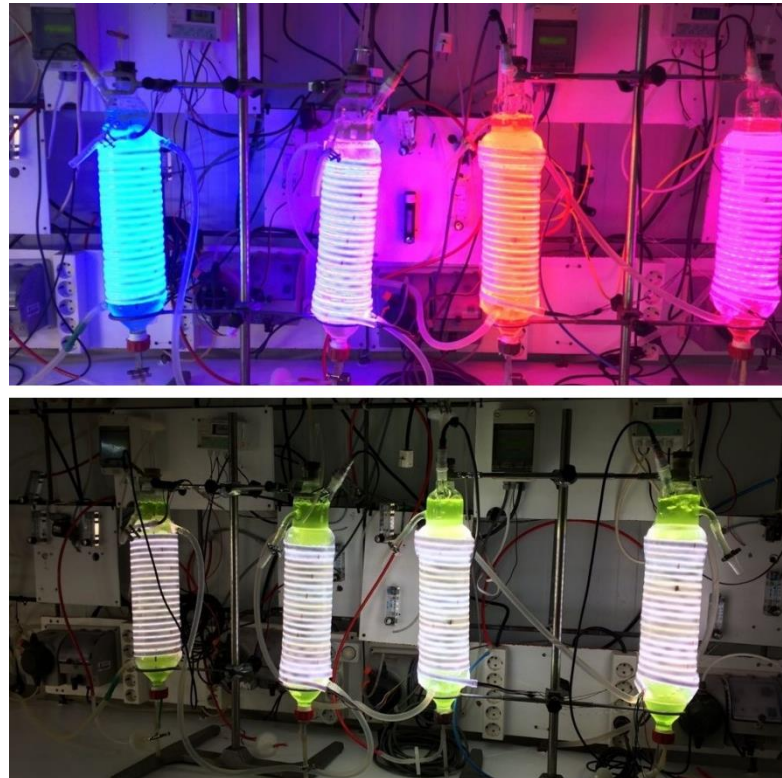


Figure 7.1. Detalhes do fotobiorreator da coluna de bolhas, iluminado com diferentes intensidades de luz, utilizando *LEDs* multi-espectrais

A unidade de controle *LED* permitiu a seleção de variados regimes de iluminação e a composição de cores. Um padrão de variação sinusoidal da irradiância ao ar livre foi imposto usando a equação (7.1.) (LÓPEZ-ROSALES et al., 2016).

$$I_o(t) = \begin{cases} I_{o\max} \sin \left[\pi \frac{t-t_{sr}}{t_{ss}-t_{sr}} \right] & \text{if } t_{sr} \leq t \leq t_{ss} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (7.1)$$

Em que, I_{0max} é a irradiância máxima que ocorre ao meio-dia na superfície do fotobiorreator; t_{sr} é a hora do nascer do sol (8 h); e t_{ss} é a hora do pôr do sol (20 h), com um período escuro de 12 h.

Os experimentos foram iniciados em $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de concentração de biomassa. Inicialmente, para estudar o efeito da intensidade luminosa, diferentes I_{0max} foram testados (250, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) usando luz *LED* com composição de cores idênticas (Branca). As intensidades de luz foram controladas por um software que simula o ciclo circadiano de 12 h de luz/12 h de escuro usando a equação (7.1).

Na segunda fase, foram programados estudos para avaliar o efeito do uso apenas de luz azul ou luz vermelha e diferentes combinações destas luzes. A intensidade máxima foi fixada em cada fotobiorreator a $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e as cores foram moduladas em 4 estados (0 % azul-100 % vermelho até 100 % azul-0 % vermelho). Finalmente, a *H. luteoviridis* foi cultivada usando apenas luz vermelha com diferentes intensidades de luz (800, 900 e $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Em cada início do experimento com o fotobiorreator preenchido apenas com água destilada, a intensidade luminosa interna foi medida usando um sensor quântico esférico (Biospherical QSL 100; Biospherical Instruments Inc., San Diego, CA, EUA). Durante os experimentos, amostras diárias foram coletadas para determinar a concentração de biomassa, nitrogênio e fosfato, cada teste foi realizado em triplicata. As culturas foram concluídas logo após o início da fase de crescimento estacionário, completando 8 dias de cultivo. As amostras foram então coletadas e centrifugadas a 7500 rpm por 5min (SIGMA 4K15 Sartorius, Goettingen, Alemanha), a biomassa foi lavada com uma solução aquosa de bicarbonato de amônio 0,5 M (ZHU; LEE, 1997) e liofilizada (TELSTAR Cryonos - 50, Madri, Espanha). A biomassa seca foi analisada imediatamente.

7.2.4 Procedimentos analíticos

A concentração da biomassa nas culturas foi estabelecida diariamente pela leitura da absorbância a 750 nm (ZHU; LEE, 1997; CHAGAS et al., 2015) com o uso de um espectrofotômetro (Helios Omega UV-VIS Spectrophotometer, Thermo Scientific, Horsham, England). A concentração de biomassa seca foi periodicamente verificada, utilizando 100 mL da cultura, a qual era centrifugada a 4000 rpm por 10 min (RPM; Sigma Sartorius 4-15, Sartorius A.G., Germany). Em seguida foi lavada com solução aquosa de bicarbonato de amônio 0,5 M e, na sequência, foi liofilizada durante 24 h (LYOQUEST-55 Telstar

Technologies, S.L. Spain). Para determinar o estado fisiológico das células (Fv/Fm), Fm sendo o valor máximo da fluorescência atribuída a clorofila-*a* e Fv o valor de fluorescência variável (o máximo menos o valor mínimo de fluorescência), a fluorescência das clorofilas foi medida utilizando fluorímetro (AquaPen-C AP-C 100, Photon Systems Instruments, Czech Republic).

Para avaliar o meio de cultivo, as análises foram realizadas no sobrenadante coletado diariamente. O consumo de nitrogênio foi determinado por espectrofotometria utilizando-se as absorvâncias de 220 e 275 nm (APHA, 2012). O consumo de fosfato foi determinado por espectrofotometria a 882 nm (APHA, 2012). Os lipídeos foram determinados gravimetricamente a partir de um extrato obtido com clorofórmio: metanol (2:1) (v/v) de acordo com Kochert et al. (1978). Os ácidos graxos foram determinados após transesterificação direta e, posteriormente, foram determinados por cromatografia gasosa de acordo com Rodríguez-Ruiz et al. (1998) (Cromatógrafo Gasoso Agilent Technologies 6890N, Santa Clara, CA, EUA). A extração de carotenoides e saponificação foi realizada segundo Cerón-García et al (2018). Os carotenoides foram analisados por HPLC (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu SPDM10AV) utilizando um detector de fotodiodos e seguindo o método proposto por Cerón-García et al. (2007). Os carotenoides foram quantificados utilizando curvas analíticas de *all-trans* luteína e *all-trans*- β -caroteno fornecida por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e *all-trans*-violaxantina e *all-trans*-zeaxantina, os quais foram adquiridos à DHI Lab Products (Hørsholm, Dinamarca). Cada amostra foi analisada por duplicata.

7.2.5 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica® (7.0, Statsoft Inc., Tulsa, USA). One-way ANOVA foi utilizada para determinar se houve diferença significativa entre as variáveis observadas, e o teste de Tukey com um nível de significância de 5% foi usado para identificar diferenças entre cada nível de tratamento.

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Efeito da concentração de nitrogênio e fósforo no meio de cultura f/2 sobre parâmetros de crescimento e carotenoides totais

Algumas limitações de nutrientes importantes, tais como nitrogênio(N) e fósforo(P) em culturas de microalgas causam a diminuição na atividade fotossintética e modificações na

sua composição bioquímica (CAMACHO-RODRÍGUEZ et al., 2013). O meio f/2 original possui uma relação N:P=24, a qual pode tornar limitante os macronutrientes, como fósforo, para cultura de microalgas (MOLINA-MIRAS et al. 2018). Para estudar o efeito da disponibilidade de fósforo na produção de biomassa foram utilizadas as razões de N:P (20; 15; 10 e 5), sendo a relação N:P=20, considerada o controle. Essa relação já foi utilizada em estudos anteriores (dados não mostrados). Os resultados mostraram um aumento na concentração da biomassa com aumento da concentração de fósforo mostrado na Tabela 7.1. A maior concentração de biomassa (1.03 g L^{-1}) obtida na relação N:P=5 foi 29 % superior ao controle (N:P=20). Além disso, observou-se uma tendência de aumento do μ_{max} de 0,24 para 0,27 d^{-1} (Tabela 7.1). A concentração de fósforo tornou-se limitante a partir do terceiro dia nas culturas com relação N:P de 20 e 15 (Figura 7.2) e no sexto dia na cultura com relação N:P=10. A falta de fósforo possivelmente foi determinante para o baixo crescimento da biomassa dessas culturas. O fósforo é considerado regulador do crescimento equilibrado (MOLINA-MIRAS et al., 2018). Na cultura com relação N:P=5, o fósforo não foi limitante, no entanto, se esgotou no último dia de cultivo. O nitrogênio foi consumido gradualmente e permaneceu abundante em todas os cultivos.

A relação N:P=5 foi escolhida para estudar o efeito do aumento da concentração de nitrogênio sobre o crescimento da biomassa e no conteúdo de carotenoides totais. Os resultados mostraram ligeira diminuição da concentração de biomassa com o aumento da concentração de nitrogênio e de fósforo para manter a relação (N:P=5) (Tabela 7.1). Por outro lado, observou-se aumento na velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), superior a 10 %, quando se elevou a concentração de nitrogênio de 7.4 para 11.4 mM.

Com relação aos parâmetros adimensionais μ_D , P_D , TC_D usados para comparar o desempenho dos experimentos, foi observado um efeito positivo nas taxas de crescimento (μ_D os valores de 1.13, 1.25, 1.25) com aumento na concentração de nitrogênio (9.1, 10.3 e 11.4 mM), respectivamente. Embora a produtividade de biomassa tenha diminuído com o aumento da concentração de nitrato (Tabela 7.1), a taxa de carotenoides totais adimensional apresentou aumento de 8 % com aumento de concentração de nitrogênio de 7.4 para 11.4 mM. Possivelmente isso pode ser explicado pelo fato de que as concentrações de nitrogênio e fósforo nestas condições permaneceram abundantes no meio de cultivo durante os experimentos (Figuras 7.2 a-b).

Os resultados revelam a importância do equilíbrio de N e P no meio de cultura da *H. luteoviridis*. Considerando a melhor velocidade específica máxima de crescimento e o conteúdo

de carotenoides utilizando N:P=5 com concentração de nitrogênio 11.4 mM, esta concentração foi definida para dar sequência aos experimentos.

Tabela 7.1. Efeito da concentração de nitrogênio e fósforo sobre os parâmetros de crescimento celular e carotenoides totais

N:P	N (mM)	μ_{max} (d ⁻¹)	μ_D	C _b (g L ⁻¹)	P _b (g L ⁻¹ d ⁻¹)	P _{bD}	CT (% biomassa seca)	CT _D
20	7.4	0.24 ± 0.00	1.00	0.78 ± 0.01	0.07 ± 0.01	1.00	0.63 ± 0.05	1.00
15	7.4	0.24 ± 0.00	1.00	0.80 ± 0.02	0.08 ± 0.01	1.03	0.65 ± 0.05	1.04
10	7.4	0.26 ± 0.00	1.08	0.86 ± 0.01	0.08 ± 0.01	1.12	0.65 ± 0.05	1.04
5	7.4	0.27 ± 0.00	1.13	1.03 ± 0.03	0.10 ± 0.01	1.39	0.69 ± 0.05	1.09
5	9.1	0.27 ± 0.00	1.13	0.71 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.87	0.65 ± 0.05	1.03
5	10.3	0.30 ± 0.00	1.25	0.78 ± 0.02	0.07 ± 0.01	1.00	0.72 ± 0.05	1.14
5	11.4	0.30 ± 0.00	1.25	0.80 ± 0.02	0.08 ± 0.01	1.04	0.74 ± 0.05	1.18

Concentração de nitrogênio (N), velocidade máxima de crescimento (μ_{max}). Produtividade de biomassa (P_b). velocidade específica máxima adimensional (μ_D) e C_b (concentração de biomassa). CT (carotenoides totais), CT_D (carotenoides totais adimensionais) e Produtividade de biomassa (P_{bD}).

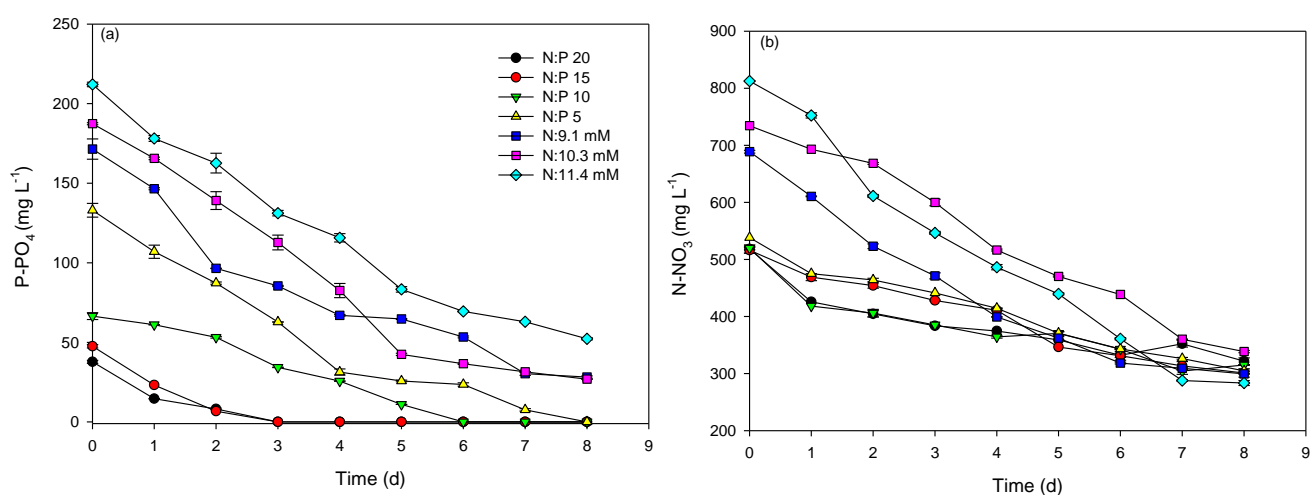


Figure 7.2. Consumo de fosfato (a) e nitrato pela *H. luteoviridis* em diferentes proporções molares N:P e concentração inicial de nitrato

7.3.2 Efeito das diferentes intensidades máximas e cores de luz LED sobre o crescimento de biomassa e a composição de proteínas e lipídeos

O efeito das diferentes intensidades de luz e dos comprimentos de onda (vermelho, azul e suas combinações) sobre o crescimento e o teor de proteínas e lipídeos da microalga *H.luteoviridis* são mostrados na Tabela 7.2. O maior valor de biomassa (1.93 ± 0.03 g L⁻¹) e produtividade máxima ($0,29 \pm 0,01$ g L⁻¹ d⁻¹) foram alcançadas quando empregou-se a luz LED branca com I_{max} de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As intensidades máximas de luz branca de 250 e $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram os menores valores de biomassa. Provavelmente nas culturas com baixa intensidade máxima de luz, a intensidade luminosa não foi suficiente

para fornecer o fluxo mínimo de fótons necessários para manter a fotossíntese e consequentemente alcançar a taxa máxima de crescimento (CHANG et al., 2011). Por outro lado, a alta I_{omax} ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) parece ter causado um efeito inibitório devido ao baixo crescimento celular observado (HU et al., 2008; HE et al., 2015). Embora esse efeito não seja claro neste estudo, porque a eficiência fotossintética ($F_v/F_m=5,4$) medida por fluorescência que fornece células saudáveis indicativas durante todo o tempo de cultura (MOLINA-MIRAS et.al 2018) foi afetada levemente nestas condições (Tabela 7.2).

