

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Influência das condições de cultivo da  
microalga *Dunaliella tertiolecta* na  
produção de carotenoides e lipídios**

TESE DE DOUTORADO

Nicéia Chies Da Fré

**Porto Alegre**

**2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Influência das condições de cultivo da microalga  
*Dunaliella tertiolecta* na produção de carotenoides e  
lipídios

Nicéia Chies Da Fré

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Doutor em Engenharia  
Química

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de  
Processos

**Orientador:**  
**Prof. Dr. Nilson Romeu Marcílio**

**Co-orientadora:**  
**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rosane Rech**

**Porto Alegre**

**2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese *Influência das condições de cultivo da microalga Dunaliella tertiolecta na produção de carotenoides e lipídios*, elaborada por Nicéia Chies Da Fré, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:



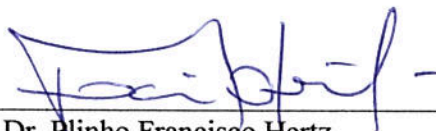
---

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Débora Jung Luvizetto Faccin



---

Prof. Dr. Paulo Fernando Marques Duarte Filho



---

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz



## Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Departamento de Engenharia Química e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, por proporcionar condições para a realização deste trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. À CAPES, ao CNPq e à Rede Carvão, pelo suporte financeiro.

Agradeço aos meus orientadores, Professor Nilson Romeu Marcílio e Professora Rosane Rech, pelos ensinamentos, por toda dedicação, empenho, incentivo, paciência, amizade e apoio realizados constantemente ao longo desse período, especialmente nos momentos difíceis.

Ao Professor Alessandro de Oliveira Rios, Professor Plinho Francisco Hertz e Professor Marco Antônio Záchia Ayub, pela grande colaboração e disponibilização dos laboratórios. À Professora Débora Jung Luvizetto Faccin pela amizade, disponibilidade e auxílio prestados em diversos momentos.

Aos amigos e colegas do PPGEQ e do ICTA que contribuíram para a realização deste trabalho. Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia pela amizade e cooperação. Em especial, à Luce Helena Kochem, Géssica Marchese Roman, Tobias Dierings, Cristiane Redaelli, Arthur Lygeros das Chagas e André Jarenkow. Ao Secretário do PPGEQ, Patrício José da Silva Freitas, pela pronta disposição e auxílio.

Aos meus pais, Valdir Chies e Marlene Debenetti Chies, pelo amor incondicional, pelo incentivo constante e pela ajuda incansável. A minha admiração por vocês é eterna. Ao meu marido e companheiro Emerson Da Fré que sempre me incentivou, ajudou e soube compreender minha ausência. À Família do Emerson, por todo carinho e ajuda, especialmente, à minha filha Manuela, razão da minha vida e do meu esforço contínuo.





## Resumo

A microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* é um microrganismo unicelular fotossintético capaz de fixar dióxido de carbono da atmosfera e proveniente de gases de exaustão industrial e utilizá-lo como única fonte de carbono para o aumento da biomassa. Enquanto isso, além de biomassa, também é capaz de produzir quantidades consideráveis de carotenoides e lipídios, entre outras substâncias de grande interesse para indústrias alimentícias e farmacêuticas que buscam a utilização cada vez maior de compostos de fontes naturais em suas formulações. Neste trabalho foram estudados os efeitos da salinidade do meio (em concentração molar de NaCl), da temperatura, da intensidade de luz, da fonte e concentração de nitrogênio no cultivo da *D. tertiolecta* em fotobiorreator *airlift*, buscando o aumento na produção de biomassa, carotenoides e lipídios, bem como representar matematicamente este bioprocessos. Inicialmente, a influência da temperatura e da concentração salina foi estudada através de experimentos com meio de cultura f/2 padrão, com diferentes concentrações salinas. A temperatura e a concentração salina influenciaram de forma diferente os resultados obtidos. A temperatura teve forte influência na produção de biomassa, na biofixação de dióxido de carbono e na produção de lipídios pelas células. Por outro lado, a salinidade teve forte influência na produção dos carotenoides. A partir da avaliação e combinação dos resultados, foram determinadas as condições apropriadas de temperatura e salinidade do meio para maior produção de biomassa, lipídios e carotenoides simultaneamente: 28 °C e 0,715 M de NaCl. Seis carotenoides foram identificados por CLAE no extrato de *D. tertiolecta*: *trans*-luteína, *trans*-β-caroteno, *trans*-zeaxantina, *trans*-antheraxantina, *trans*-neoxantina e 9-*cis*-β-caroteno. Os carotenoides *trans*-luteína, *trans*-β-caroteno e *trans*-zeaxantina foram quantificados. As maiores quantidades de luteína, β-caroteno e zeaxantina obtidas nos experimentos foram, respectivamente,  $1315 \pm 36 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $732 \pm 51 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $244 \pm 76 \mu\text{g g}^{-1}$ . A partir destes resultados, cultivos foram realizados variando-se intensidade de luz e fonte e concentração de nitrogênio a fim de determinar a influência destes parâmetros. A intensidade de luz de 17,5 klx e concentração inicial de nitrato de sódio de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  resultou nas maiores produtividades de biomassa ( $0,176 \pm 0,005 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), carotenoides ( $0,738 \pm 0,038 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) e lipídios ( $16,68 \pm 1,50 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Os dados experimentais desses cultivos foram utilizados na etapa de estimação de parâmetros. Em comparação com modelos relatados na literatura, os modelos propostos apresentaram melhor ajuste para diferentes concentrações de nitrato de sódio testadas, com reduzido número de parâmetros.

## Abstract

The marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* is a unicellular photosynthetic microorganism that can fix carbon dioxide from the atmosphere and from industrial exhaust gases, using it as the solely carbon source to increase biomass. Meanwhile, more than biomass, this microorganism also can produce great amounts of carotenoids, lipids and other substances of interest to pharmaceutical and food industries that seek to increase the use of compounds derived from natural sources in their formulations. In this work, the effects of medium salinity (in molar concentration of NaCl), temperature, light intensity and nitrogen source and concentration over the cultivation of *D. tertiolecta* in an airlift photobioreactor were studied aiming the increase of biomass, carotenoids and lipids production, as well the development of a mathematical model for this bioprocess. Initially, the influence of temperature and salt concentration was studied by experiments with standard f/2 culture medium, with different salt concentrations. Temperature and salt concentration differently affected the results. Temperature had a strong effect on biomass production, carbon dioxide biofixation and lipid production by the cells. On the other hand, salinity showed strong effect on carotenoid production. The appropriate temperature and medium salinity to increase simultaneously biomass, lipids and carotenoids was 28 °C and 0.715 M NaCl. Six carotenoids were identified in the extract of *D. tertiolecta* by HPLC: all-*trans*-lutein, all-*trans*- $\beta$ -carotene, all-*trans*-zeaxanthin, all-*trans*-antheraxanthin, all-*trans*-neoxanthin and 9-*cis*- $\beta$ -carotene. The carotenoids all-*trans*-lutein, all-*trans*- $\beta$ -carotene and all-*trans*-zeaxanthin were quantified. The highest amount of lutein,  $\beta$ -carotene and zeaxanthin reached in the experiments were  $1315 \pm 36 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $732 \pm 51 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $244 \pm 76 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively. From these results, cultures were performed by varying light intensity and nitrogen source and concentration to determine the influence of these parameters. A light intensity of 17.5 klx and initial sodium nitrate concentration of  $300 \text{ mg L}^{-1}$  resulted in the highest biomass ( $0.176 \pm 0.005 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), carotenoid ( $0.738 \pm 0.038 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) and lipid ( $16.68 \pm 1.50 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) productivities. The experimental data of these cultures were used for parameter estimation. Compared to earlier models reported in the literature, the proposed models showed better fitting for different sodium nitrate concentrations tested with reduced number of parameters.