Embora o maior teor de biomassa foi obtido em culturas iluminadas com luz *LED* branca, as culturas iluminadas com a luz *LED* vermelha independente da I_{omax} (700 a $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizada, apresentaram maior teor de biomassa variando de 1.73 ± 0.03 a $1.78 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ quando comparada com a biomassa ($1.31 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$), obtida na cultura iluminada com 100 % de luz azul (I_{omax} de $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O mesmo efeito foi observado nas culturas iluminadas com *LED* vermelho combinado com *LED* azul sob I_{omax} de $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, independentemente da proporção de *LED* vermelho (25%, 50% e 75%) usando o teor de biomassa foi menor (Tabela 7.2). As microalgas verdes contêm clorofila a e b, além de carotenoides específicos para realizar a fotossíntese. As clorofilas têm bandas de absorção principais nos comprimentos de onda do azul (400-500 nm) e vermelho (600-700 nm) (RA et al. 2016). Esta característica pode determinar a preferência da molécula de clorofila em capturar fótons nos comprimentos de onda azul ou vermelho. Portanto, a eficiência na absorção de luz vermelha ou azul por microalgas é determinada pela especificidade da natureza química de seus pigmentos constituintes (SCHULZE et al., 2014; WISHKERMANN & WISHKERMANN, 2017). As microalgas chlorophytas preferem a luz vermelha para manter seu crescimento, sugerindo que o comprimento não ideal pode causar inibição de seu crescimento (SCHULZE et al., 2016). Esta especificidade pode explicar a preferência da microalga de *H. luteoviridis* em crescer sob o efeito da luz vermelha observada no presente estudo. A alta eficiência na absorção de energia dos fótons e na produção de biomassa com iluminação *LED* vermelha é bem descrita na literatura (CHANG et al. 2011; SCHULZE et al. 2014).

Com relação ao teor de lipídeos, as culturas cultivadas sob iluminação de *LED* branco (I_{omax} de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sob a combinação de *LED* azul 75 % e vermelho 25% e com 100 % de *LED* azul apresentaram maior conteúdo lipídico 15, 8 %, 16, 8 % 15,8 % respectivamente (Tabela 7.2). Em geral, quando aumentou a proporção de luz vermelha até 100 % nas culturas iluminadas com a mistura de luz azul e vermelha, o conteúdo de lipídeos diminui. Esse mesmo efeito é observado com aumento da I_{omax} nas culturas iluminadas com luz branca. Esse fato pode

ser explicado porque alta de intensidade de luz pode influenciar na assimilação de CO₂ durante o crescimento e conseqüentemente interferir na produtividade lipídica (WAHIDIN et al., 2013). E, por hipótese, a luz *LED* azul tem ação direta no controle das enzimas que são responsáveis pela regulação das taxas de dióxido de carbono. Quanto maior a atividade da ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) e a anidrase carbônica maior é o acúmulo de lipídios (SCHULZE et al., 2014), o que explicaria maiores teores de lipídios encontrados nas culturas sob luz azul observados neste estudo

Quanto ao conteúdo de proteínas, foi observado concentração elevada de proteínas em todos as culturas, conforme mostrado na Tabela 7.2. Os maiores conteúdos de proteínas na biomassa de *H. luteoviridis* (55 a 59,5 % de biomassa seca) foram observados nos cultivos sob luz *LED* azul e suas combinações com luz vermelha (25 %) a I_{max} de 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esses valores formam superiores ao valor de proteína (14 %) observado previamente pelo nosso grupo de pesquisa nas culturas de *H. luteoviridis* sob variações na concentração de nitrogênio no meio de cultivo (75 a 375 mg de NaNO₃) e temperatura (22 °C a 32 °C) (MENEGOL et al. 2017). Este fato pode ser explicado pelas diferenças nas condições de cultivo, como a deficiência de nitrogênio durante os cultivos, o que não ocorreu nesse estudo (o teor de nitrogênio e fósforo foram medidos diariamente nas culturas não havendo limitação), como também a utilização de iluminação contínua (250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), porque microalgas cultivadas fotoautotroficamente sob iluminação contínua preferem acumular carboidratos e sobre ciclo claro/escuro, as vias de assimilação de carbono são direcionadas para síntese proteica.

O mesmo efeito observado para lipídeos, foi observado para proteínas, quando aumentou a proporção de luz vermelha nas culturas iluminadas com as combinações de *LED* azul e vermelho, houve uma diminuição no teor de proteínas sendo que os menores valores de proteínas foram observados nas culturas com 100 % de luz *LED* vermelha 52,5 44,2, 40,6 e 41,0 % de biomassa seca a I_{max} de 700, 800, 900 e 1100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente (Tabela 7.2). Alguns autores sugerem que a luz *LED* azul (400-450 nm) proporciona maior absorção de nitrogênio e conseqüentemente há um acúmulo elevado de proteínas intracelulares em microalgas (SCHULZE et al, (2016). Este fato pode explicar os menores teores de proteínas encontrados nas culturas iluminadas com a luz vermelha nesse estudo.

Com relação à produtividade de proteína e lipídeos na microalga de *H. luteoviridis* (Tabela 7.2), as maiores produtividades foram alcançadas quando cultivada sob luz *LED* branca a uma intensidade máxima de 1000 a 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, seguindo a tendência de alta produtividade de biomassa obtida sob essas condições.

Tabela 7. 2. Efeito de luz *LED* incidente e das cores de *LED* sobre a concentração de biomassa, lipídeos, proteínas e fluorescência de clorofila

<i>LED</i>	$I_{0\ max}$ $\mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$	Biomassa (g L^{-1})	P_{Biomassa} ($\text{g L}^{-1}\ \text{d}^{-1}$)	Lipídeos totais (% b.s.)	$P_{\text{Lipídeos}}$ ($\text{mg L}^{-1}\ \text{d}^{-1}$)	Proteína (% b. s)	$P_{\text{Proteína}}$ ($\text{mg L}^{-1}\ \text{d}^{-1}$)	Fv / Fm
Branca	250	0.47±0.01 ^f	0.08±0.00 ^f	15.8 ± 0.11 ^{ab}	11.96 ± 0.04 ^c	43.7 ± 1.75 ^{de}	33.0 ± 1.00 ^g	0.71 ± 0.01 ^{ab}
	500	1.23±0.02 ^e	0.20± 0.00 ^d	13.0 ± 0.57 ^{bcd}	25.76 ± 1.44 ^b	45.3 ± 0.07 ^{cde}	89.5 ± 0.22 ^f	0.64 ± 0.00 ^{ab}
	1000	1.77±0.02 ^b	0.29±0.01 ^b	14.9 ± 0.15 ^{abc}	42.55 ± 0.83 ^a	50.8±0.59 ^{bc}	145 ± 0.40 ^b	0.63±0.04 ^{ab}
	1500	1.93±0.03 ^a	0.31±0.01 ^a	13.6 ± 0.26 ^{abcd}	42.33 ± 0.14 ^a	51.1±0.01 ^{bc}	158 ± 2.44 ^a	0.57±0.00 ^{ab}
	2000	0.36±0.00 ^g	0.06±0.00 ^g	10.20 ± 0.26 ^d	6.13 ± 0.52 ^c	42.1±0.56 ^{de}	24.7 ± 0.60 ^g	0.54±0.04 ^b
Vermelha	800	1.73±0.01 ^b	0.22±0.00 ^c	11.3±1.10 ^{cd}	25.60 ± 2.58 ^b	44.2±0.90 ^{cde}	100±0.09 ^{ef}	0.73±0.04 ^a
	900	1.78±0.01 ^b	0.23±0.00 ^c	11.0±0.05 ^d	25.76 ± 0.22 ^b	40.6±1.04 ^e	95.2±2.84 ^{ef}	0.72±0.02 ^{ab}
	1100	1.77±0.01 ^b	0.23±0.00 ^c	12.3±0.15 ^{bcd}	28.80 ± 0.19 ^b	41.0±0.93 ^e	95.7±1.63 ^{ef}	0.71±0.06 ^{ab}
100% - Azul	700	1.31±0.01 ^d	0.17 ± 0.00 ^e	15.8 ± 0.20 ^{ab}	27.19 ± 0.45 ^b	55.1 ± 1.08 ^{ab}	94.6 ± 1.49 ^{bc}	0.64 ± 0.08 ^{ab}
75% A - 25% V	700	1.45±0.02 ^c	0.19 ± 0.00 ^{de}	16.8 ± 0.85 ^a	31.99 ± 1.24 ^b	59.3 ± 2.22 ^a	112.8 ± 2.89 ^{cd}	0.64 ± 0.10 ^{ab}
75% V - 25% A	700	1.42±0.01 ^c	0.19 ± 0.00 ^{de}	13.7 ± 0.09 ^{abcd}	25.52 ± 0.08 ^b	55.0 ± 2.22 ^{ab}	102 ± 3.78 ^{de}	0.69 ± 0.04 ^{ab}
50% A - 50% V	700	1.48±0.00 ^c	0.19 ± 0.00 ^d	13.9 ± 1.46 ^{abcd}	27.17 ± 2.82 ^b	50.0 ± 0.94 ^{bcd}	97.5 ± 1.95 ^{ef}	0.62 ± 0.06 ^{ab}
100% - Vermelha	700	1.73±0.03 ^b	0.22 ± 0.00 ^c	12.1 ± 0.06 ^{cd}	27.55 ± 0.26 ^b	52.5 ± 1.06 ^{ab}	119 ± 0.68 ^c	0.69 ± 0.06 ^{ab}

*Biomassa seca (b.s.)

Os resultados são apresentados como médias ± desvio padrão R- Vermelha e B – Azul.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (valor de $p < 0,05$).

7.3.5 Efeito da intensidade máxima e de cores de luz *LED* sobre os produtos de alto valor

O efeito dos tratamentos com diferentes condições de intensidade de iluminação *LED* e comprimentos de onda (branca, vermelha e azul) sobre a composição e o conteúdo de ácidos graxos é mostrado na Tabela 7.3. Os principais ácidos graxos observados foram os ácidos palmítico (C16:0), linoleico (C18:2 ω -6) e α -linolênico (C18:3 ω -3). Esses resultados concordam com os resultados observados por Jaeschke et al. (2016). Em geral, os maiores conteúdos de ácidos graxos totais e suas frações de AGPI foram obtidos a 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (I_{omax}) em culturas iluminadas com a luz *LED* azul e suas composições com luz *LED* vermelha, à medida que a percentagem de luz *LED* vermelha foi aumentada o conteúdo total de ácidos graxos foi diminuindo (Tabela 7.3). O conteúdo de ácidos graxos na biomassa de culturas iluminadas somente pela luz *LED* vermelha diminuiu quando a intensidade máxima de luz foi aumentada de 700 até 1100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sob luz *LED* vermelha, o conteúdo de ácidos graxos saturados (AGS) aumentou e conteúdo de AGPIs diminuiu. Esses resultados são similares aos relatados por Atta et al. (2013).

O efeito similar ao da luz vermelha foi observado nas culturas iluminadas sob luz *LED* branca sobre o total de ácidos graxos e as composições de AGS, MONO e AGPI observada na Tabela 7.3. Quando a intensidade máxima foi aumentada (250, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), observou-se diminuição no conteúdo total de ácidos graxos da *H. luteoviridis*. Esses resultados estão correlacionados com a diminuição de AGPI. Geralmente, as microalgas cultivadas sob elevada intensidade luminosa são caracterizadas pelo aumento na síntese de AGS e conseqüentemente diminuição no conteúdo de AGPI. Essa diminuição também foi observada nos cultivos com luz *LED* vermelha. Sugere-se que a diminuição de AGPI sob alta intensidade luminosa é devido ao fato de que as membranas estruturais dos cloroplastos são compostas por lipídeos estruturais e quando há o suprimento de fótons suficiente para fotossíntese, ocorre uma redução na atividade do cloroplasto e, conseqüentemente, diminuição no conteúdo de AGPI (Guedes et al., 2010). O efeito da intensidade luminosa sobre conteúdo lipídico também pode variar de acordo com a característica de cada microalga (CHRISMADHA; BOROWITZKA, 1994).