# Sumário

<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>xv</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Nomenclatura</b> .....	<b>xviii</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>5</b>
2.1 Microalgas	6
2.2 Fixação de dióxido de carbono	8
2.3 Nutrição das microalgas	11
2.4 Microalgas <i>Dunaliella</i>	13
2.5 Carotenoides	15
2.6 Ácidos graxos poli-insaturados	19
2.7 Ácidos graxos para a produção de biocombustíveis	20
2.8 Condições de cultivo	22
2.9 Sistemas de cultivo	26
2.10 Fotobiorreatores tubulares	29
2.11 Fotobiorreatores de placas	30
2.12 Fotobiorreatores <i>airlift</i>	31
2.13 Modelagem matemática do bioprocessamento	35
2.14 Referências Bibliográficas	36
<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>45</b>
3.1 Microrganismo	45
3.2 Meio de cultura	46
3.3 Experimentos em fotobiorreator	47
3.3.1 Cultivos com diferentes concentrações salinas e temperaturas .....	49
3.3.2 Cultivos com diferentes intensidades de luz.....	51
3.3.3 Cultivos com diferentes fontes de nitrogênio .....	53
3.3.4 Cultivos com diferentes concentrações de nitrogênio .....	53
3.3.5 Cultivos submetidos a condições de estresse .....	54
3.4 Métodos analíticos	55
3.4.1 Análise de carotenoides por CLAE .....	55
3.4.2 Determinação de carotenoides totais .....	56
3.4.3 Determinação de lipídios totais .....	57

3.4.4 Análise elementar.....	58
3.4.5 Determinação de NaNO <sub>3</sub> no meio de cultivo.....	58
3.5 Modelagem matemática e estimação de parâmetros	59
3.6 Referências Bibliográficas	61
<b>Artigo 1 - Effect of temperature and salinity on the production of carotenoids and lipids by marine microalga .....</b>	<b>63</b>
4.1 Introduction	64
4.2 Materials and Methods	65
4.2.1 Microorganism and culture medium .....	65
4.2.2 Photobioreactor cultivation .....	65
4.2.3 Biomass analysis .....	66
4.2.4 Statistical analysis .....	66
4.3 Results and Discussion	66
4.4 Conclusions	70
4.5 Acknowledgements	70
4.6 References	70
<b>Artigo 2 - Carotenoid and lipid content of <i>Dunaliella tertiolecta</i> cultured at different nitrogen concentrations, light intensities and stress conditions .....</b>	<b>73</b>
5.1 Introduction	74
5.2 Materials and Methods	75
5.2.1 Microorganism and pre-cultures .....	75
5.2.2 Photobioreactor cultivation .....	76
5.2.3 Effect of light intensity .....	76
5.2.4 Effect of nitrogen concentration .....	76
5.2.5 Effect of stress conditions in the stationary growth phase.....	77
5.2.6 Analytical determinations .....	77
5.2.7 Statistical analysis .....	78
5.3 Results and Discussion	78
5.3.1 Effect of light intensity .....	78
5.3.2 Effect of the nitrogen concentration.....	79
5.3.3 Effects of the stress conditions.....	81
5.4 Conclusions	83
5.5 Acknowledgements	84
5.6 References	84
<b>Artigo 3 - Kinetic modeling of growth and carotenoid production by <i>Dunaliella tertiolecta</i> under different nitrogen concentrations.....</b>	<b>89</b>
6.1 Introduction	90
6.2 Materials and Methods	91

6.2.1 Microorganism and pre-cultures.....	91
6.2.2 Photobioreactor cultivation .....	92
6.2.3 Analytical determinations.....	92
6.3 Model Development	92
6.3.1 Biomass and nitrogen .....	92
6.3.2 Carotenoid production .....	94
6.3.3 Parameter estimation .....	94
6.4 Results and Discussion	95
6.5 Conclusions	103
6.6 Acknowledgements	103
6.7 Symbols used	103
6.8 References	105
<b>Considerações Finais .....</b>	<b>107</b>
7.1 Discussão geral dos principais resultados	107
7.2 Perspectivas	111
7.3 Referências Bibliográficas	112
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>115</b>
<b>Apêndice A - Influence of temperature and salinity over CO<sub>2</sub> biofixation by the microalgae <i>Dunaliella tertiolecta</i>.....</b>	<b>127</b>
1 Introduction	129
2 Methods	129
3 Results and Discussion	130
4 Conclusions	134
5 References	134
<b>Apêndice B - Influência das fontes e concentrações de nitrogênio no crescimento da microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> em fotobiorreator airlift.....</b>	<b>135</b>
1 Introdução	137
2 Material e Métodos	138
3 Resultados e Discussões	140
4 Conclusões	142
5 Referências	142
<b>Apêndice C - Influência da luminosidade e concentração salina na produção de lipídios e carotenoides pela microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> em fotobiorreator airlift.....</b>	<b>145</b>
1 Introdução	147
2 Materiais e Métodos	148
2.1 Microorganismo e meio de cultivo.....	148

2.2 Experimentos em fotobiorreator .....	148
2.3 Análises da biomassa .....	150
2.4 Análise de NaNO <sub>3</sub> no meio de cultivo .....	150
3 Resultados e Discussões	151
4 Referências	153

# Lista de Figuras

<b>Figura 2.1:</b> Fluxograma conceitual de processos combinados utilizando microalgas para produção de biocombustíveis, biomitigação de CO <sub>2</sub> e remoção de N/P de efluentes. Entradas: fonte de carbono, CO <sub>2</sub> ; fontes de nitrogênio e fósforo, efluentes ricos em N/P; fonte de energia, energia solar. Saídas: efluentes com baixo N/P, bioprodutos com valor agregado e biocombustíveis (Wang <i>et al.</i> , 2008).....	10
<b>Figura 2.2:</b> <i>Dunaliella tertiolecta</i> ( <a href="http://www.sccap.dk/pix/K-0591.jpg">http://www.sccap.dk/pix/K-0591.jpg</a> . Acesso em 12/03/2013).....	13
<b>Figura 2.3:</b> Estrutura de alguns carotenoides (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1998). .....	16
<b>Figura 2.4:</b> Sistemas de cultivo de microalgas: (a) lagoa raceway; (b) fotobiorreator de placas; (c) fotobiorreator tubular inclinado e (d) fotobiorreator horizontal/contínuo (Bitog <i>et al.</i> , 2011).....	26
<b>Figura 2.5:</b> Representação do posicionamento dos painéis de um fotobiorreator de placas ao ar livre (Xu <i>et al.</i> , 2009). .....	30
<b>Figura 2.6:</b> Diagramas esquemáticos de (a) biorreator <i>airlift</i> e (b) coluna de bolhas (Kaewpintong <i>et al.</i> , 2007). .....	31
<b>Figura 2.7:</b> Representação de um reator <i>airlift</i> de tubos concêntricos com as seções <i>riser</i> e <i>downcomer</i> indicadas (Gouveia <i>et al.</i> , 2003). .....	32
<b>Figura 2.8:</b> Representação de um fotobiorreator <i>airlift</i> utilizado para o cultivo de microalgas (Xu <i>et al.</i> , 2009). .....	33
<b>Figura 3.1:</b> Incubadora com agitação orbital utilizada para o preparo dos inóculos.....	45
<b>Figura 3.2:</b> Desenho 3D do fotobiorreator de 2,2 L (Kochem <i>et al.</i> , 2014).....	48
<b>Figura 3.3:</b> Fotobiorreator de 2,2 L. ....	48
<b>Figura 3.4:</b> Prateleira com oito cultivos realizados em série.....	49
<b>Figura 3.5:</b> Relação entre biomassa (g L <sup>-1</sup> ) e densidade ótica (570 nm).....	51
<b>Figura 3.6:</b> Relação entre biomassa (g L <sup>-1</sup> ) e densidade ótica (750 nm). ....	52
<b>Figura 3.7:</b> Extração dos carotenoides existentes nas microalgas com solventes orgânicos. .	55
<b>Figura 3.8:</b> Extrator Soxhlet. ....	57
<b>Figura 3.9:</b> Relação entre concentração de NaNO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> ) e densidade ótica (517 nm).. ....	59
<b>Figura 4.1:</b> HPLC chromatogram of carotenoid extract from <i>Dunaliella tertiolecta</i> . Peak identification: (1) all-trans-neoxanthin, (2) all-trans-antheraxanthin, (3) all-trans-lutein, (4) all-trans-zeaxanthin, (5) all-trans-β-carotene, (6) 9-cis-β-carotene.....	67
<b>Figure 4.2:</b> Response surfaces for the amounts of: (a) lutein (μg g <sup>-1</sup> ), (b) β-carotene (μg g <sup>-1</sup> ), (c) zeaxanthin (μg g <sup>-1</sup> ), (d) total lipids (%) at 93 h of culture as functions of the temperature and salinity .....	69
<b>Figure 5.1:</b> (a) Biomass (g L <sup>-1</sup> ), (b) total carotenoid content (mg g <sup>-1</sup> ), (c) NaNO <sub>3</sub> concentration in the culture medium (mg L <sup>-1</sup> ) of <i>Dunaliella tertiolecta</i> cultivated in FPA-IHE photobioreactors with different initial NaNO <sub>3</sub> concentrations.....	80
<b>Figure 5.2:</b> (a) Biomass (g L <sup>-1</sup> ), (b) total carotenoid content (mg g <sup>-1</sup> ), (c) NaNO <sub>3</sub> concentration in the culture medium (mg L <sup>-1</sup> ) of <i>Dunaliella tertiolecta</i> cultivated in FPA-IHE photobioreactors under stress conditions (salinity and light intensity) .....	82
<b>Figure 5.3:</b> Response surface for the total lipid content (%) at 210 h of culture as functions of the salinity and light intensity. ....	83
<b>Figure 6.1:</b> Experimental data and simulated curves of <i>D. tertiolecta</i> cultured in 75 mg L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> initial concentration. Experimental data: (a) biomass (■), (b) nitrogen (▲), and (c) total carotenoids (●). Models: Droop (— · —), and ModN (·····) .....	97