Tabela 7.3. Concentração de ácidos graxos na biomassa de *H. luteoviridis* cultivada sob intensidade luminosa com *LED* Branco *LED* (240 a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), *LED* vermelha (700 a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e intensidade luminosa fixa a 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em 100 % *LED* azul e vermelha e suas combinações

<i>LED</i>	Branco					Vermelho			100% Azul	75%A-25%V	75%V-25%A	50%A-50%V	100% Vermelho
$I_{0\text{max}}$ $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$	250	500	1000	1500	2000	800	900	1100	700	700	700	700	700
Ácidos graxos saturados - AGS (% de biomassa seca)													
14:00	0.06 ± 0.00 ^{ab}	0.06 ± 0.02 ^{abcd}	0.06 ± 0.01 ^{abc}	0.06 ± 0.01 ^{abcde}	0.03 ± 0.00 ^f	0.04 ± 0.00 ^{efg}	0.03 ± 0.00 ^{ef}	0.03 ± 0.00 ^{ef}	0.04 ± 0.00 ^{cdef}	0.06 ± 0.01 ^{abcd}	0.07 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.00 ^{abcd}	0.04 ± 0.00 ^{cdef}
16:00	1.00 ± 0.00 ^{ab}	0.92 ± 0.01 ^{bc}	0.98 ± 0.00 ^{ab}	0.81 ± 0.00 ^{cd}	0.75 ± 0.00 ^d	0.98 ± 0.01 ^{ab}	0.96 ± 0.01 ^{ab}	0.98 ± 0.01 ^{ab}	1.02 ± 0.06 ^{ab}	1.04 ± 0.02 ^{ab}	1.03 ± 0.00 ^{ab}	1.00 ± 0.01 ^{ab}	1.07 ± 0.09 ^a
18:00	0.02 ± 0.00 ^d	0.02 ± 0.00 ^d	0.02 ± 0.00 ^d	0.02 ± 0.00 ^d	0.01 ± 0.00 ^d	0.57 ± 0.01 ^a	0.51 ± 0.01 ^a	0.56 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.00 ^c	0.15 ± 0.00 ^c	0.25 ± 0.00 ^b	0.18 ± 0.01 ^{bc}	0.55 ± 0.05 ^a
Total	1.08 ± 0.00 ^{cde}	1.00 ± 0.00 ^{efg}	1.06 ± 0.00 ^{cde}	0.89 ± 0.00 ^{fg}	0.79 ± 0.00 ^g	1.59 ± 0.00 ^{ab}	1.50 ± 0.01 ^{ab}	1.57 ± 0.00 ^{ab}	1.20 ± 0.00 ^{cde}	1.25 ± 0.01 ^{cd}	1.35 ± 0.00 ^{bc}	1.23 ± 0.01 ^{cd}	1.66 ± 0.02 ^a
Ácidos graxos monoinsaturados - MONO (% de biomassa seca)													
16:1n7	0.28 ± 0.00 ^a	0.21 ± 0.00 ^c	0.23 ± 0.00 ^b	0.22 ± 0.0 ^b	0.20 ± 0.00 ^d	0.08 ± 0.00 ^{ef}	0.05 ± 0.00 ^{gh}	0.05 ± 0.01 ^{fg}	0.07 ± 0.00 ^e	0.07 ± 0.00 ^e	0.05 ± 0.00 ^{fg}	0.05 ± 0.00 ^{ef}	0.04 ± 0.00 ^h
18:1n9	0.14 ± 0.00 ^{bc}	0.11 ± 0.00 ^{cd}	0.12 ± 0.00 ^{cd}	0.08 ± 0.00 ^d	0.17 ± 0.00 ^b	0.27 ± 0.02 ^a	0.24 ± 0.02 ^a	0.27 ± 0.03 ^a	0.24 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.01 ^a	0.24 ± 0.00 ^a	0.24 ± 0.01 ^a	0.24 ± 0.02 ^a
Total	0.42 ± 0.01 ^a	0.32 ± 0.02 ^{bcde}	0.35 ± 0.03 ^{bc}	0.30 ± 0.02 ^{cde}	0.37 ± 0.01 ^{ab}	0.35 ± 0.01 ^{bcd}	0.29 ± 0.00 ^{de}	0.32 ± 0.00 ^{bcde}	0.31 ± 0.00 ^{cde}	0.32 ± 0.00 ^{de}	0.29 ± 0.00 ^{cde}	0.29 ± 0.02 ^{cde}	0.28 ± 0.00 ^e
Ácidos graxos poli-insaturados -AGPI (% de biomassa seca)													
16:2n4	0.21 ± 0.00 ^b	0.15 ± 0.00 ^{de}	0.16 ± 0.00 ^d	0.14 ± 0.00 ^e	0.12 ± 0.00 ^f	0.08 ± 0.00 ^g	0.08 ± 0.00 ^g	0.08 ± 0.00 ^g	0.25 ± 0.00 ^a	0.24 ± 0.00 ^a	0.20 ± 0.00 ^b	0.18 ± 0.00 ^c	0.11 ± 0.01 ^f
16:3n4	0.19 ± 0.00 ^d	0.17 ± 0.00 ^{de}	0.19 ± 0.00 ^d	0.17 ± 0.00 ^e	0.13 ± 0.00 ^f	0.09 ± 0.00 ^{gh}	0.08 ± 0.00 ⁱ	0.09 ± 0.00 ^{hi}	0.25 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.00 ^a	0.21 ± 0.01 ^c	0.23 ± 0.00 ^b	0.10 ± 0.01 ^g
16:4n1	0.67 ± 0.02 ^c	0.56 ± 0.00 ^{de}	0.60 ± 0.00 ^d	0.51 ± 0.00 ^{ef}	0.45 ± 0.00 ^{fg}	0.41 ± 0.01 ^g	0.41 ± 0.02 ^g	0.41 ± 0.01 ^g	0.82 ± 0.02 ^{ab}	0.82 ± 0.00 ^a	0.75 ± 0.01 ^{bc}	0.71 ± 0.02 ^c	0.56 ± 0.01 ^{de}
18:2n6	1.08 ± 0.02 ^{bcd}	0.99 ± 0.03 ^d	1.06 ± 0.05 ^{cd}	0.83 ± 0.00 ^e	0.82 ± 0.01 ^{ef}	0.73 ± 0.01 ^{efg}	0.67 ± 0.00 ^g	0.73 ± 0.01 ^{fg}	1.13 ± 0.02 ^{bcd}	1.21 ± 0.02 ^a	1.17 ± 0.00 ^{ab}	1.23 ± 0.02 ^a	0.82 ± 0.01 ^{ef}
18:3n3	0.95 ± 0.01 ^{bc}	0.75 ± 0.03 ^{de}	0.80 ± 0.00 ^{cd}	0.77 ± 0.00 ^{ef}	0.65 ± 0.00 ^e	0.76 ± 0.00 ^{de}	0.80 ± 0.01 ^{cd}	0.76 ± 0.01 ^{de}	0.84 ± 0.01 ^{bcd}	0.90 ± 0.00 ^{abc}	0.95 ± 0.01 ^{ab}	0.80 ± 0.01 ^{cd}	1.00 ± 0.01 ^a
18:4n3	0.59 ± 0.01 ^c	0.47 ± 0.00 ^e	0.50 ± 0.00 ^f	0.42 ± 0.00 ^f	0.29 ± 0.00 ^{gh}	0.23 ± 0.01 ⁱ	0.25 ± 0.01 ^{hi}	0.23 ± 0.01 ⁱ	0.73 ± 0.02 ^a	0.65 ± 0.01 ^b	0.49 ± 0.00 ^{de}	0.52 ± 0.01 ^d	0.32 ± 0.01 ^g
20:4n6	0.18 ± 0.01 ^{cd}	0.17 ± 0.00 ^d	0.18 ± 0.0 ^{cd}	0.14 ± 0.00 ^e	0.13 ± 0.00 ^e	0.22 ± 0.00 ^{ab}	0.20 ± 0.01 ^{bc}	0.22 ± 0.00 ^{ab}	0.22 ± 0.0 ^{ab}	0.24 ± 0.00 ^a	0.23 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.01 ^a
20:5n3	0.11 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.00 ^{bc}	0.10 ± 0.00 ^b	0.07 ± 0.00 ^d	0.06 ± 0.00 ^g	0.06 ± 0.00 ^g	0.06 ± 0.0 ^g	0.06 ± 0.00 ^g	0.09 ± 0.01 ^{cd}	0.08 ± 0.00 ^d	0.06 ± 0.00 ^{fg}	0.07 ± 0.01 ^{ef}	0.06 ± 0.02 ^{efg}
Total	3.98 ± 0.00 ^{bc}	3.35 ± 0.02 ^{de}	3.59 ± 0.01 ^{cd}	3.05 ± 0.00 ^{ef}	2.65 ± 0.00 ^{fg}	2.58 ± 0.01 ^g	2.55 ± 0.01 ^g	2.58 ± 0.01 ^g	4.33 ± 0.59 ^{ab}	4.39 ± 0.07 ^a	4.06 ± 0.02 ^{ab}	3.97 ± 0.05 ^{bc}	3.20 ± 0.05 ^{de}
Outros	1.02 ± 0.01 ^{bcde}	0.62 ± 0.01 ^e	1.00 ± 0.01 ^{bcde}	0.90 ± 0.01 ^{cde}	0.83 ± 0.00 ^{cde}	1.05 ± 0.01 ^{bcde}	0.78 ± 0.00 ^{de}	1.21 ± 0.00 ^{abcd}	1.51 ± 0.02 ^{ab}	1.70 ± 0.00 ^a	1.41 ± 0.01 ^{abc}	1.36 ± 0.00 ^{abcd}	1.20 ± 0.23 ^{abcde}
TAG	6.507 ± 0.02 ^{bcde}	6.28 ± 0.01 ^{cde}	6.00 ± 0.03 ^{def}	5.14 ± 0.04 ^{fg}	4.64 ± 0.01 ^g	5.57 ± 0.03 ^{efg}	5.12 ± 0.05 ^{fg}	5.68 ± 0.06 ^{efg}	7.35 ± 0.13 ^{ab}	7.66 ± 0.27 ^a	7.10 ± 0.04 ^{abc}	6.85 ± 0.05 ^{abcd}	6.34 ± 0.05 ^{bcde}

*V-vermelha; A – Azul; TAG – Total de ácidos graxos.

** Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (p -value <0.05).

Quanto aos carotenoides, a composição e o conteúdo dos carotenoides observados em todas as culturas de *H. luteoviridis*, sob efeito dos tratamentos com diferentes condições de intensidade de iluminação *LED* e comprimentos de onda são mostrados na Figura 7.3. Os principais carotenoides encontrados foram all-*trans*-violaxantina, all-*trans*-luteína e all-*trans*- β -caroteno (Figura 7.3). Esses resultados foram similares ao encontrando em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa com a *H. luteoviridis* (DIPRAT et al., 2017; JAESCHKE et al., 2016). O acúmulo de carotenoides foi afetado pelo aumento da intensidade de luz *LED* e pelos diferentes comprimentos de ondas (branca, azul e vermelha). Particularmente, algas e plantas podem acumular pigmentos para se proteger de danos fotossintéticos gerados pela luz (SCHULZE et al., 2014). Os maiores valores no total de carotenoides 1,23 e 1,19 % de biomassa seca foram encontrados em cultivos sob I_{max} de 250 e 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. No entanto, esses valores não diferiram significativamente dos valores observados nas culturas à medida que a I_{max} foi aumentada para 1000 e 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob luz *LED* branca, como também sob intensidade de 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob luz *LED* azul e a combinação 75 % azul e 25 % vermelho (Figura 7.3). A diminuição observada no conteúdo de carotenoides com o aumento da intensidade da luz sob luz *LED* branca pode estar relacionada ao conteúdo das xantofilas primárias como a luteína. O conteúdo de luteína diminuiu de $0,26 \pm 0,01$ a $0,13 \pm 0,00$ % (biomassa seca) à medida que a I_{max} de luz *LED* branca foi aumentada de 250 a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Resultados semelhantes foram observados por Xie et al. (2014) no cultivo *Desmodesmus* sp. Os autores sugerem que a diminuição do conteúdo de luteína pode ser atribuída à diminuição do tamanho das células do complexo de antena coletor de luz, onde a luteína geralmente é sintetizada.

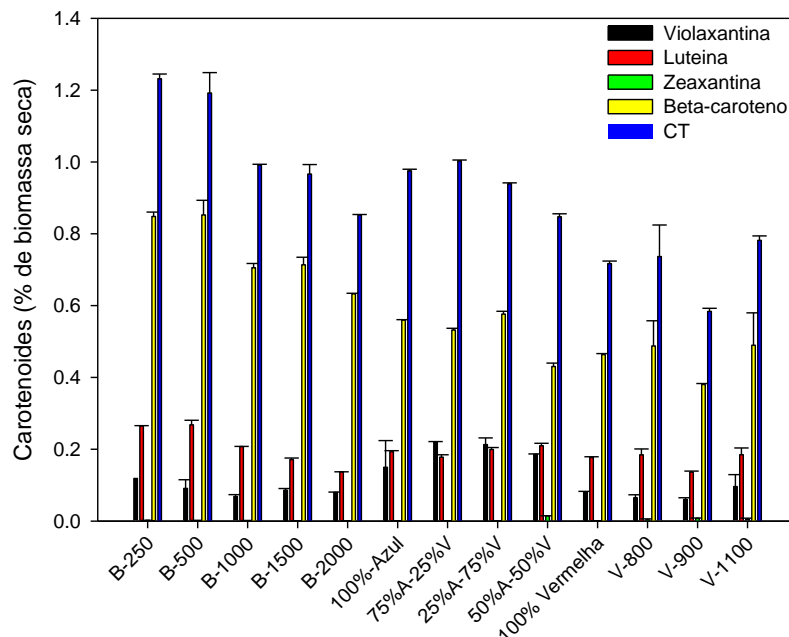


Figure 7.3. Efeito de luz *LED* incidente e das cores de *LED* sobre a concentração de carotenoides na biomassa de *H. luteoviridis*

Sob iluminação vermelha 100% com I_{max} de 700, 800, 900 e 1100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o menor conteúdo de carotenoides foi observado (0,74 – 0,78 % de biomassa seca) (Figura 7.3). Em geral, ocorreu redução principalmente na concentração de all-*trans*- β -caroteno. A diminuição no conteúdo de all-*trans*- β -caroteno pode ser devido ao aumento significativo de zeaxantina observado nas condições de iluminação *LED* vermelha (I_{0max} 800, 900 e 1100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As xantofilas, como a zeaxantina têm o papel fundamental de proteção fotooxidativa. Um aumento similar na concentração de all-*trans*-zeaxantina foi observado por outros autores que avaliaram o efeito da luz *LED* vermelha em microalgas (SIMIONATO et al., 2013).

7.4 Conclusão

A capacidade específica de fotoadaptação e fotoproteção sob comprimentos de onda específicos da *H. luteoviridis* influenciaram no crescimento e na sua composição. A maior produtividade de biomassa foi obtida em culturas iluminada com *LED* brancos e intensidade de irradiação máxima (1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A luz *LED* vermelha melhorou o crescimento da *H. luteoviridis*. A luz *LED* azul misturado com a luz *LED* vermelha (25%) apresentou maiores teores de proteínas, lipídeos e ácidos graxos.

CAPÍTULO 8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um sistema de cultivo para maximizar a produção de biomassa e compostos de interesse da microalga *Heterochlorella luteoviridis* utilizando o dióxido de carbono (CO₂) formado durante a fermentação alcoólica da produção de vinho.

A escolha da microalga *Heterochlorella luteoviridis* e o CO₂ originado da fermentação alcoólica da produção do vinho para a realização do experimento reside na possibilidade de explorar o potencial de produção de biomassa e compostos originários desta microalga, a qual tem pouca expressão no campo da pesquisa nacional e internacional, assim como propor uma forma alternativa de aproveitamento de uso do CO₂ de fermentação alcoólica, um dos gases responsáveis pelo efeito estufa. A produção de biomassa de microalgas e o aproveitamento de CO₂ de fermentação alcóolica proveniente da produção de vinho pode ser revelar uma tecnologia promissora para a produção de compostos importantes para a indústria alimentícia humana e animal.

Na primeira etapa do trabalho, publicada no Artigo 1, foram determinados os parâmetros de cultivo que exercem influência na formação e composição da biomassa da microalga *H. luteoviridis*. Avaliou-se a influência da temperatura e do teor de nitrogênio no meio de cultivo em cultivos operados em batelada. Os resultados mostraram que a produção de biomassa é influenciada pelo aumento da concentração do nitrogênio no meio de cultivo. Além disso, o aumento da concentração de nitrogênio resultou também nas maiores concentrações de proteína e xantofilas e carotenos. No entanto, o aumento do nitrogênio influenciou negativamente na produção de lipídeos. Os maiores valores de proteína foram alcançados em temperaturas mais baixas, já a maior concentração de carboidratos foi obtida em culturas com temperatura elevada. Além disso, temperatura e concentração de nitrogênio não influenciaram o perfil qualitativo de carotenoides e ácidos graxos. Porém, uma maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados foi observada em culturas sob temperatura baixa. Os resultados positivos alcançados com o aumento da concentração de nitrogênio de cultivo demonstram a importância de otimizar as principais variáveis do processo de cultivo de microalgas.

Na etapa seguinte, diante dos resultados obtidos na etapa 1, realizaram-se experimentos com diferentes concentrações de nitrogênio a uma temperatura fixa para maximizar a produção de biomassa de *H. luteoviridis*, visto que na primeira etapa o nitrogênio

influenciou no aumento da biomassa. Diante dos resultados positivos sobre o aumento de biomassa foi definida a concentração de nitrogênio de 104 mg g^{-1} (N-NO₃) para dar andamento nas demais etapas da pesquisa experimental. Essa concentração foi definida a partir da constatação estatística de que houve aumento significativo no valor final de carotenoides presentes na biomassa.

Novo cultivo utilizando-se esta concentração de nitrogênio, repetido em triplicata, teve como propósito a avaliação da cinética de crescimento, geração de carotenoides, teores de proteínas, carboidratos e lipídeos e controle do consumo de nitrogênio. Os dados experimentais foram utilizados para modelar matematicamente a cinética do consumo de nitrogênio e do crescimento da biomassa da microalga *Heterochlorella luteoviridis* utilizando modelos fenomenológicos descritos na literatura.

Os modelos cinéticos propostos foram baseados em modelos já apresentados na literatura por Droop (1968) e por Monod (1949), e o modelo logístico. As expressões dos modelos propostos são diferenciadas pela variação da taxa de consumo de nitrogênio (ρ), da velocidade específica de crescimento (μ) e a variação na utilização da cota intracelular de nitrogênio (q). Todos os modelos foram capazes de prever com sucesso a cinética de crescimento da biomassa de *H. luteoviridis* comparando com os dados experimentais. O modelo DroopLog proposto neste trabalho apresentou o melhor ajuste com os dados experimentais do consumo de nitrogênio. A partir do modelo, foram realizadas simulações de cultivos em modo de operação batelada repetida e contínuo com várias taxas de diluição. Diante dos resultados de produtividade máxima de biomassa predita, experimentos de validação dos processos foram realizados.

Nessa segunda etapa, os experimentos de cultivo da *Heterochlorella luteoviridis* foram realizados em modo de operação batelada repetida utilizando taxas de diluição nos intervalos de tempo de renovação de 24 h e 48 h. Os resultados mostraram que intervalos curtos de permanência no fotobiorreator e a existência de uma fase *lag* não prevista pelo modelo de DroopLog influenciaram na falta de estabilidade ao longo dos ciclos e conseqüentemente na baixa produtividade da biomassa experimental quando comparada com a predita. No entanto, em culturas testadas com tempo de renovação de 48 h, a produtividade de biomassa foi superior à obtida em modo de operação em batelada. Além disso, a composição da biomassa mostrou um potencial para produção de carotenoides, ácidos graxos poli-insaturados e proteínas.

O modelo de DroopLog também foi utilizado para simular e otimizar a produtividade de biomassa de cultivos contínuos. Os resultados experimentais demonstram que o comportamento do crescimento da biomassa de *H. luteoviridis* em modo contínuo foi previsto com sucesso pelo modelo de DroopLog. Além disso, a aplicação do modelo de maneira experimental, possibilitou melhorias consideráveis na produtividade volumétrica, e ao mesmo tempo manteve a concentração de carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados a níveis comparados aos obtidos nas culturas operadas em regime de batelada repetida.

Na etapa seguinte, foram realizados experimentos de produção de vinho, nos quais, a levedura utilizada foi do gênero *Saccharomyces*. Durante a conversão de substrato em produto, determinaram-se a quantidade de CO₂, acumulado e a taxa de geração de CO₂. A partir das informações sobre a geração de CO₂ montou-se um sistema simultâneo de geração de CO₂ biológico a partir de processos de fermentação alcoólica da fabricação de vinho acoplado diretamente ao cultivo contínuo de *Heterochlorella luteoviridis*. As produtividades volumétricas obtidas nesse experimento foram equivalentes às alcançadas em cultura contínua utilizando CO₂ sintético, indicando que o CO₂ biológico pode ser utilizado no cultivo de microalgas. A utilização de maior concentração de CO₂ demonstrou melhoria significativa na produtividade da biomassa e de proteínas. Além disso, as produtividades de carotenoides e ácidos graxos obtidas nas culturas com diferentes concentrações de CO₂ biológicos foram equivalentes as produtividades obtidas com CO₂ sintético.

Em outra etapa realizada na Espanha, em conjunto com grupo de investigação em microalgas marinhas da Universidade de Almería, acrescentou-se outra perspectiva de cultivo e, por conseguinte, de análise dos resultados. O cultivo da microalga *Heterochlorella luteoviridis* iluminada sob diodos emissores de luz se mostra particularmente atraente pelas vantagens proporcionadas por esse sistema de iluminação como, por exemplo, menor consumo de energia e de geração de calor quando comparado com o sistema que emprega lâmpadas incandescentes e/ou fluorescentes, tradicionalmente usada na produção de biomassa de microalgas, e possibilita o fornecimento de luz em qualquer comprimento de onda.

No experimento, para controle da intensidade de luz a fim de avaliar os efeitos da luz LED sob a cultura da microalga *Heterochlorella luteoviridis*, foi projetado um sistema conectado aos fotobiorreatores. Inicialmente, testou-se a luz LED branca quente em diferentes intensidades máxima de iluminação e, em seguida, o efeito da intensidade das luzes LED azul e vermelha e suas combinações utilizando a mesma intensidade máxima. Por fim, foi realizado

experimento no comprimento de onda gerado pela luz *LED* vermelha variando a intensidade luminosa máxima. Os resultados mostraram que o crescimento e a composição da microalga *Heterochlorella luteoviridis* foram influenciados pelos comprimentos de onda específicos e pela intensidade de luminosidade máxima. As culturas iluminadas por *LED* brancos com intensidade luminosa máxima de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram maiores produtividades de biomassa e carotenoides. Culturas iluminadas sob comprimento de onda da luz vermelha apresentaram crescimento superior a culturas iluminadas com *LED* azuis. No entanto, as culturas iluminadas com *LED* azul apresentaram maior produção de carotenoides comparadas com as culturas iluminadas com *LED* vermelho.

Em conclusão, os resultados promissores alcançados nesta pesquisa demonstram que a microalga *H. luteoviridis* apresenta um potencial para uso em processos biotecnológicos, uma vez que demonstrou ser facilmente adaptada aos diferentes modos de operação de cultura empregados neste estudo. Além disso, alta concentração de biomassa obtida em condições de meio de cultura com alta concentração de nitrogênio é considerada ótima entre as microalgas autotróficas. O estudo demonstrou que a utilização de simulação matemática é uma ferramenta útil para prever e otimizar culturas de batelada repetida e contínua a partir de modelos matemáticos de culturas em batelada. Embora o ajuste do modelo matemático tenha sido adequado, o modelo necessita de melhorias para descrever o início da curva de crescimento da *H. luteoviridis* com maior precisão. No sistema de cultivo em batelada repetida com o fornecimento frequente de nitrogênio foi possível não somente aumentar a produtividade de biomassa, como também de compostos de alto valor como carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados. A utilização do CO_2 biológico originado da fermentação do vinho demonstrou ser uma alternativa atraente do ponto de vista econômico e ambiental, representando um processo interessante para manter a produtividade em culturas da *H. luteoviridis*. As culturas contínuas resultaram em uma biomassa rica em compostos de interesse comercial, como ácidos graxos poli-insaturados e carotenoides como a luteína, além de proteínas. A utilização de iluminação em culturas da *H. luteoviridis* simulando a radiação solar por meio da modulação da intensidade luminosa máxima e do espectro de comprimento de onda, apresentou resultados potenciais para cultivar *H. luteoviridis* com emprego da luz solar e, devido a isso, a modelagem do bioprocessamento torna-se uma ferramenta essencial como ponto de partida para futuros estudos de aumento de escala de cultivo.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Mediante os resultados alcançados, pode-se elencar algumas sugestões para trabalhos futuros, quais sejam:

- Estudar novos substratos utilizados no cultivo da *H. luteoviridis*, quanto a seus efeitos sobre o rendimento e composição da biomassa.
- Testar a atividade antioxidante dos carotenoides e carboidratos da *H. luteoviridis*.
- Aprimorar o modelo matemático proposto, com adição de termos que melhor representem o crescimento da *H. luteoviridis* cultivada em processo contínuo.
- Cultivar microalgas com aproveitamento da CO₂ da fermentação alcoólica da produção de vinho e otimizar esse cultivo com o uso de luzes com diferentes comprimentos de onda e avaliar, especialmente quanto às características de fotoadaptação e fotoproteção desenvolvidas pelas várias espécies de microalgas sob os efeitos dos comprimentos de onda específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKMAN, R. G. J. J. D. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 73, n. 3, p. 488–506, 1992.
- ADESANYA, V. O. et al. Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 293–304, 2014.
- ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. Cambridge, Massachusetts, EUA: Academic Press, 2005
- AOCS. **Sampling and analysis of commercial fats and oils. AOCS Official Method Cc 6-25**, 1997.
- APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. **American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA**, 2012.
- ARINO, J.; WANG, L.; WOLKOWICZ, G. S. K. An alternative formulation for a delayed logistic equation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 241, n. 1, p. 109–119, 2006.
- BAR, E. et al. Pigment and Structural Changes in *Chlorella zofingiensis* upon Light and Nitrogen Stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 146, n. 4, p. 527–534, 1995.
- BARATA, A. F. L. **Microalgas: produção econômica e ambientalmente sustentável**. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Energia e do Ambiente). Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. Portugal, Lisboa, 2016.
- BARRA, L. et al. The Challenge of Ecophysiological Biodiversity for Biotechnological Applications of Marine Microalgae. **Marine Drugs**, v. 12, n. 3, p. 1641–1675, 24 2014.
- BARREIRA, L. et al. Chapter 13 - Medicinal Effects of Microalgae-Derived Fatty Acids. In: KIM, S.-K. (Ed.). **Handbook of Marine Microalgae**. Boston: Academic Press, 2015. p. 209–231.
- BHATTACHARYA, A., SUN, D., RAHMAN, M., FERNANDES, G.. Different ratios of eicosapentaenoic and docosahexaenoic omega-3 fatty acids in commercial fish oils differentially alter pro-inflammatory cytokines in peritoneal macrophages from C57BL/6 female mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 23–30, 2007.
- BATISTA, A. P. et al. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, v. 2, n. 2, p. 164–173, 2013.
- BÉCHET, Q.; SHILTON, A.; GUIEYSSE, B. Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1648–1663, 2013.
- BELLO, M., RANGANATHAN, P., BRENNAN, F. Dynamic modelling of microalgae cultivation process in high rate algal wastewater pond, **Algal Research**. v. 24, p. 457–466, 2017.
- BENEMANN, J. Microalgae for biofuels and animal feeds. **Energies**, v. 6, n. 11, p. 5869–5886, 2013.