<b>Figure 6.2:</b> Experimental data and simulated curves of <i>D. tertiolecta</i> cultured in 300 mg L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> initial concentration. Experimental data: (a) biomass (■), (b) nitrogen (▲), and (c) total carotenoids (●). Models: Droop (— · —), ModN (·····), ModNKx (— — —), and ModNXmax (———).	98
<b>Figure 6.3:</b> Experimental data and simulated curves of <i>D. tertiolecta</i> cultured in 600 mg L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> initial concentration. Experimental data: (a) biomass (■), (b) nitrogen (▲), and (c) total carotenoids (●). Models: Droop (— · —), ModN (·····), ModNKx (— — —), and ModNXmax (———).	99
<b>Figure 6.4:</b> Experimental data and simulated curves of <i>D. tertiolecta</i> cultured in 900 mg L <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> initial concentration. Experimental data: (a) biomass (■), (b) nitrogen (▲), and (c) total carotenoids (●). Models: Droop (— · —), ModN (·····), ModNKx (— — —), and ModNXmax (———).	100
<b>Figure A.1:</b> Growth of <i>Dunaliella tertiolecta</i> at salinity of 0.715 M and different temperatures.	130
<b>Figure A.2:</b> Growth of <i>Dunaliella tertiolecta</i> at salinity the higher salinities of CCD.	131
<b>Figure A.3:</b> Growth of <i>Dunaliella tertiolecta</i> at salinity the lower salinities of CCD.	131
<b>Figure A.4:</b> Response surface for biomass values (g/L) in 93 hours of culture as a function of temperature and salinity.	132
<b>Figure A.5:</b> Response surface for total lipid content (%) as a function of temperature and salinity.	133
<b>Figure A.6:</b> Average rates of CO <sub>2</sub> fixation in microalgae <i>Dunaliella tertiolecta</i> grown over 100 h for the experiments.	133
<b>Figura B.1:</b> Fluxograma conceitual de processos combinados utilizando microalgas para produção de biocombustíveis, biomitigação de CO <sub>2</sub> e remoção de N/P de efluentes. Entradas: fonte de carbono, CO <sub>2</sub> ; fontes de nitrogênio e fósforo, efluentes ricos em N/P; fonte de energia, energia solar. Saídas: efluentes com baixo N/P, bioprodutos com valor agregado e biocombustíveis (Wang <i>et al.</i> , 2008).	138
<b>Figura B.2:</b> Valores médios de biomassa (g/L) da microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> cultivadas com diferentes sais fontes de nitrogênio.	140
<b>Figura B.3:</b> Valores médios de biomassa (g/L) da microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> cultivada ao longo de 188 h com diferentes concentrações de NaNO <sub>3</sub> .	141
<b>Figura B.4:</b> Taxas médias de biofixação de CO <sub>2</sub> da microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> cultivada ao longo de 188 h para os experimentos realizados.	142
<b>Figura C.1:</b> (a) Biomassa, (b) consumo de nitrato de sódio, (c) concentração de carotenoides (mg L <sup>-1</sup> ) e (d) concentração de carotenoides (mg g <sup>-1</sup> ) nos cultivos de <i>Dunaliella tertiolecta</i> em fotobiorreator airlift em condições de estresse salino e luminoso.	151
<b>Figura C.2:</b> Superfície de resposta da (a) concentração de carotenoides em (mg L <sup>-1</sup> ) e do (b) teor de lipídios totais em 210 h de cultivo em função da salinidade e intensidade luminosa.	152



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 2.1:</b> Alguns produtos obtidos de microalgas (Lee, 1997; Walker <i>et al.</i> , 2005; Spolaore <i>et al.</i> , 2006).....	8
<b>Tabela 2.2:</b> Algumas microalgas estudadas para a biomitigação de CO <sub>2</sub> (adaptada de Wang <i>et al.</i> , 2008).....	11
<b>Tabela 2.3:</b> Conteúdo lipídico e produtividade de diferentes espécies de microalgas (Mata <i>et al.</i> , 2010).....	22
<b>Tabela 2.4:</b> Comparação entre fotobiorreatores e sistemas abertos para a produção em grande escala de microalgas (Mata <i>et al.</i> , 2010). ....	28
<b>Tabela 3.1:</b> Meio de cultura f/2 (Guillard, 1975). ....	46
<b>Tabela 3.2:</b> Solução de metais traço. ....	47
<b>Tabela 3.3:</b> Solução de vitaminas .....	47
<b>Tabela 3.4:</b> Planejamento experimental da realização dos cultivos. ....	50
<b>Tabela 3.5:</b> Gradiente da fase móvel utilizado para as análises no CLAE.....	56
<b>Table 4.1:</b> Assignment data for carotenoids in <i>Dunaliella tertiolecta</i> . ....	67
<b>Table 4.2:</b> Values of the regression coefficients of the coded variables and regression parameters for the amount of lutein, zeaxanthin and $\beta$ -carotene and total lipids at 93 h of cultivation of <i>Dunaliella tertiolecta</i> . ....	68
<b>Table 5.1:</b> Salt and light intensity of the stress conditions .....	77
<b>Table 5.2:</b> Growth of <i>Dunaliella tertiolecta</i> cultivated at different light intensities ( <i>I</i> ). Biomass ( <i>X</i> ), specific growth rate ( $\mu$ ), carotenoid content ( $C_{Ci}$ ), lipid content ( <i>L</i> ), biomass productivity ( $P_X$ ), carotenoid productivity ( $P_C$ ), and lipid productivity ( $P_L$ )..	79
<b>Table 5.3:</b> Growth parameters of <i>Dunaliella tertiolecta</i> cultivated at different initial NaNO <sub>3</sub> concentrations. Biomass ( <i>X</i> ), specific growth rate ( $\mu$ ), carotenoid content ( $C_{Ci}$ ), lipid content ( <i>L</i> ), biomass productivity ( $P_X$ ), carotenoid productivity ( $P_C$ ), and lipid productivity ( $P_L$ ) .....	80
<b>Table 5.4:</b> Biomass ( <i>X</i> ), carotenoid content ( $C_{Ci}$ ), and lipid content ( <i>L</i> ) of <i>Dunaliella tertiolecta</i> cultivated under the stress conditions (salinity and light intensity) .....	82
<b>Table 6.1:</b> Results for the parameters estimation with experimental data from cultures with different NaNO <sub>3</sub> initial concentrations and values of coefficient of determination ( $R^2$ ) and mean squared error (MSE).....	96
<b>Table A.1:</b> Central composite design of experiments.....	130
<b>Tabela C.1:</b> Biomassa e concentrações de carotenoides e lipídios nos cultivos de <i>Dunaliella tertiolecta</i> em fotobiorreator airlift em condições de estresse salino e luminoso em 210 h. ....	152