- BENVENUTI, G. et al. Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 4, p. 1425–1431, 2015.
- BERGES, J. A. et al. Differential Effects of Nitrogen Limitation on Photosynthetic Efficiency of Photosystems I and II in Microalgae. **Plant Physiology**, v. 110, n. 2, p. 689–696, 1996.
- BERNARD, O. Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production. **Journal of Process Control**, v. 21, n. 10, p. 1378–1389, 2011.
- BLAIR, M. F.; KOKABIAN, B.; GUDE, V. G. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 665–674, 2014.
- BLANKENSHIP, R. E. The Basic Principles of Photosynthetic Energy Storage. In: **Molecular Mechanisms of Photosynthesis**. [s.l.] Blackwell Science Ltd, 2002. p. 1–10.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1–3, p. 313–321, 1999.
- BOROWITZKA, M. A. Dunaliella: biology, production, and markets. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition**, p. 359–368, 2013.
- BOROWITZKA, M. A.; MOHEIMANI, N. R. Sustainable biofuels from algae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, n. 1, p. 13–25, 2010.
- BOSCO, S. et al. Greenhouse gas emissions in the agricultural phase of wine production in the Maremma rural district in Tuscany, Italy. **Italian Journal of Agronomy**, v. 6, n. 2, p. 15, 2011.
- BOUGARAN, G.; BERNARD, O.; SCIANDRA, A. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. **Journal of Theoretical Biology**, v. 265, n. 3, p. 443–454, 2010.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. v. 14, p. 557–577, 2010.
- CAFFARRI, S. et al. A Comparison Between Plant Photosystem I and Photosystem II Architecture and Functioning. **Current Protein & Peptide Science**, v. 15, n. 4, p. 296–331, 2014.
- CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360–369, 2013.
- CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 8, p. 885–97, 2008.
- CAMACHO-RODRÍGUEZ, J. et al. A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 57–66, 2013.
- CAMACHO-RODRÍGUEZ, J., CERÓN-GARCÍA, M.C., FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M., MOLINA-GRIMA, E. The influence of culture conditions on biomass and high value product

- generation by *Nannochloropsis gaditana* in aquaculture, **Algal Research**, v. 11, p. 63–73, 2015.
- CARVALHO, A. P.; MALCATA, F. X. Optimization of w-3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO₂ and light intensity under batch and continuous cultivation modes. **Marine Biotechnology**, Oxford, v. 7, p. 381–388, 2005.
- CATALDO, D. A. et al. Rapid Colorimetric Determination of Nitrate in Plant-Tissue by Nitration of Salicylic-Acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 1975.
- CERÓN-GARCÍA, M. C. et al. Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). **Food Chemistry**, v. 257, p. 316–324, 2018.
- ČERVENÝ, J. et al. Photobioreactor for cultivation and real-time, in-situ measurement of O₂ and CO₂ exchange rates, growth dynamics, and of chlorophyll fluorescence emission of photoautotrophic microorganisms. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 3, p. 247–253, 2009.
- CHACÓN-LEE, T. L.; GONZÁLEZ-MARIÑO, G. E. Microalgae for “Healthy” Foods—Possibilities and Challenges. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 6, p. 655–675, 2010.
- CHAGAS, A. L. L. et al. Production of carotenoids and lipids by *Dunaliella tertiolecta* using CO₂ from beer fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 981–988, jun. 2015.
- CHANG, H.-X. et al. Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO₂ biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon. **Bioresource Technology**, v. 206, p. 231–238, 2016.
- CHAVAN, K. J. et al. Environmental Factors Influencing Algal Biodiesel Production. **Environmental Engineering Science**, v. 31, n. 11, p. 602–611, 2014.
- CHEAH, W. Y. et al. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource technology**, v. 184, p. 190–201, maio 2015.
- CHEN, C.-Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71–81, jan. 2011a.
- CHEN, M. et al. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1649–1655, 1 jan. 2011b.
- CHENG, J. et al. Improving CO₂ fixation efficiency by optimizing *Chlorella* PY-ZU1 culture conditions in sequential bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 144, n. 0, p. 321–327, 2013.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, jun. 2007.
- CHIU, S.-Y. et al. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource technology**, v. 99, n. 9, p. 3389–96, jun. 2008.
- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F.-J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 21–34, 2004.
- CHOUL-GYUN, L. AND. Nitrogen Removal from Wastewaters by Microalgae Without Consuming Organic Carbon Sources. **Journal Microbiol. Biotechnol**, v. 12, p. 979–985, 2002.

- CHRISMADHA, T.; BOROWITZKA, M. A. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* grown in a tubular photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 1, p. 67–74, 1994.
- CHRISTAKI, E., BONOS, E., GIANNENAS, I., FLOROU-PANERI, P. Functional properties of carotenoids originating from algae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 1, p. 5–11, 2013
- CHRONAKIS, I. S.; MADSEN, M. Algal proteins. **Handbook of Food Proteins**, p. 353–394, 2011.
- CHU, W.-L. **Biotechnological applications of microalgae**. [s.l: s.n.]. v. 6
- CONCAS, A. et al. Autotrophic growth and lipid production of *Chlorella sorokiniana* in lab batch and BIOCOIL photobioreactors: Experiments and modeling. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 327–338, 2016.
- CONVERTI, A. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing**, v. 48, n. 6, p. 1146–1151, 2009.
- CORDERO, B. F., OBRAZTSOVA, I., COUSO, I., LEON, R., VARGAS, M. A., & RODRIGUEZ, H. Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. **Marine Drugs**, v. 9, n. 9, p. 1607–1624, 2011.
- CORNET, J.-F.; DUSSAP, C.-G. A simple and reliable formula for assessment of maximum volumetric productivities in photobioreactors. **Biotechnology progress**, v. 25, n. 2, p. 424–35, 2009.
- COWARD, T. et al. Utilising light-emitting diodes of specific narrow wavelengths for the optimization and co-production of multiple high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 607–615, 2016.
- CUELLAR-BERMUDEZ, S. P. et al. Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. **Journal of Cleaner Production**, v. 98, p. 53–65, 2014.
- DEGEN, J. et al. A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 89–94, 2001.
- DEL CAMPO, J. A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 1163–1174, 2007.
- DARKO, E. et al. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1640, p. 20130243–20130243, 2014.
- DIPRAT, A. B. et al. Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. **Journal of the science of food and agriculture**, 2016.
- DROOP, M. R. Vitamin B12 and Marine Ecology. IV. The Kinetics of Uptake, Growth and Inhibition in *Monochrysis Lutheri*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 48, n. 03, p. 689–733, 1968.

- DROOP, M. R. 25 Years of algal growth kinetics a personal view. **Botanica Marina**, v. 26, n. 3, 99, 1983.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- DULLEY, J. R.; GRIEVE, P. A. A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. **Analytical Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 136–141, 1975.
- ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 1–14, 2008.
- FAN, J. et al. Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 8, p. 1380–1390, 2012.
- FENG, P. et al. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 405–410, 2012.
- FERNANDES, B. D. et al. Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: Approaches, applications and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1228–1245, 2015.
- FERNÁNDEZ, I. et al. Dynamic model of an industrial raceway reactor for microalgae production. **Algal Research**, v. 17, p. 67–78, 2016.
- FERREIRA, L. S. et al. *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO₂ from ethanol fermentation. **Applied Energy**, v. 92, p. 379–385, abr. 2012.
- FRÉ, N. C. DA et al. Kinetic Modeling of *Dunaliella tertiolecta* Growth under Different Nitrogen Concentrations. **Chemical Engineering & Technology**, 2016.
- GALKA, W. P. et al. Functional Analyses of the Plant Photosystem I–Light-Harvesting Complex II Supercomplex Reveal That Light-Harvesting Complex II Loosely Bound to Photosystem II Is a Very Efficient Antenna for Photosystem I in State II. **The Plant Cell**, v. 24, n. 7, p. 2963–2978, 2012.
- GARCÍA-CAÑEDO, J. C. et al. Batch and fed-batch culture of *Scenedesmus incrassatulus*: Effect over biomass, carotenoid profile and concentration, photosynthetic efficiency and non-photochemical quenching. **Algal Research**, v. 13, p. 41–52, 2016.
- GEADA, P. et al. Microalgal biomass cultivation. In: RAJESH P., R.; DATTA, M.; ASHOK, P. (Eds.). **Algal green Chemistry : Recent Progress in Biotechnology**. [s.l.] John Fedor, 2017. p. 258–278.
- GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396–1412, 2016.
- GRIMA, E.M., FEMTIDEZ, J.M., 1996. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. **Journal Biotechnoly**, v. 45, p. 59–69, 1996.
- GUIHÉNEUF, F.; STENGEL, D. B. Towards the biorefinery concept: Interaction of light, temperature and nitrogen for optimizing the co-production of high-value compounds in

Porphyridium purpureum. **Algal Research**, v.10, p. 152–163.

GUILLARD, R. R. L.; RYTHER, J. H. Studies of Marine Planktonic Diatoms: I. *Cyclotella* Nana Hustedt, And *Detonula Confervacea* (Cleve) Gran. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 229–239, 1962.

HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037–1047, 2010.

HE, Y. et al. Analysis and model delineation of marine microalgae growth and lipid accumulation in flat-plate photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 108–116, 2016.

HO, S.-H. et al. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems--a review. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 2, p. 189–98, jan. 2011.

HO, S.-H. et al. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. **Bioresource technology**, v. 152, p. 275–82, 2014.

HUANG, J.; AKI, S.; HACHIDA, K.; YOKOCHI, T.; KAWAMOTO, S.; SHIGETA, S.; ONO, K.; SUZUKI O. Profile of polyunsaturated fatty acids produced by *Thraustochytrium* sp. Kk17-3. **Journal of The American Oil Chemists Society**, v. 78, n. 6, p. 605-10, 2001.

HUANG, L. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground beef under isothermal and dynamic temperature conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 3, p. 380-387, 2009.

HUBER, S. C. et al. Comparative Studies of the Light Modulation of Nitrate Reductase and Sucrose-Phosphate Synthase Activities in Spinach Leaves . **Plant Physiology**, v. 100, n. 2, p. 706–712, 1992.

HUNER, N. P. A. et al. **Sensing, Signaling and Cell Adaptation**. [s.l.] Elsevier, 2002. v. 3

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. **Plant Physiology**, v. 81, n. 3, p. 802 LP-806, 1986.

ICB. SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS Departamento de Botânica. n. 062, p. 2, 2016.

IKARAN, Z., SUÁREZ-ALVAREZ, S., URRETA, I., & CASTAÑÓN, S. The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. **Algal Research**, v.10, p. 134-144, 2015.

JAESCHKE, D. P. et al. Carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* using moderate electric field and ethanol. **Process Biochemistry**, 2016.

JAMES, C. M.; AL-KHARS, A. M. An intensive continuous culture system using tubular photobioreactors for producing microalgae. **Aquaculture**, v. 87, n. 3–4, p. 381–393, 1990.

JIN, E. S. et al. Xanthophylls in microalgae: From biosynthesis to biotechnological mass production and application. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 165–174, 2003.

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 488–506, 1992.

- KAO, C.-Y. et al. Utilization of carbon dioxide in industrial flue gases for the cultivation of microalga *Chlorella* sp. **Bioresource technology**, v. 166, p. 485–93, 2014.
- KHAN, S. A. et al. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2361–2372, 2009.
- KIM, K. M. et al. Characterization of *Heterochlorella luteoviridis* (Trebouxiaceae, Trebouxiophyceae) isolated from the Port of Jeongja in Ulsan, Korea. **Journal of Marine Bioscience and Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 22–29, 2017.
- KIM, S. et al. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. **Bioresource technology**, v. 144, p. 8–13, 2013.
- KOÇ, C.; ANDERSON, G. A.; KOMMAREDDY, A. Use of red and blue light-emitting diodes (LED) and fluorescent lamps to grow microalgae in a photobioreactor. **The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, IJA_65.2013.797**, 8, 2012
- KOÇ, C.; VATANDAŞ, M.; KOÇ, A.B. Led lighting technology and using in agriculture. **25th National Congress on Mechanization and Energy in Agriculture**. Isparta, Turkey (In Turkish), p. 153-8, 2009
- KOÇ, C.; ANDERSON, G. A. Use of RGB leds and fluorescents lamps as light sources to grow microalgae in a photo-bio reactor (PBR). **Asabe/Csbe North-Central Intersectional** p. 7-9, 2010.
- KOCHEM, L. H. et al. Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, n. 1, p. 59–64, 8, 2014.
- KOCHERT, G. Quantitation of the macromolecular components of microalgae. In: **Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods**. [s.l.] Cambridge University Press, 1978. p. 189–195.
- KUMAR, A. et al. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 371–80, 2010.
- KUMAR, K.; DAS, D. Carbon dioxide sequestration by biological processes. In: **Transformation and Utilization of Carbon Dioxide**. [s.l.] Springer, 2014. p. 303–334.
- LEE, Y.-K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 4, p. 307–315, 2001.
- LI, Y. et al. Biofuels from microalgae. **Biotechnology progress**, v. 24, n. 4, p. 815–820, 2008.
- LI, Y. et al. Regulation of lipid metabolism in the green microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophy-photoinduction cultivation regime. **Bioresource technology**, v. 192, p. 781–91, 2015.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 7, p. 1043–1049, 2009.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- LIN, J.-H.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Lutein production from biomass: Marigold flowers

versus microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 421–428, 2015.

LÓPEZ-ROSALES, L. et al. Pilot-scale bubble column photobioreactor culture of a marine dinoflagellate microalga illuminated with light emission diodes. **Bioresource Technology**, v. 216, 2016.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos, SP: Rima, 2006.

LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MAITY, J. P. et al. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. **Energy**, v. 78, p. 104–113, abr. 2014.

MANDELLI, F. et al. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1781–1790, 2012.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. ScienceDirect Microalgal and cyanobacterial cultivation : The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186–202, 2014.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G. **Encyclopedia of Ecology**. [s.l.] Elsevier, 2008.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MATSUDO, M.C.; BEZERRA, R.P.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n.1, p. 52-57, 2009.

MATSUDO, M. C. et al. CO₂ from alcoholic fermentation for continuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. **Biotechnology progress**, v. 27, n. 3, p. 650–6, 2011.

MAXWELL, D. P. et al. Growth at Low Temperature Mimics High-Light Acclimation in *Chlorella vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 105, n. 2, p. 535–543, 1994.

MCTI. Estimativas Anuais de Emissões de Gases de Efeito Estufa no Brasil. Segunda edição. p. 168, 2014.

MENEGOL, T., DIPRAT, A.B., RODRIGUES, E., RECH, R. Effect of temperature and nitrogen concentration on biomass composition of *Heterochlorella luteoviridis*. **Food Science Technology**. v. 37 (2017).

MENG, Y., JIANG, J., WANG, H., CAO, X., XUE, S., YANG, Q., WANG, W. The characteristics of TAG and EPA accumulation in *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under different nitrogen supply regimes, **Bioresource Technology**. v.179, p, 483–489, 2015.

METTING, B.; PYNE, J. W. Biologically-active Compounds from Microalgae. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 7, p. 386–394, 1986.

MINHAS, A. KAUR et al. A Review on the Assessment of Stress conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 546, 2016.

- MISHRA, S. K. et al. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. **Bioresource technology**, v. 155, p. 330–3, 2014.
- MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 371–394, 1949.
- MOLINA-MIRAS, A. et al. A pilot-scale bioprocess to produce amphidinols from the marine microalga *Amphidinium carterae*: Isolation of a novel analogue. **Algal Research**, v. 31, 2018.
- MORROW, R. C. Led lighting in horticultures. orbital technologies corporation. **Hort Science**, v. 43, n. 7, p. 1947–50, 2008.
- MUJTABA, G. et al. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. **Bioresource technology**, v. 123, p. 279–83, 2012.
- MULDERS, K. J. M. et al. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 2, p. 229–242, 3, 2014a.
- MULDERS, K. J. M. et al. Effect of biomass concentration on secondary carotenoids and triacylglycerol (TAG) accumulation in nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis*. **Algal Research**, v. 6, p. 8–16, out. 2014b.
- NEUSTUPA, J. et al. *Kalinella bambusicola* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid Chlorella-like subaerial alga from Southeast Asia. **Phycological Research**, v. 57, n. 3, p. 159–169, 2009.
- O'GRADY, J.; MORGAN, J. A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 1, p. 121–125, 2010.
- ÖRDÖG, V. et al. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stresses *Chlorella minutissima* cultures. **Journal Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 907–914, 2012.
- ÖTLEŞ, S.; PIRE, R. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. **Journal of AOAC international**, v. 84, n. 6, p. 1708–1714, 2001.
- PALIWAL, C.; MITRA M.; BHAYANI K.; BHARADWAI, S. V.V.; GHOSH, T.; DUBEY, S.; MISHRA, S. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. **Bioresource Technology** v. 244, p. 1216–1226, 2017.
- PATIÑO, R.; JANSSEN, M.; VON STOCKAR, U. A study of the growth for the microalga *Chlorella vulgaris* by photo-bio-calorimetry and other on-line and off-line techniques. **Biotechnology and bioengineering**, v. 96, n. 4, p. 757–67, 2007.
- PRAVEENKUMAR, R., SHAMEERA, K., MAHALAKSHMI, G., AKBARSHA, M. A., & THAJUDDIN, N. (2012). Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, 37, 60–66.
- PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water research**, v. 45, n. 1, p. 11–36, 2011.
- PÉREZ-PAZOS; JAZMÍN-VANESSA; FERNÁNDEZ-IZQUIERDO PABLO. Synthesis of neutral lipids in *Chlorella* sp. under different light and carbonate conditions. **CT&F - Ciencia, Tecnología Futuro**, v. 4, p. 47–58, 2011.
- PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied**

- Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 287–293, 2008.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.
- QIAO, H. et al. Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum*. **Aquaculture**, v. 452, p. 311–317, 2016.
- RADMANN, E. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. **Aquaculture**, v. 265, n. 1–4, p. 118–126, 2007.
- RAI, L. C.; RAI, P. K.; MALLICK, N. Regulation of heavy metal toxicity in acid-tolerant *Chlorella*: physiological and biochemical approaches. **Environmental and Experimental Botany**, v. 38, p. 99–109, 1996.
- RAJKUMAR, R.; YAAKOB ZAHIRA. The Biolog of Microalgae. In: BUX, F. (Ed.). . **Biotechnological Applications of Microalgae**. New York and London: [s.n.]. p. 7–14.
- RAMANNA, L. et al. The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 168, n. 0, p. 127–135, 2014.
- RAPOSO, M. F. DE J. et al. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. **Marine drugs**, v. 11, n. 1, p. 233–52, 2013.
- RASMUSSEN, R. S.; MORRISSEY, M. T. Marine biotechnology for production of food ingredients. **Advances in food and nutrition research**, v. 52, p. 237–92, 2007.
- RAVEN, J. A. **Advances in Microbial Physiology Volume 21**. [s.l.] Elsevier, 1981. v. 21
- RAVEN, J. A.; GEIDER, R. J. Temperature and Algal Growth. **New Phytologist**, v. 110, n. 4, p. 441–461, 1988.
- REMMERS, I. M.; HIDALGO-ULLOA, A.; BRAND, P.B.; EVERS, W. A. C.; WIIFFELS, R. H.; LAMERS, P. P. Continuous versus batch production of lipids in the microalgae *Acutodesmus obliquus*. **Bioresource Techonology**, v. 244, p. 1384–1391, 2017.
- RIO-CHANONA, E. A. DEL et al. An efficient model construction strategy to simulate microalgal lutein photo-production dynamic process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 11, p. 2518–2527, 27 jul. 2017.
- ROACH, T.; KRIEGER-LISZKAY, A. K. Regulation of Photosynthetic Electron Transport and Photoinhibition. **Current Protein & Peptide Science**, v. 15, n. 4, p. 351–362, 22 jun. 2014.
- RODRIGUES, D. B. et al. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Research International**, v. 65, Part B, n. 0, p. 144–148, 2014.
- RODRÍGUEZ-RUIZ, J. et al. Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 9, p. 689–691, 1998.
- ROLEDA, M. Y. et al. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. **Bioresource technology**, v. 129, p. 439–49, 2013.
- RUANGSOMBOON, S; PRACHOM, N; SORNCHAI, P. Enhanced growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* KMITL 2 by optimum carbon dioxide concentration and

concentration-dependent effects on its biochemical composition and biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1368-1366, 2017.

RUSSO, G. L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 937–46, 2009.

SAFI, C. et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265–278, 2014.

SAHU, A. et al. Fatty acids as biomarkers of microalgae. **Phytochemistry**, v. 89, p. 53–8, maio 2013.

SAIDI, K.; HAMMAMI, S. The impact of energy consumption and CO₂ emissions on economic growth: Fresh evidence from dynamic simultaneous-equations models. **Sustainable Cities and Society**, v. 14, p. 178–186, 2015.

SANCHEZ, S. et al. Microbial production of carotenoids. In: **Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals**. [s.l: s.n.]. p. 194–233, 2009.

SCHACKY, C. VON. n X 3 Fatty acids and the prevention of coronary atherosclerosis 1,2. v. 71, p. 224–227, 2000.

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **J Biol Chem**, 1995.

SCHÜLER, L. M. et al. Trends and strategies to enhance triacylglycerols and high-value compounds in microalgae. **Algal Research**, v. 25, p. 263–273, 2017.

SCOTT, S. A. et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current opinion in biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 277–86, 2010.

SHAFIEI, S.; SALIM, R. A. Non-renewable and renewable energy consumption and CO₂ emissions in OECD countries: A comparative analysis. **Energy Policy**, v. 66, p. 547–556, 2014.

SHI, X.-M.; ZHANG, X.-W.; CHEN, F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3–5, p. 312–318, 2000.

SILVA, N. A. DA et al. Phenolic Compounds and Carotenoids from Four Fruits Native from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5072–5084, 2014.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 495–505, 2002.

SINGH, B. et al. Towards a sustainable approach for development of biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 216–245, 2014.

SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, n. 0, p. 431–444, 2015.

SMYTH, M.; RUSSELL, J. ‘From graft to bottle’—Analysis of energy use in viticulture and wine production and the potential for solar renewable technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 8, p. 1985–1993, 2009.

SOARES, R. DE P.; SECCHI, A. R. EMSO: A new environment for modelling, simulation and

- optimisation. In: ENGINEERING, A. K. AND I. T. B. T.-C. A. C. (Ed.). . **European Symposium on Computer Aided Process Engineering-1336th European Symposium of the Working Party on Computer Aided Process Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2003. v. Volume 14p. 947–952.
- SPALDING, M. H. Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms: *Chlamydomonas* inorganic carbon transporters. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 7, p. 1463–1473, 2008.
- SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.
- SATHASIVAM, R.; KI, J.-S. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. **Marine Drugs**, v. 16, n. 1, p. 26, 2018.
- SUN, Z. et al. Promotion of microalgal biomass production and efficient use of CO₂ from flue gas by monoethanolamine. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 730–738, 2015.
- TANG, D. et al. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3071–3076, 2011.
- THOMAS, W. H.; TORNABENE, T. G.; WEISSMAN, J. Screening for lipid yielding microalgae: activities for 1983. **Final Subcontract Report**. 2207. Scripps Institution Of Oceanography. University Of California, US, 1984.
- TURON, V. et al. Use of fermentative metabolites for heterotrophic microalgae growth: Yields and kinetics. **Bioresource technology**, v. 175C, p. 342–349, 2014.
- UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. **Photosynthetica**, v. 45, n. 2, p. 309–311, 2007.
- VANTHOOR-KOOPMANS, M. et al. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource technology**, v. 135, p. 142–9, 2013.
- VATCHEVA, I. et al. Experiment selection for the discrimination of semi-quantitative models of dynamical systems. **Artificial Intelligence**, v. 170, n. 4, p. 472–506, 2006.
- VENKATA SUBHASH, G.; RAJVANSHI, M.; NAVISH KUMAR, B.; GOVINDACHARY, S.; PRASAD, V.; DASGUPTA, S. Carbon streaming in microalgae: extraction and analysis methods for high value compounds. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1304–16, 2017.
- VERHULST, P. F. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. **Correspondence Mathématique et Physique**, v. 10, p. 113–121, 1838.
- VIEGAS, C. V. et al. Algal products beyond lipids: Comprehensive characterization of different products in direct saponification of green alga *Chlorella* sp. **Algal Research**, v. 11, n. 0, p. 156–164, 2015.
- VUNJAK-NOVAKOVIC, G. et al. Air-lift bioreactors for algal growth on flue gas: mathematical modeling and pilot-plant studies. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 44, n. 16, p. 6154–6163, 2005.

- WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S. R. M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 7–11, 1, 2013.
- WALKER, T. L. et al. Microalgae as bioreactors. **Plant cell reports**, v. 24, n. 11, p. 629–641, 2005.
- WANG, B. et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. p. 707–718, 2008.
- WANG, B.; LAN, C. Q.; HORSMAN, M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 4, p. 904, 2012.
- WISHKERMAN, A.; WISHKERMAN, E. Application note: A novel low-cost open-source LED system for microalgae cultivation. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 132, p. 56–62, 2017.
- WU, X.; MERCHUK, J. C. Simulation of algae growth in a bench scale internal loop airlift reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 14, p. 2899–2912, jul. 2004.
- XIE, Y.-P. et al. Simultaneous enhancement of CO₂ fixation and lutein production with thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. F51 using a repeated fed-batch cultivation strategy. **Biochemical Engineering Journal**, v. 86, p. 33–40, 2014.
- XU, L. et al. Microalgal bioreactors: challenges and opportunities. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 3, p. 178–189, 2009.
- XU, Y.; BOEING, W. J. Modeling maximum lipid productivity of microalgae: Review and next step. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 29–39, 2014.
- XU, Y.; ISOM, L.; HANNA, M. A. Adding value to carbon dioxide from ethanol fermentations. **Bioresource technology**, v. 101, n. 10, p. 3311, 2010.
- YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 87–102, 2000.
- YEH, K.-L.; CHANG, J.-S. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 11, p. 1358–1366, 2011.
- YEH, K.-L.; CHANG, J.-S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 120–7, 2012.
- YEN, H.-W. et al. Microalgae-based biorefinery--from biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 166–74, maio 2013.
- YUAN, S. et al. Study on modelling microalgae growth in nitrogen-limited culture system for estimating biomass productivity. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 525–535, 2014.
- YUN, Y. S.; PARK, J. M. Kinetic modeling of the light-dependent photosynthetic activity of the green microalga *Chlorella vulgaris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 3, p. 303–311, 2003.
- ZHAO, B.; SU, Y. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, n. 0, p. 121–132, 2014.

ZHOU, X. et al. Modelling microalgae growth in nitrogen-limited continuous culture. **Energy**, v. 73, p. 575–580, 2014.

ZHU, C. J.; LEE, Y. K. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, n. 2, p. 189–194, 1997.

SHU, C.H.; TSIA, C.C.; LIAO, W.H.; CHEN, K.Y.; HUANG, H.C. Effects of light on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Technology Biotechnology**, v. 87, p. 601-7, 2012.

ZHU, S. et al. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. **Bioresource Technology**, v. 152, n. 0, p. 292–298, 2014.

ZHUKOVA, N. V., & AIZDAICHER, N. A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. **Phytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 351–639, 199.5

ANEXO

ANEXO 1. LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO DA MICROALGA *H.luteoviridis*

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Botânica

Goiania, 15 de abril de 2016

Ilma Sra.

Dra. Rosane Rech (625.453.700-10)
Instituto de Ciência e tecnologia dos Alimentos – UFRGS
Av. Bento Gonçalves 9500 – C. Postal 15090
Porto Alegre - RS– 91501-970

Assunto: Identificação de material ficológico

Venho por meio desta emitir o parecer relativo a amostra recebida através de a qual após detalhada análise fundamentada em caracteres cito-morfológicos concluiu-se que a espécie em questão é *Heterochlorella luteoviridis* (Chodat) J. Neustupa, Y. Nemcova, M. Eliás & P. Skaloud. Esta espécie anteriormente denominada *Chlorella luteoviridis* Chodat.

As características principais a serem descritas para esta espécie fundamenta na morfologia:

Células adultas esféricas (fig. 1-2,4a), 6-8µm, cloroplasto parietal, formando um manto (calota rasa e aberta.) na face inferior da célula alongando-se lateralmente (assemelhando-se ao cloroplasto tipo poculiforme) presença de vacúolos na parte distal ao cloroplasto. Célula esporangial esférica (fig. 4b), 10-12 µm, 4-8 Autosporos as vezes um maior que outro (fig. 3, 4b, 6), esféricos, 3-5 µm, elípticos, 3-4 µm de comprimento por 2,8-3,2 µm de largura, cloroplasto em escudo. Células filhas esféricas a elípticas (fig. 5), 4-5 µm.

O material analisado apresentou morfologia compatível ao material registrado no Banco de Cepas de microalgas UTEX B 23 – para *Chlorella luteoviridis*. Como sugestão indico seja efetuado o sequenciamento genético uma vez que já está disponível a cultura monoclonal.

Proxima pagina com ilustração, informo apenas que o microscópio está com problemas de resolução, mas o ilustrado é suficiente para caracterizar a morfologia da espécie.