# Nomenclatura

## Lista de Símbolos

$C_{Ct}$	Concentração de carotenoides totais	$\text{mg L}^{-1}$
$g$	Constante gravitacional	$\text{m s}^{-2}$
$I$	Intensidade de luz	klx
$k_N$	Constante de saturação para o nitrogênio	$\text{g L}^{-1}$
$k_q$	Quota celular mínima	$\text{g g}^{-1}$
$k_X$	Constante de saturação para a biomassa	$\text{g L}^{-1}$
$L$	Conteúdo de lipídios	$\text{mg g}^{-1}$
$m_N$	Termo correspondente ao consumo de nitrogênio para manutenção celular	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$n$	Constante empírica	
$N$	Concentração de nitrogênio	$\text{g L}^{-1}$
$N_{dl}$	Concentração de nitrogênio adimensional	
$N_{in}$	Concentração inicial de nitrogênio	$\text{g L}^{-1}$
$N_{ref}$	Concentração de nitrogênio de referência	$\text{g L}^{-1}$
$N/P$	Razão nitrogênio/fósforo	
$OD_{570}$	Densidade ótica lida no comprimento de onda de 570 nm	
$OD_{750}$	Densidade ótica lida no comprimento de onda de 750 nm	
$P_b$	Pressão	Pa
$P_C$	Produtividade de carotenoides	$\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$
$P_{CO_2}$	Taxa de fixação de $\text{CO}_2$	$\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$
$P_L$	Produtividade de lipídios	$\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$
$P_X$	Produtividade de biomassa	$\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$
$q$	Quota celular interna de nitrogênio	$\text{g g}^{-1}$
$t$	Tempo	h
$T$	Temperatura	$^{\circ}\text{C}$
$X$	Concentração de biomassa	$\text{g L}^{-1}$
$X_{max}$	Concentração de biomassa máxima	$\text{g L}^{-1}$
$x_T$	Variável codificada referente à temperatura	
$x_S$	Variável codificada referente à concentração salina	
$Y$	Variável dependente	
$Y_{XN}$	Coefficiente que relaciona formação de biomassa e nitrogênio consumido	$\text{g g}^{-1}$

## Lista de Símbolos Gregos

$\alpha$	Termo correspondente à formação de carotenoides associada ao crescimento	$\text{mg g}^{-1}$
$\beta$	Termo correspondente à formação de carotenoides não associada ao crescimento	$\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$\beta_0$	Coeficiente de regressão referente à média	
$\beta_T$	Coeficiente de regressão referente à variável codificada $x_T$	
$\beta_S$	Coeficiente de regressão referente à variável codificada $x_S$	
$\beta_{TT}$	Coeficiente de regressão referente ao termo quadrático da variável codificada $x_T$	
$\beta_{SS}$	Coeficiente de regressão referente ao termo quadrático da variável codificada $x_S$	
$\beta_{TS}$	Coeficiente de regressão referente à interação das variáveis codificadas	
$\mu$	Velocidade específica de crescimento	$\text{h}^{-1}$
$\mu_m$	Velocidade específica de crescimento máxima do modelo de Droop	$\text{h}^{-1}$
$\mu_{max}$	Velocidade específica de crescimento máxima	$\text{h}^{-1}$
$\rho$	Velocidade de absorção de nitrogênio	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$\rho_L$	Densidade do líquido	$\text{kg m}^{-3}$
$\rho_{max}$	Velocidade de absorção de nitrogênio máxima	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$\varphi_d$	Fração de <i>gas holdup</i> do <i>downcomer</i>	
$\varphi_r$	Fração de <i>gas holdup</i> do <i>riser</i>	

## Lista de Abreviações

ALR	Reator <i>airlift</i>
ARA	Ácido araquidônico
ATP	Adenosina trifosfato
CCD	Planejamento composto central
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DHA	Ácido docosahexaenoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAME	Ésteres metílicos de ácidos graxos
FObj	Função objetivo
FPA-IHE	Fotobiorreator de placas <i>airlift</i> com trocador de calor interno
GCA	Ácido gama-linolênico
H <sub>D</sub>	Altura do tubo interno
H <sub>R</sub>	Altura do tubo externo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LA	Ácido linoleico
LED	Diodo emissor de luz
LOD	Limites de detecção
LOQ	Limites de quantificação
MSE	Erro médio quadrático
MTBE	Éter metil-terc-butílico
PGK	Fosfoglicerato quinase
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
RNA	Ácido ribonucleico
SCO	Óleo de organismos unicelulares
SOD	Superóxido dismutase
TAG	Triacilgliceróis

# Capítulo 1

## Introdução

O interesse no estudo visando a produção de microalgas para utilização como matéria-prima em muitos processos é crescente em todo o mundo. Particularmente, no litoral brasileiro, muitas espécies de microalgas podem ser encontradas facilmente. Esse interesse deve-se à essencial importância destes microrganismos por pertencerem ao primeiro nível trófico de diversas cadeias alimentares, ou seja, são capazes de sintetizar matéria orgânica e fixar a energia luminosa sob a forma de energia química. A utilização em distintas áreas como na obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentar, química e farmacêutica, na produção de energia, no tratamento de águas residuais, dentre outras, também promovem interesse por esta atividade.

Há outros diversos fatores positivos para que o cultivo de microalgas seja viabilizado: vantagens como o menor consumo de água, se comparado ao cultivo de plantas terrestres; maior eficiência fotossintética; colheita ao longo de todo ano e cultivo realizado em condições insalubres, ou seja, elas podem se desenvolver a custo de água salgada ou proveniente de resíduos sanitários. O cultivo de microalgas também promove a remoção de dióxido de carbono da atmosfera através de biofixação, reduzindo as emissões de gases de efeito estufa e, podendo ser utilizado como única fonte de carbono para a produção de biomassa. Outro ponto forte é o habitat natural das microalgas. Elas podem ser produzidas em regiões com condições climáticas extremas, regiões desérticas, por exemplo, não tomando espaço de terras destinadas ao plantio de alimentos.

A importância dos produtos gerados a partir das microalgas é bastante relevante. A aplicação mais comum é a utilização das microalgas diretamente como ração animal para algumas espécies marinhas; porém, nos últimos anos, a identificação de substâncias sintetizadas por estes microrganismos têm despertado grande interesse. Em aplicações mais gerais, alguns dos compostos extraídos com potencial de exploração comercial são: corantes, antioxidantes, ácidos graxos, esteróis e polissacarídeos destinados à produção de aditivos

alimentares, cosméticos e óleos. Particularmente os pigmentos podem ser encontrados nas microalgas devido à sua função antioxidante, atuando como fotoprotetores.

As microalgas do gênero *Dunaliella*, especialmente *D. salina* e *D. tertiolecta*, são estudadas para a obtenção de biomassa e para posterior extração de carotenoides, como luteína,  $\beta$ -caroteno e zeaxantina. Atualmente, os carotenoides utilizados nas indústrias são obtidos por rota química ou são extraídos de fontes naturais. A preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos e fármacos tornou cada vez mais requisitados os carotenoides sintetizados naturalmente por rota biotecnológica. Além disso, as microalgas do gênero *Dunaliella* têm um considerável percentual de lipídios em sua composição, comparável as oleaginosas tradicionalmente utilizadas na fabricação de óleos e biocombustíveis.

Diante da perspectiva de crescimento da demanda por produtos naturais e fontes alternativas de energia e pela necessidade de utilização de processos produtivos mais eficientes e com menores prejuízos ambientais, o desenvolvimento de tecnologias para o cultivo de microalgas em grande escala para a extração de bioprodutos ganha importância mundial. Como descrito anteriormente, as contribuições ambientais deste bioprocessos são significativas, porém muitos desafios precisam ser superados para aumentar a competitividade em relação aos processos tradicionais de obtenção de produtos sintéticos e combustíveis. Estas são as justificativas para a realização deste trabalho com a *D. tertiolecta* BE 003, bem como o fato desta microalga ser capaz de produzir simultaneamente quantidades significativas de carotenoides e lipídios, a fim de contribuir com esta área da ciência.

Neste contexto, o **objetivo principal** deste trabalho foi determinar como as condições de cultivo da *D. tertiolecta* BE 003 influenciam na produção de biomassa, carotenoides e lipídios. Mais detalhadamente, os **objetivos específicos** são:

- ✓ avaliar a influência da temperatura e da salinidade, em termos de concentração de NaCl, na produção de carotenoides e lipídios e formação de biomassa;
- ✓ avaliar a influência da fonte e quantidade de nitrogênio, através da avaliação de diferentes nitratos em diferentes concentrações na produção de carotenoides e lipídios e formação de biomassa;
- ✓ submeter os cultivos a maior intensidade luminosa e salinidade no final da fase de crescimento logarítmico das células, visando aumento na produção de carotenoides e lipídios;
- ✓ construir modelos matemáticos preditivos de cinéticas de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto em fotobiorreator.

Escolheu-se apresentar o trabalho no formato de artigos, tanto os já publicados quanto aqueles submetidos à publicação, acrescidos de dois capítulos para contextualização geral (Capítulos 2 e 3). Desta forma, o Capítulo 2 traz a revisão bibliográfica com breve descrição sobre as microalgas de uma forma geral, depois, de forma mais específica, sobre a *D. tertiolecta* e sobre os produtos de interesse dela extraídos, carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados. Neste capítulo, também são abordados as condições e sistemas de cultivo e os fotobiorreatores normalmente utilizados, evidenciando vantagens e limitações do uso de cada modelo, bem como a modelagem matemática do bioprocessos envolvido. No Capítulo 3 são

apresentados os materiais e métodos utilizados nos estudos, apesar de conter nos artigos materiais e métodos específicos de cada trabalho. Os Capítulos 4, 5 e 6 referem-se aos artigos. No Capítulo 4 é apresentado o Artigo 1 - Effect of temperature and salinity on the production of carotenoids and lipids by marine microalga (submetido ao periódico *Ciência Rural*). No Capítulo 5 é apresentado o Artigo 2 - Carotenoid and lipid content of *Dunaliella tertiolecta* cultured at different nitrogen concentrations, light intensities and stress conditions (submetido ao periódico *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*). No Capítulo 6 é apresentado o Artigo 3 - Kinetic modeling of *Dunaliella tertiolecta* growth under different nitrogen concentrations (aceito para publicação no periódico *Chemical Engineering & Technology*). No Capítulo 7 são discutidas as considerações finais deste trabalho, as principais conclusões e as perspectivas para trabalhos futuros. Com o objetivo de facilitar a leitura, além da lista apresentada ao final de cada Capítulo com as referências nele utilizadas, uma lista geral das referências utilizadas também é apresentada no final do documento. Ao final, estão incluídos trabalhos relevantes para a complementação do estudo. Eles compõem a modalidade de artigos completos publicados em Anais de congresso. No Apêndice A é apresentado o trabalho intitulado “Influence of temperature and salinity over CO<sub>2</sub> biofixation by the microalgae *Dunaliella tertiolecta*” (apresentado e publicado nos Anais da International Conference on Coal Science and Technology, realizada em outubro de 2011 em Oviedo, Espanha). No Apêndice B é apresentado o trabalho intitulado “Influência das fontes e concentrações de nitrogênio no crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator *airlift*” (apresentado e publicado nos Anais do IV Congresso Brasileiro de Carvão Mineral, realizado em agosto de 2013 em Gramado, RS). No Apêndice C é apresentado o trabalho intitulado “Influência da luminosidade e concentração salina na produção de lipídios e carotenoides pela microalga *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator *airlift*” (apresentado e publicado nos Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, realizado em outubro de 2014 em Florianópolis, SC).





## Capítulo 2

### Revisão Bibliográfica

Neste capítulo será apresentada uma base teórica, fundamentada em uma revisão bibliográfica, visando mostrar ao leitor quais os assuntos determinantes para uma boa compreensão do método de trabalho empregado no desenvolvimento do estudo sobre o cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* BE 003 (*D. tertiolecta* BE 003) em fotobiorreator *airlift* tipo placa e a obtenção de compostos dela extraídos.

Inicialmente, será exposto um conteúdo global sobre microalgas objetivando familiarizar o leitor sobre suas características e vantagens do seu cultivo. Posteriormente, será abordado o processo de biofixação de dióxido de carbono, normalmente única fonte de carbono utilizada no cultivo de microalgas e demais nutrientes necessários para o seu crescimento. Uma vez percorrida essa revisão mais geral, será apresentada a microalga *D. tertiolecta*, suas principais características, fatores que influenciam seu cultivo e os compostos dela extraídos que são de interesse neste trabalho, carotenoides e ácidos graxos, destacando suas aplicações no mercado.

Posteriormente, serão discutidas as principais diferenças relacionadas ao cultivo de microalgas em sistemas abertos e fotobiorreatores, visando a fundamentação da escolha do fotobiorreator *airlift* tipo placa para o cultivo da microalga *D. tertiolecta*.

Para finalizar, serão relatados modelos matemáticos para o crescimento de microalgas obtido por alguns autores, já que a representação do processo biotecnológico em questão através de equações matemáticas também é objetivo deste trabalho.

## 2.1 Microalgas

O termo microalgas engloba microrganismos algais com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos. Apesar das diferenças estruturais e morfológicas entre os representantes de cada divisão, esses são fisiologicamente similares e são capazes de realizar fotossíntese oxigênica (Raven *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2005).

A caracterização das microalgas implica a consideração de uma série de critérios. Por exemplo, elas têm sido tradicionalmente classificadas quanto aos tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular. Também têm sido considerados aspectos citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do(s) cloroplasto(s) e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear. Além desses, técnicas de biologia molecular também têm sido utilizadas (Grobbelaar, 2000; Spolaore *et al.*, 2006).

Esses microrganismos podem crescer rapidamente e vivem em condições adversas porque possuem estruturas unicelulares ou multicelulares simples, incluindo as microalgas procarióticas, por exemplo, Cyanobacteria (Cyanophyceae), microalgas eucarióticas, por exemplo, algas verdes (Chlorophyta) e diatomáceas (Bacillariophyta) (Wang *et al.*, 2008).