Atenciosamente,

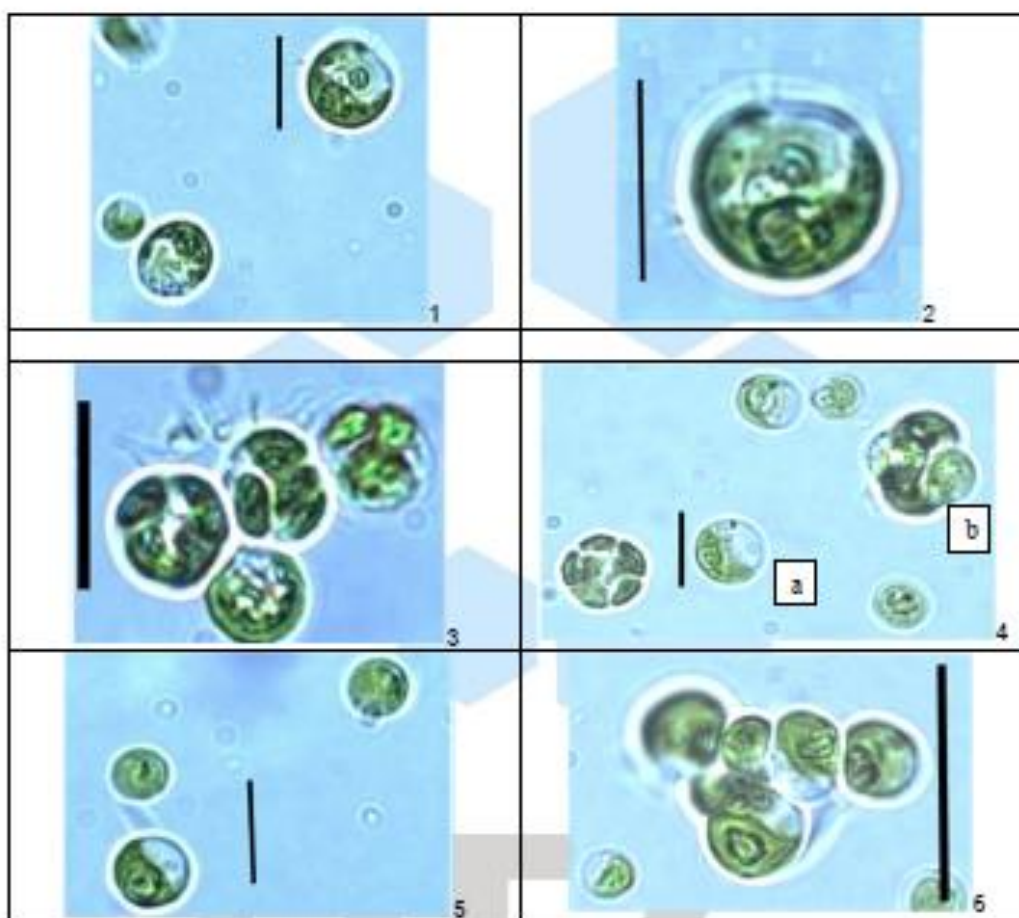
Dr^a. Ina de Souza Nogueira



Prof^a Associada Ina de Souza Nogueira
ICB 1 – Dep^o. de Botânica – Sala 201 – Laboratório de Análise de Gerenciamento Ambiental de Recursos Hídricos – Av. Esperança s/n – Campos Samambaba – Goiânia – Cep: 74690-900 Campus II
tel.: (062) 3521-1218 – 3521- e-mail: inognogueira@ufg.br / inognogueira.ufg@gmail.com



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Botânica



Profª Associada Ina de Souza Nogueira
ICB.1 – Depto. de Botânica – Sala 201 – Laboratório de Análise de Germinação Ambiental de Recursos Hídricos - Av. Esperança s/n - Campos Samambaia - Goiânia - Cep: 74690-900 Campus II
tel.: (062) 3521-1218 – 3521- e-mail: nogueira@ufg.br; inogueira.ufg@gmail.com

APÊNDICE 1. MÉTODOS ANALÍTICOS

1. Métodos analíticos para os capítulos 4, 5 e 6

1.1 Determinação da concentração da biomassa

A concentração de biomassa foi determinada por correlação da curva de calibração de densidade ótica (750 nm) com peso seco (ZHU et al., 2014). Para determinação da curva de calibração, diariamente as amostras foram coletadas em duplicata, em seguida fez-se a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro (Amersham Biosciences, Ultrospec 3100 Pro) e centrifugou-se a $3000 \times g$, durante 20 min, e o sobrenadante foi descartado. Essa operação foi repetida com água destilada para eliminar o sal do meio de cultivo e a biomassa resultante foi seca em estufa a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ até massa constante. A concentração da biomassa foi obtida pela diferença da massa do tubo vazio e do tubo contendo a biomassa seca, considerando o volume coletado.

1.2 Determinação da concentração de nitrogênio

A concentração de nitrato foi determinada por espectrofotometria (CATALDO et al., 1975). As amostras foram coletadas e centrifugadas a $8000 \times g$ por 10 min. Uma alíquota de 0,25 mL do sobrenadante foi transferida para um Erlenmeyer (125 mL), adicionou-se 0,8 mL de solução de ácido salicílico ($\text{HC}_7\text{H}_5\text{O}_3$) 50 g L^{-1} em H_2SO_4 concentrado, aguardou-se 20 min e adicionou-se 19 mL de $\text{NaOH } 2\text{ mol L}^{-1}$. A leitura da absorbância a 410 nm foi realizada em espectrofotômetro (Amersham Biosciences, Ultrospec 3100 Pro). Os resultados foram convertidos em teores de nitrogênio (N-NO_3) (mg L^{-1}), utilizando uma curva analítica construída com NaNO_3 .

1.3 Teor de lipídeos

O teor de lipídeos totais na biomassa foi determinando segundo o método descrito por BLIGH & DYER (1959). Uma amostra de 1 g da biomassa foi medida e colocada em um recipiente âmbar com tampa. Em seguida adicionou-se uma quantidade de clorofórmio (20 mL), metanol (10 mL) e água (10 mL). Na sequência, o conteúdo do frasco foi mantido em agitador

magnético por 20 min. Na mistura foram adicionados mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de uma solução 10 % de Na₂SO₄. A mistura resultante foi transferida para um funil de separação. A fase inferior foi filtrada em papel filtro contendo 1 g de sulfato de sódio anidro e 5 mL do filtrado foram coletados e transferidos para um béquer previamente seco tarado. O béquer foi levado para a secagem em estufa a 105 °C por 2 h. O teor de lipídeos foi determinado pela diferença entre a massa do béquer após a secagem e a massa do béquer vazio conforme Equação (1):

$$C_L = \frac{(m_f - m_i) \times 4}{m_a} \quad (1)$$

Em que:

C_L = Concentração de lipídeos (g g⁻¹)

m_f = massa final do béquer (g)

m_i = massa inicial do béquer vazio (g)

m_a = massa da amostra (g)

1.4 Teor de lipídeos por SPV (sulpho-phospho-vanillin)

O teor de lipídeos totais na biomassa durante o cultivo foi determinando segundo o método descrito por MISHA et al., (2014). O volume de 1 mL foi coletado do reator diariamente e congelado a -22 °C. Para análise, transferiram-se 200 µL dos sobrenadantes para tubos de ensaio com tampa. Às amostras foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, as amostras foram aquecidas por 10 min em água mantida em ebulição em banho-maria a 100 °C e resfriadas em banho de gelo por 5 min. A seguir, 5 mL de solução fosfato-vanilina foram adicionados e as amostras foram incubadas no escuro por 15 min. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Amersham Biosciences, Ultrospec 3100 Pro) em comprimento de onda de 530 nm e relacionada com a curva de calibração. No preparo da curva de calibração foi utilizada uma solução mãe com uma concentração 2 g L⁻¹ (0,02 g de óleo de oliva em 10 mL de clorofórmio). Dessa solução, 100 µL foram transferidos para tubo Falcon de 15 mL e as demais soluções, de concentrações variando de 0,4 mg mL⁻¹ a 1,8 mg mL⁻¹, foram realizadas adicionando determinada quantidade da solução mãe e completando com clorofórmio para um

volume final de 100 μL . Os tubos foram mantidos em estufa a 60 $^{\circ}\text{C}$ para remoção do clorofórmio e, quando o clorofórmio foi evaporado, adicionou-se 200 μL de água destilada em cada tubo. Em seguida, prosseguiu-se com a metodologia previamente descrita para as amostras. A cada preparo de solução fosfato-vanilina realizou-se uma nova curva de calibração, em triplicata.

1.5 Identificação e quantificação dos ácidos graxos

A determinação dos ácidos graxos foi realizada pelo método descrito por Joseph & Ackman (1992), onde os ácidos graxos são determinados na forma de ésteres metílicos de ácidos graxos. O filtrado (5 mL) obtido em 1.3 foi transferido para um tubo de ensaio com tampa e, previamente, seco sob fluxo de nitrogênio. Em cada tubo foram adicionados 1,5 mL de uma solução metanólica de NaOH (0,5 N) e colocados em banho-maria em ebulição por 5 min. Após resfriar foram adicionados 2 mL de solução comercial de trifluoreto de boro 14 % em metanol (BF₃ - Sigma®) e novamente transferido para um banho-maria em ebulição por 30 min. Após o resfriamento da mistura, foram adicionados 2 mL de iso-octano em cada tubo, seguido da adição de 5 mL da solução saturada de NaCl e agitado por 30 s manualmente. Após separação das fases foi coletado 1 mL do iso-octano contendo os ésteres metílicos e transferido para um vial. Em seguida, este 1 mL foi seco sob fluxo de nitrogênio e o extrato seco armazenado a -22 $^{\circ}\text{C}$. Em todas as etapas da extração foi adicionado nitrogênio ao tubo para remover o oxigênio.

O perfil de ácidos graxos foi determinado em cromatógrafo gasoso (GC Modelo 2010, Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com injetor automático, detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida (SBL 100, Shimadzu, 30 m \times 0,25 mm, 0,25 mm de espessura de filme). O solvente das amostras utilizado foi hexano e a temperatura do injetor de 240 $^{\circ}\text{C}$. O gás de arraste foi o hidrogênio com injeção constante de 1 mL min^{-1} . A temperatura do detector de ionização de chama (FID) foi ajustada em 260 $^{\circ}\text{C}$, com injeção de gás hidrogênio a uma taxa de fluxo de 40 mL min^{-1} e de ar a uma taxa de fluxo em 400 mL min^{-1} . A temperatura do forno inicial foi fixada em 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min, aumentada para 250 $^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de 10 $^{\circ}\text{C} \text{ min}^{-1}$.

A identificação de cada ácido graxo encontrado foi realizada comparando o tempo de retenção com uma mistura padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME-MIX 37 padrão Sigma®). Além disso, a identificação foi verificada por meio de injeção da amostra em

cromatógrafo gasosa com detector de espectrometria de massa (GC-MS QP2010 Modelo, Shimadzu, Kyoto, Japão). A quantificação dos ácidos graxos foi realizada de acordo com a Equação 2 (AOCS, 1997) O padrão interno utilizado foi BHT (hidroxitolueno butilado).

$$\text{Ácidos graxos} = \frac{\text{Massa do } P_i \times \text{área da amostra}}{\text{Área do } P_i \times \text{massa da amostra}} \times FC \times FIDx \quad (2)$$

Em que:

Ácidos graxos = fração de lipídeos totais (mg g⁻¹)

P_i = Padrão interno;

FC = Fator de correção de metil éster para ácido graxo livre;

$FIDx$ = Fator de resposta teórico do detector para cada ácido graxo.

1.6 Teor de carboidratos

A determinação de carboidratos totais foi realizada pela adição de 1 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 80 % (fração volumétrica) à amostra (20 mg), sendo em seguida agitada em vórtex por 1 min. A mistura resultante foi levada para o refrigerador, onde permaneceu por 20 h. Após este período, a mistura foi centrifugada a 3000 × g por 20 min. O sobrenadante foi usado para a determinação de carboidratos pelo método do Fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Uma alíquota da amostra foi colocada em tubos de ensaio, onde foi adicionado 0,5 mL de solução aquosa de fenol 5 % e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Entre a adição dos reagentes as amostras foram agitadas em vórtex. Em seguida, a mistura resultante foi resfriada em banho-maria a 30 °C durante 20 min. A leitura da absorbância foi realizada a 490 nm em espectrofotômetro (Amersham Biosciences, Ultrospec 3100 Pro). O teor de carboidratos totais foi determinado a partir de uma curva analítica de glicose (10 µg mL⁻¹ a 90 µg mL⁻¹).

1.7 Determinação do teor de proteínas

Para determinação do teor de proteínas na biomassa, as amostras foram hidratadas e armazenadas durante 12 h a 4 °C e, em seguida, centrifugadas (3000 × g por 20 min). O

sobrenadante foi descartado e ao pellet foram adicionados 5 mL de solução de NaOH (1 mol L⁻¹), agitado vigorosamente e levado para o banho-maria em ebulição durante 20 min. A mistura foi resfriada, e centrifugada (3000 × g por 20 min) e o sobrenadante foi recolhido para a determinação de proteínas segundo método de Lowry et al. (1951). Uma alíquota de 100 µL de amostra foi colocada em tubo de ensaio e foram adicionados 2,5 mL da alcalina (composta por 1 L de NaOH (0,1 mol L⁻¹) adicionada de 20 g de Na₂CO₃ e 1 g de KNaC₄H₄O₆ · H₂O nesta solução acrescentou-se 20 mL da solução 0,5 % de CuSO₄·5H₂O). Em seguida, as amostras foram mantidas em banho-maria a temperatura de 37 °C por 10 min. Logo após o resfriamento foram adicionados 300 µL da solução de Folin-Ciocalteu 1 N (Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Sigma®). As amostras permaneceram ao abrigo de luz por 30 min, a temperatura ambiente, e, em seguida, fez-se a leitura da absorbância a 750 nm em espectrofotômetro (Amersham Biosciences, Ultrospec 3100 Pro). A determinação de proteína foi realizada utilizando uma curva analítica (0,1 mg mL⁻¹ a 1 mg mL⁻¹) de albumina bovina (BSA).