Por este motivo, as microalgas estão presentes em todos os ecossistemas existentes na Terra, e não apenas aquáticos, mas também terrestres, representando uma grande variedade de espécies vivendo em uma ampla gama de condições ambientais. São principalmente encontradas no meio marinho, em água doce e no solo, sendo consideradas responsáveis por pelo menos 60 % da produção primária da Terra. Estima-se a existência de mais de 50 mil espécies, mas apenas um número limitado, cerca de 30 mil, foram estudadas e analisadas (Chisti, 2008; Mata *et al.*, 2010).

No ambiente natural, assim como nos cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (Raven *et al.*, 1999). Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como com a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento da alga. Quanto aos fatores físico-químicos, são principalmente reportados estudos sobre iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (Jiménez e Niell, 1991; Elenkov *et al.*, 1996; Del Campo *et al.*, 2000; Takagi *et al.*, 2006; Mogedas *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011).

A produção de microalgas pode ser justificada por apresentar diversas vantagens, dentre as quais podem ser destacadas: o cultivo de microalgas é um sistema biológico eficiente na utilização da energia solar para a produção de matéria orgânica, sendo que, muitas espécies crescem mais rapidamente do que as plantas terrestres, fato que possibilita maiores rendimentos anuais de biomassa (maior produtividade); sua natureza unicelular assegura uma biomassa com mesma composição bioquímica, o que não ocorre com as plantas terrestres que apresentam compostos localizados em partes específicas: nos frutos, folhas,

sementes ou raízes; por manipulação das condições ambientais de cultivo (luz, temperatura e nutrientes, por exemplo) muitas espécies podem ser induzidas a sintetizar e acumular altas concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios etc. Tais compostos apresentam um elevado valor comercial, principalmente por serem produtos naturais; podem crescer bem em regiões com extremas condições climáticas. Os cultivos podem ser desenvolvidos com água marinha ou de estuários, a qual não pode ser convencionalmente empregada no cultivo de plantas com valor para a agricultura, ou com água proveniente de diversos outros processos de produção (agropecuária, indústrias, dejetos domésticos etc.); o ciclo de vida da maioria das microalgas se completa em poucas horas, o que favorece a seleção de cepas e o melhoramento genético das espécies (Lee, 1997; Walker *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008).

Além das citadas acima, o cultivo de microalgas oferece outras vantagens, entre elas: a remoção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) de gases de combustão industrial por biofixação de algas, reduzindo as emissões de gases de efeito estufa de uma empresa ou de um processo; após a extração do óleo, por exemplo, o restante da biomassa de algas pode ser processado para obtenção de etanol, metano, ração animal, adubo orgânico devido à sua alta razão N/P, ou simplesmente queimada para cogeração de energia (eletricidade e calor) (Chelf *et al.*, 1993; Kishimoto *et al.*, 1994; Mata *et al.*, 2010).

A cultura comercial de microalgas tem mais de 40 anos de história. A aplicação biotecnológica mais comum tem sido na aquicultura, para a alimentação direta ou indireta de algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos organismos forrageiros de interesse econômico. Porém, nos últimos anos, o potencial biotecnológico das microalgas tem interessado muitos pesquisadores, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos. A imensa biodiversidade e consequente variabilidade na composição bioquímica da biomassa obtida das culturas de microalgas, aliadas ao emprego de melhoramento genético e ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala, vêm permitindo que determinadas espécies sejam comercialmente utilizadas. Nesse sentido, cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial. Dentre os inúmeros compostos extraídos, ou com potencial de exploração comercial, podem ser relacionados ácidos graxos poli-insaturados (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenoico - EPA e ácido docosahexaenoico - DHA, por exemplo), carotenoides (astaxantina, β-caroteno, luteína etc.), ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e diversos compostos bioativos naturais (antioxidantes, redutores do colesterol etc.), os quais podem ser empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais, por suas propriedades nutricionais e farmacêuticas (Abalde *et al.*, 1991; Spolaore *et al.*, 2006).

O mercado de alimentos funcionais, utilizando microalgas em massas, pães, iogurtes e bebidas, apresenta rápido desenvolvimento em países como França, Estados Unidos, China e Tailândia. As principais microalgas cultivadas comercialmente são espécies dos gêneros *Chlorella* Beyerinck, (Chlorophyceae) e *Arthrospira* Stizenberger (Cyanophyceae) para a adição em alimentos naturais ("health food"), *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyceae) para a obtenção de β-caroteno e *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) para a obtenção de astaxantina (Orosa *et al.*, 2000; Baker e Günther, 2004; Fraser e Bramley, 2004;

Walker *et al.*, 2005; Spolaore *et al.*, 2006). Na Tabela 2.1 são apresentados alguns produtos obtidos de microalgas.

**Tabela 2.1:** Alguns produtos obtidos de microalgas (adaptada de Lee, 1997; Walker *et al.*, 2005; Spolaore *et al.*, 2006).

	Produto	Aplicações
Biomassa	Biomassa	Alimentos naturais Alimentos funcionais Aditivos alimentares Aquicultura Condicionador do solo
Corantes e antioxidantes	Xantofilas Luteína $\beta$ -caroteno Vitamina C e E	Aditivos alimentares e cosméticos
Ácidos graxos	Ácido araquidônico - ARA Ácido eicosapentaenoico - EPA Ácido docosahexaenoico - DHA Ácido gama-linolênico - GGA Ácido linoleico - LA	Ingredientes funcionais
Enzimas	Superóxido dismutase - SOD Fosfoglicerato quinase - PGK Luciferase e Luciferína Enzimas de restrição	Alimentos naturais e medicina
Polímeros	Polissacarídeos Ácido poli-beta-hidroxitirico Peptídeos Toxinas Isótopos Aminoácidos (prolina, arginina, ácido aspártico) Esteróis	Aditivos alimentares e medicina

## 2.2 Fixação de dióxido de carbono

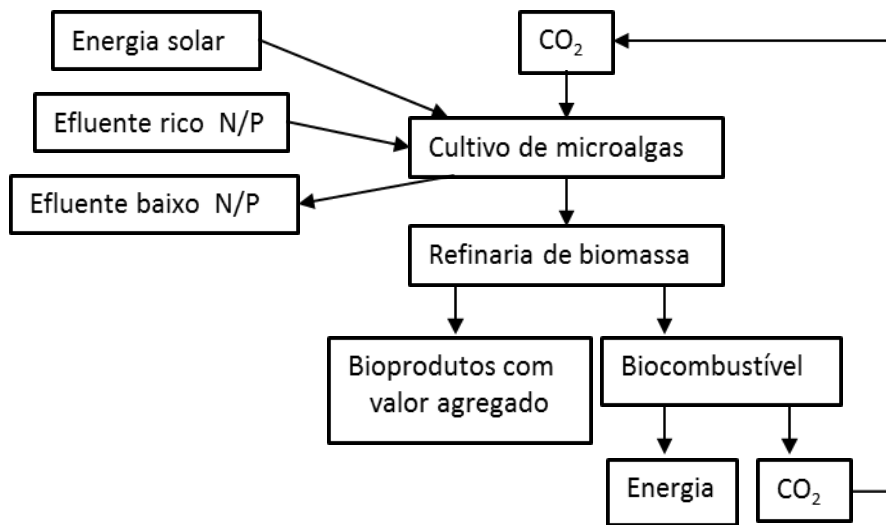
Devido a crescente preocupação sobre o aquecimento global que pode ser atribuído principalmente ao elevado nível de CO<sub>2</sub> na atmosfera, as Nações Unidas promoveram o Protocolo de Quioto (1997) com o objetivo de reduzir em 5,2 % a emissão dos gases de efeito estufa com base nas emissões do ano de 1990, e mais de 170 países ratificaram o protocolo (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Várias estratégias para a mitigação de CO<sub>2</sub> têm sido investigadas, as quais podem geralmente ser classificadas em duas categorias: (1) métodos baseados em reações químicas e (2) mitigação biológica de CO<sub>2</sub>. Entre os métodos baseados em reações químicas estão reações de carbonatação e calcinação e lavagem com soluções aquosas de aminas (Gupta e Fan, 2002). Estes métodos para capturar CO<sub>2</sub> têm consumo de energia e custos relativamente altos. Já a mitigação biológica de CO<sub>2</sub> é realizada por plantas e microrganismos fotossintéticos. Na agricultura as plantas contribuem com a captura de 3-6 % de CO<sub>2</sub> das emissões de combustíveis fósseis, em grande parte devido ao crescimento lento das plantas terrestres convencionais. Por outro lado, as microalgas têm capacidade de fixar CO<sub>2</sub> durante a captura de energia solar com uma eficiência de 10 a 50 vezes maior que as plantas terrestres (Murakami e Ikenouchi, 1997; Usui e Ikenouchi, 1997; Li *et al.*, 2008).

As microalgas são microrganismos únicos e potencialmente valiosos porque são “fábricas celulares” que convertem CO<sub>2</sub> em biomassa e numa variedade de compostos bioativos. Em comparação com plantas maiores, as microalgas têm estrutura simples, sendo unicelulares, filamentosas ou coloniais. Portanto, a energia obtida através da fotossíntese é utilizada para crescimento e reprodução, pois não precisam manter tecidos e órgãos complexos (Walker *et al.*, 2005). Logo, as microalgas possuem maior eficiência fotossintética do que as plantas terrestres, maiores produtividades de biomassa, taxas de crescimento mais altas do que as plantas maiores, taxas mais elevadas de fixação de CO<sub>2</sub> e produção de O<sub>2</sub> (Chiu *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, as microalgas são cultivadas em sistemas fechados (fotobiorreatores) ou lagoas abertas que são aeradas ou expostas ao ar para permitir a captura de CO<sub>2</sub> do ambiente. A atmosfera contém apenas 0,03 - 0,06 % de CO<sub>2</sub>, e esta baixa concentração pode tornar o crescimento celular lento (Chelf *et al.*, 1993). Por outro lado, os gases de exaustão industriais, tais como gases de combustão contêm até 15 % de CO<sub>2</sub>, fornecendo uma fonte rica em CO<sub>2</sub> para o cultivo de microalgas e potencialmente uma rota mais eficiente para a biofixação de CO<sub>2</sub>. A terceira via é fixar CO<sub>2</sub> por reação química para produzir carbonatos (por exemplo, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e utilizá-los como fonte de carbono para o cultivo de microalgas (Wang *et al.*, 2008).

A utilização de microalgas para mitigação de CO<sub>2</sub> oferece inúmeras vantagens, entre elas, a possível reciclagem completa de CO<sub>2</sub> (Figura 2.1), porque o dióxido de carbono é convertido em energia química através da fotossíntese, que pode ser convertido em combustíveis usando tecnologias existentes (Wang *et al.*, 2008).



**Figura 2.1:** Fluxograma conceitual de processos combinados utilizando microalgas para produção de biocombustíveis, biomitigação de CO<sub>2</sub> e remoção de N/P de efluentes. Entradas: fonte de carbono, CO<sub>2</sub>; fontes de nitrogênio e fósforo, efluentes ricos em N/P; fonte de energia, energia solar. Saídas: efluentes com baixo N/P, bioproductos com valor agregado e biocombustíveis (Wang *et al.*, 2008).

A Tabela 2.2 mostra algumas cepas de microalgas que foram estudadas para a biomitigação de CO<sub>2</sub> (Wang *et al.*, 2008). Algumas dessas cepas podem tolerar altas temperaturas e concentrações de CO<sub>2</sub> na corrente de gás. As moléculas de CO<sub>2</sub> fixadas através da fotossíntese são convertidas em diferentes componentes celulares orgânicos, incluindo carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Spolaore *et al.*, 2006). A lei de conservação de massa nos permite calcular a taxa de fixação de CO<sub>2</sub> em função de produtividade de biomassa dado o teor de carbono das células. Na Tabela 2.2 tais cálculos foram realizados utilizando uma fórmula molecular para a biomassa, CO<sub>0,48</sub>H<sub>1,83</sub>N<sub>0,11</sub>P<sub>0,01</sub> (Chisti, 2008), quando dados diretos sobre a taxa de fixação de CO<sub>2</sub> não estavam disponíveis, com base no pressuposto de que moléculas de CO<sub>2</sub> fixadas na forma de produtos extracelulares eram negligenciáveis.

**Tabela 2.2:** Algumas microalgas estudadas para a biomitigação de CO<sub>2</sub> (adaptada de Wang *et al.*, 2008).

Microalga	% CO <sub>2</sub> (cultivo)	<i>T</i> °C	<i>P</i> g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	<i>P</i> <sub>CO<sub>2</sub></sub> g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	Referência
<i>Chlorococcum littorale</i>	40	30	N/A	1	(Murakami e Ikenouchi, 1997; Iwasaki <i>et al.</i> , 1998)
<i>Chlorella kessleri</i>	18	30	0,087	0,163 <sup>a</sup>	(De Morais e Costa, 2007)
<i>Chlorella</i> sp. UK001	15	35	N/A	>1	(Murakami e Ikenouchi, 1997)
<i>Chlorella vulgaris</i>	15		N/A	0,624	(Yun <i>et al.</i> , 1997)
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,03	25	0,040	0,075 <sup>a</sup>	(Scragg <i>et al.</i> , 2002)
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,03	25	0,024	0,045 <sup>a</sup>	(Scragg <i>et al.</i> , 2002)
<i>Dunaliella</i>	3	27	0,17	0,313 <sup>a</sup>	(Kishimoto <i>et al.</i> , 1994)
<i>Botryococcus braunii</i>	-	30	1,1	>1,0	(Murakami e Ikenouchi, 1997)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	18	30	0,14	0,26	(De Morais e Costa, 2007)
<sup>b</sup> <i>Spirulina</i> sp.	12	30	0,22	0,413 <sup>a</sup>	(De Morais e Costa, 2007)

<sup>a</sup>Taxa de fixação de CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2}$ ) = 1,88 x produtividade de biomassa ( $P$ ), derivada da fórmula molecular para a biomassa relatada por Chisti (2008).

<sup>b</sup>Todas espécies, com exceção da *Spirulina* sp. (Cyanophyceae), são algas verdes eucarióticas (Chlorophyta).

## 2.3 Nutrição das microalgas

O meio de cultivo deve fornecer os nutrientes necessários para o crescimento das microalgas. Os elementos mais importantes que constituem as células das algas são carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. Outros elementos essenciais incluem ferro, magnésio, elementos traços e, em alguns casos, silício (Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001).

Como foi dito nos capítulos anteriores, normalmente, a única fonte de carbono utilizada no cultivo de microalgas é o CO<sub>2</sub> proveniente da atmosfera ou de gases de combustão. Já as fontes mais comuns de nitrogênio são nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e ureia ou combinações desses. Vale a pena mencionar que o amônio é a forma química do nitrogênio mais facilmente assimilada pelo fitoplâncton. Ao contrário do nitrato, não requer redução, sendo assimilado como aminoácidos. Entretanto, o amônio em alta concentração tem efeitos tóxicos sobre o crescimento das microalgas. Além disso, o amônio pode ir para a atmosfera, causando problemas ambientais e econômicos. Portanto, a seleção de fontes de nitrogênio para o cultivo de microalgas deve ser baseada em dados experimentais (Abalde *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2008).