1.8 Carotenoides totais

Uma amostra de sedimento celular foi coletada diariamente em tubo de microcentrífuga de 2 mL e centrifugada (10000 × g por 5 min). O sobrenadante foi descartado e no precipitado adicionaram-se 2 mL de etanol 95 %. As amostras foram armazenadas ao abrigo de luz por 12 h a temperatura de 4 °C. Depois desse período, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Amersham Biosciences, Ultrospec 3100 Pro) nos comprimentos de onda de 664 nm, 649 nm e 470 nm. Para determinação dos carotenoides totais foram aplicadas as Equações 3, 4 e 5 propostas por (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001).

$$C_a = 13,36 \times DO_{665 \text{ nm}} - 5,19 \times DO_{649 \text{ nm}} \quad (3)$$

$$C_b = 27,43 \times DO_{649 \text{ nm}} - 8,12 \times DO_{665 \text{ nm}} \quad (4)$$

$$C_{Ct} = \frac{1000 \times DO_{470 \text{ nm}} - 2,13 \times C_a - 97,64 \times C_b}{209} \quad (5)$$

Em que:

C_a = concentração de Clorofila a (mg L^{-1})

C_b = concentração de Clorofila b (mg L^{-1})

C_{Ct} = concentração de carotenoides totais (mg L^{-1})

Identificação e quantificação de carotenoides

1.9 Identificação e quantificação de carotenoides

Os carotenoides das amostras de biomassa liofilizada (20 mg), foram extraídos exaustivamente com acetato de etila (5 vezes) e metanol (4 vezes), centrifugadas ($3000 \times g$ por 20 min). O sobrenadante foi transferido para um balão de fundo redondo e seco em evaporador rotativo ($T < 30 \text{ }^\circ\text{C}$). O extrato seco foi transferido para uma mistura de éter de petróleo/éter dietílico (1:1), onde foi adicionado uma solução metanólica de KOH (10 %) para a saponificação por cerca de 16 h. O álcali foi removido por lavagem do extrato com água destilada, e o solvente foi evaporado num evaporador rotativo ($T < 30 \text{ }^\circ\text{C}$). O extrato seco foi armazenado a $-22 \text{ }^\circ\text{C}$ no escuro sob uma atmosfera de nitrogênio (MANDELLI et al., 2012). A extração de carotenoides foi realizada em duplicata.

O extrato seco saponificado foi dissolvido em uma mistura de MeOH/MTBE (50:50, em volume). Os carotenoides foram separados em um HPLC (Modelo AD-20, Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com duas bombas de baixa pulsação (modelo LC-20AD), um degaseificador em linha conectado com um detector de arranjo de diodos (DAD) e conectado a um espectrômetro de massas (Bruker Daltonics, modelo Esquire 6000, Bremen, Alemanha).

A separação no HPLC foi realizada utilizando uma coluna C30 YMC [$5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ (diâmetro interno)], utilizando como fase móvel um gradiente linear de uma mistura de metanol/MTBE a partir de 95:5 (em volume) a 70:30 (em volume) durante 30 min, seguido por uma proporção de 50:50 (em volume) durante 20 min, e mantendo esta proporção por 15 min. A taxa de fluxo foi $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ com a temperatura da coluna ajustada para $29 \text{ }^\circ\text{C}$ (SILVA et al., 2014).

Para a identificação dos carotenoides foram utilizados os seguintes parâmetros: ordem de eluição na C30, características espectrais UV-visível [λ_{max} estrutura espectral fina (% III/II) e o pico de cis intensidade (%AB/AII)] e as características do espectro de massas em

comparação com os padrões analisados sob as mesmas condições e dados disponíveis na literatura (MANDELLI et al., 2012; SILVA et al., 2014).

A quantificação dos carotenoides foi realizada pelo uso do sistema de HPLC (Waters série 2695, Wilmington, DE), equipado com um detector de arranjo de diodos (Waters 2998 série dupla). Os carotenoides foram separados sobre uma coluna C30 YMC [5 μm , 250 mm \times 4,6 mm (diâmetro interno)] (Waters, Wilmington, DE) utilizando como fase móvel um gradiente linear de uma mistura de metanol/MTBE a partir de 95:5 (em volume) a 70:30 (em volume) durante 30 min, seguido por uma proporção de 50:50 (em volume) durante 20 min, e mantendo esta proporção por 15 min. A taxa de fluxo foi 0,9 mL min⁻¹ com a temperatura da coluna ajustada para 29 °C (Rodrigues et al., 2014). Os carotenoides foram quantificados utilizando uma curva analítica de seis pontos (1, 3, 6, 10, 12 e 15 $\mu\text{g g}^{-1}$) de all-*trans*- β -caroteno, apresentando um limite de detecção de 0,91 $\mu\text{g g}^{-1}$ e limite de quantificação de 2,75 $\mu\text{g g}^{-1}$.

2. Métodos analíticos para capítulo 7

2.1 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa na cultura foi estimada por medidas de absorvância a 750 nm (ZHU et al., 2014) com espectrofotômetro (Helios Omega UV-VIS Spectrophotometer, Thermo Scientific, Horsham, England).

Os valores de absorvância foram correlacionados com o peso seco das células através de curva de calibração previamente estabelecida. A concentração de biomassa seca foi verificada continuamente, 100 mL da cultura foi centrifugada por 10 min a 4000 rpm (Sigma Sartorius 4-15, Sartorius A.G., Germany) em seguida foi lavada com solução aquosa de bicarbonato de amônio 0,5 M e em seguida foi liofilizada durante 24 h (LYOQUEST-55 Telstar Technologies, S.L. Spain).

2.2 Eficiência fotossintética

A relação entre a fluorescência máxima variável (FV) e a fluorescência máxima (FM) da clorofila (FV/FM) representa o rendimento fotoquímico máximo do fotossistema II. Esta proporção é universalmente considerada como um indicador do estresse das células microalgas.

Os valores foram determinados utilizando um fluorímetro (AquaPen-C AP-C 100, Photon Systems Instruments, Czech Republic).

2.3 Determinação de nitrato

A concentração de nitrato foi determinada nas amostras de sobrenadante coletadas ao longo do cultivo pelo método descrito em (APHA, 2012). A quantidade de amostra 0,5 mL foi adicionada em um balão volumétrico em seguida adicionou-se 0,5 mL da solução de HCL 1 N e completou o volume com água destilada, diluições foram realizadas conforme necessidade. A leitura de densidade ótica em ultravioleta (220 e 275 nm) foi realizada em espectrofotômetro utilizando cubeta de quartzo. Para determinar o branco foi utilizado meio de cultura sem nitrato. Os resultados foram convertidos em teores de nitrogênio (N-NO₃) (mg L⁻¹), utilizando-se curva de calibração determinada com nitrato (NO₃⁻ padrão Sigma®).

2.4 Determinação de fósforo

A concentração de fosfato (P-PO₄) foi determinada nas amostras de sobrenadante coletadas ao longo do cultivo pelo método descrito em Apha, (2012). A quantidade de amostra 0,5 mL foi adicionada em um balão volumétrico, completou-se o volume com água destilada. Diluições foram realizadas conforme necessidade. Na amostra foram adicionados 0,75 mL de reativo A (4.5 mL da solução de molibdato de amônio, 20 mL de ácido sulfúrico e 0,5 mL da solução de antimônio e potássio) em seguida adicionou-se 0,75 mL da solução de ácido ascórbico. As amostras foram agitadas e armazenadas por 30 min sob proteção da luz. A leitura de densidade ótica (882 nm) foi realizada em espectrofotômetro. Para determinar o branco foi utilizado água meio de cultivo sem fosfato. Os resultados foram convertidos em teores de fósforo (P-PO₄) (mg L⁻¹), utilizando-se curva de calibração determinada com fosfato (PO₄-padrão Sigma®).

2.5 Determinação de proteínas

O método de Lowry (1951) foi utilizado para medir o conteúdo de proteína da biomassa pré-tratada. Para o pré-tratamento, alíquotas de 20 mg da biomassa liofilizada foram suspensas durante 20 minutos em 3 mL de tampão de lise em tubo Falcon para facilitar a

extração de proteínas (HURKMAN; TANAKA, 1986). Uma alíquota desta suspensão foi diluída com o tampão de lise de tal modo que a concentração de proteína na mistura diluída estava na faixa de 0 a 1000 mg L⁻¹. Uma porção de 0,1 mL desta solução foi colocada em um tubo Eppendorf e 0,1 mL de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) foram adicionados (DULLEY; GRIEVE, 1975). A mistura resultante foi submetida agitada em vortex. O reagente C (1 mL) foi adicionado ao tubo Eppendorf. O tubo foi submetido agitado em vortex e depois de 10 min, 0,1 mL de reagente de Folin foi adicionado. Após 30 min a absorbância da amostra foi medida a um comprimento de onda de 750 nm

O espectrofotômetro foi zerado usando um branco somente com os reagentes que foram preparados exatamente da mesma maneira que a amostra. Toda análise foi realizada no escuro. A absorbância espectrofotométrica foi convertida em concentração proteica usando uma curva de calibração estabelecida com BSA dissolvido em tampão de lise.

2.6. Determinação de lipídeos

O método de Kochert (1978) foi utilizado para medir o conteúdo de lipídeos totais na biomassa. A quantidade de 100 mg foi medida em um tubo de vidro com tampa, adicionou-se 2 mL da solução de clorofórmio, metanol, (2:1) o tubo foi agitado em vortex e centrifugado a 4500 rpm por 4 min. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado em outro tubo. O procedimento foi repetido até obter uma biomassa branca. No tubo contendo o sobrenadante foi adicionado 3 mL da solução de cloreto de magnésio e 0,3 mL da solução de HCL 0,1N, o conteúdo foi agitado em vortex e centrifugado a 4500 rpm por 4 min. A parte inferior contendo o clorofórmio foi transferida para um novo tubo previamente seco e tarado. O tubo foi conectado a um sistema de injeção de nitrogênio e colocado em um termobloco a 45 °C até peso constante. O teor de lipídios foi determinado gravimetricamente por diferença da massa residual pela massa do tubo vazio em razão da massa inicial da amostra.

2.7 Determinação de carotenoides

Foi realizado previamente a otimização da extração de carotenoides e saponificação e posterior caracterização e quantificação de carotenoides foi realizada segundo Cerón-Garcia et al., (2018). Os carotenoides foram extraídos da biomassa liofilizada (5 mg) previamente macerada com óxido de alumínio (5 mg), no total foram pesados 10 mg em tubos de vidro

Pyrex®. Para saponificação, adicionou-se 1 ml de solução tricomponente monofásica e agitou-se em vórtex durante 30 s. A solução de três componentes foi composta por etanol: hexano: água na proporção de 76:18:6 v/v/v, contendo concentração de hidróxido de potássio (KOH) para cada teste (10, 20, 30 e 40%) ($\text{KOH} / \text{g biomassa seca} \times 100$). Neste ponto, cada tubo foi submerso em banho-maria com variação de temperatura para cada teste (25, 40, 60 e 80 °C), onde foi deixado por 2 min com agitação em vórtice a cada 30 s. Depois disso, o tubo foi retirado, agitado novamente durante 30 segundos e deixado a arrefecer durante 1 h à temperatura ambiente. Subsequentemente, foi centrifugado a 12.000 rpm durante 2 min (Mini Spin Plus, Eppendorf) e o sobrenadante foi transferido para um frasco pronto para análise por HPLC.

Os carotenoides foram analisados por HPLC (Cromatógrafo de Alto Desempenho Líquido Shimadzu SPD10AV) utilizando um detector de arranjo fotodiodo. A coluna utilizada foi LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) (4,6 × 150 mm) na qual a separação foi realizada. O volume de injeção de cada amostra foi de 20 µL. A fase móvel consistiu em: (A) água: metanol 1:4 v/v e (B) acetona: metanol 1:1 v/v. O gradiente das fases móveis foi de 25 % B 0–8 min, 75 % B 8–18 min, 90 % B 18–23 min, 100 % B 25–27 min e 25 % B 27–32 min. Os carotenoides foram eluídos a uma taxa de 1 ml/min e detectados por absorvância a 360-700 nm; para ser preciso, a 440, 450 e 475 nm. Os carotenoides foram quantificados utilizando curva de análise dos padrões de luteína e betacaroteno fornecidos pela Sigma Chemical Co. (EUA) e de violaxantina e zeaxantina foram adquiridos da DHI Lab Products (Hørsholm, Dinamarca). Cada amostra foi analisada em duplicado.

2.8 Determinação de ácidos graxos

O método proposto por Rodríguez-Ruiz et al. (1998) foi utilizado para determinar os ácidos graxos na biomassa pré-tratada. O pré-tratamento consistem em macerar com auxílio do pistilo e gral 10 mg da amostra com 10 mg de óxido de alumínio 99.9 %. O conteúdo de total 20 mg foi transferido para tubo com tampa. O hexano (1 mL) foi adicionado ao tubo juntamente com 50 µL do padrão (C19:0 Sigma®). A mistura resultante foi submetida agitação em vortex. O reagente (metanol/cloreto de acetilo, 100:5v/v) foi adicionado a cada tubo. O tubo foi aquecido a 95 °C por 1 h para a transmetilação, sendo agitado a cada 30 min. A mistura foi resfriada até à temperatura ambiente e 1 mL de água foi adicionado ao tubo. O tubo foi então

agitado e centrifugado a 3500 rpm por 5 min. Duas fases foram formadas: a superior (hexano) foi transferido para vial.

O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies modelo 6890N) equipado com um injetor automático, um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida Supelco Omegawax 250 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm). O gás nitrogênio foi utilizado a uma vazão de 58,1 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 250 e 260 °C, respectivamente. A temperatura do forno foi inicialmente ajustada a 150 °C durante 3 min, depois programada para aumentar para 240 °C a uma taxa de 7,5 °C min⁻¹, permanecendo a 240 °C durante 12 min. A identificação de cada ácido graxo encontrado foi realizada comparando o tempo de retenção com uma mistura padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME-MIX 37 padrão Sigma®). A quantificação de ácidos graxos foi feita usando o ácido não-adeconóico (19:0) como padrão interno. As quantidades individuais dos ácidos graxos foram calculadas usando a equação (6):

$$\text{Ácidos graxos} = \frac{\text{Massa do } P_i \times \text{área da amostra}}{\text{Área do } P_i \times \text{massa da amostra}} \quad (6)$$

Em que:

Ácidos graxos = fração de lipídios totais (mg g⁻¹)

P_i = Padrão interno