Segundo Wang *et al.* (2008), águas residuais ou águas residuais secundárias são fontes baratas de nitrogênio e contêm grandes quantidades de diferentes formas de nitrogênio. No entanto, o uso de águas residuais para o cultivo de microalgas pode causar problemas de contaminação e, portanto, deve ser utilizada com precaução.

Os principais componentes da biomassa obtida a partir de microalgas são lipídios, proteínas e carboidratos. Os lipídios são os componentes mais desejáveis do ponto de vista energético. As células com maior teor de lipídios e teores menores de carboidratos e proteínas têm elevado poder calorífico e têm maiores rendimentos de óleo quando processados através, por exemplo, de liquefação de biomassa (Tornabene *et al.*, 1983; Yamaberi *et al.*, 1998; Illman *et al.*, 2000; Scragg *et al.*, 2002).

No entanto, células com elevadas concentrações de lipídios são geralmente obtidas sob condições de *stress*, associadas com divisão celular reduzida. É óbvio que é importante encontrar um equilíbrio entre a produção de elevado teor calórico das células e a manutenção da alta produtividade de biomassa através da otimização da concentração de nitrogênio no meio para o crescimento das microalgas (Wang *et al.*, 2008).

O fósforo é outro elemento importante para o crescimento celular e metabolismo das microalgas. O fósforo está associado à realização de todos os processos que envolvem trocas energéticas nas células. ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas são os principais componentes estruturais que apresentam fósforo em algas. De forma simplificada, pode-se assumir que há duas funções fundamentais do fósforo nas células: transferir energia e constituir moléculas estruturais. A assimilação de fósforo é dependente de luz, possivelmente em razão da acumulação de energia em ATP (Lourenço, 2006).

Assim como o nitrogênio, o fósforo é considerado um dos principais elementos limitantes do fitoplâncton, em razão de sua alta demanda e grande variabilidade de concentração no ambiente natural. O fósforo é preferencialmente assimilado como fosfatos inorgânicos na forma de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Gauthier e Turpin, 1997; Martínez *et al.*, 1999). Portanto, em cultivos, o fósforo tende a ser adicionado aos meios de cultura em altas concentrações, como fosfatos inorgânicos. Em alguns casos, pode existir a necessidade de fornecimento de fósforo em excesso, pois os fosfatos podem formar complexos ou precipitados com alguns íons metálicos, não estando disponível como nutriente para as microalgas (Yun *et al.*, 1997). Em alguns meios, o fosfato é adicionado como glicerofosfato de sódio, que é menos suscetível à precipitação em presença de metais-traço (Lourenço, 2006).

O enxofre, magnésio, ferro e outros elementos também são indispensáveis para o crescimento das microalgas. A maior parte do enxofre presente nas células ocorre como componente estrutural de proteínas, por meio dos dois ácidos aminados sulfurados: cisteína e metionina. O enxofre ocorre na água do mar principalmente como íons sulfato, sendo este muito abundante. Por isso, o enxofre nunca é fator limitante ao desenvolvimento de microalgas marinhas. Já o magnésio é essencial a algas por ser constituinte da molécula de clorofila, ocorrendo no núcleo da mesma. O magnésio também está associado a várias



enzimas, sendo um ativador de suas atividades. No caso de deficiência, gera o processo designado *clorose*, no qual as células perdem seu conteúdo pigmentar. O ferro é extremamente importante para as algas por participar de inúmeras funções, como: vias biossintéticas da clorofila e dos citocromos; respiração, transporte respiratório de elétrons; fotossíntese, transporte fotossintético de elétrons; redução de nitrato e de nitrito; redução de sulfato; fixação de nitrogênio molecular e; além desses exemplos, é cofator de diversas enzimas (Lourenço, 2006; Roden e Zachara, 1996). Micronutrientes como alguns metais traço também desempenham papéis-chave no transporte de elétrons (Raven *et al.*, 1999).

## 2.4 Microalgas *Dunaliella*

A *Dunaliella* é um gênero de alga verde (Chlorophyta, Chlorophyceae) unicelular com tamanho de célula de 9 - 11  $\mu\text{m}$ , bi-flagelada que pode ser encontrada em água doce (por exemplo, *D. flagellate*, *D. chordate*, *D. lateralis*, *D. paupera*), em águas mista e salina (por exemplo, *D. tertiolecta*, *D. bioculata*, *D. primolecta*) e em águas hipersalinas (por exemplo, *D. salina*, *D. minuta*, *D. parva*, *D. viridis*) (Francavilla *et al.*, 2010). A imagem das microalgas *D. tertiolecta* Butcher 1959 da SCCAP (Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa da Universidade de Copenhague) é apresentada na Figura 2.2.



**Figura 2.2:** *Dunaliella tertiolecta* (<http://www.sccap.dk/pix/K-0591.jpg>. Acesso em 12/03/2013).

Muitas algas como *Botryococcus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* e *Spirulina* são atualmente cultivadas para a produção de proteínas, astaxantina,  $\beta$ -caroteno, glicerol, combustíveis líquidos, formulações farmacêuticas, bem como produtos de química fina. Entre estas, as do gênero *Dunaliella*, especialmente *Dunaliella salina* e *D. tertiolecta*, são as microalgas mais estudadas para a obtenção de biomassa (Francavilla *et al.*, 2010).

A *D. salina* pode produzir até 14 % de  $\beta$ -caroteno em relação ao seu peso seco em condições de elevada salinidade, luz, temperatura e poucos nutrientes. O  $\beta$ -caroteno obtido a partir da *Dunaliella* tem uma demanda crescente e uma ampla variedade de aplicações no mercado: corante nas indústrias de alimentos, componente em produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentos naturais, alimentos dietéticos; diagnósticos e pesquisas biomédicas (Francavilla *et al.*, 2010).

A *D. tertiolecta* pode utilizar nutrientes inorgânicos presentes na água salgada, águas residuais ou água salobra juntamente com a luz solar para produzir biomassa utilizando  $\text{CO}_2$  como única fonte de carbono. Além disso, esta espécie móvel tem elevada tolerância ao sal, temperatura e luz. O cultivo desse microrganismo é relativamente simples, pois não se fixam em superfícies e tem taxa de crescimento e conteúdo lipídico relativamente elevados (Tang *et al.*, 2010).

Minowa *et al.* (1995) cultivaram *D. tertiolecta* em tanque aberto com fonte de luz contínua de 20.000 lx, temperatura de 27 °C e borbulhamento de ar com 3 % de  $\text{CO}_2$ . Nesse estudo, foi utilizada a concentração de NaCl semelhante a concentração da água do mar.

Outro estudo realizado por Tang *et al.* (2010) avaliou as influências da fonte de luz, intensidade da luz, concentração de  $\text{CO}_2$  e fotoperíodo no crescimento da *D. tertiolecta*. O efeito desses parâmetros ambientais no conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos da *D. tertiolecta* também foram investigados. As lâmpadas fluorescentes e LEDs (*lightemitting diodes*) vermelhos e brancos foram eficazes para o crescimento das algas e maiores intensidades de luz resultaram em crescimento celular significativamente maior. A iluminação contínua também aumentou significativamente a quantidade de biomassa. No sétimo dia de cultivo foram obtidas as maiores quantidades de biomassa (em torno de 0,23 g/L de biomassa seca) com concentrações de 2, 4 e 6 % de  $\text{CO}_2$ . As diferentes fontes e intensidades de luz não influenciaram significativamente na composição dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) da *D. tertiolecta*. Os principais componentes dos FAME produzidos a partir do óleo da *D. tertiolecta* foram metil linolenato e metil palmitato.

A *Dunaliella* não tem uma parede celular rígida e prolifera em salinidades extremamente variadas 0,5-5,0 M NaCl. No caso específico da *D. tertiolecta*, a faixa de tolerância ao sal é de 0,17-1,5 M de NaCl. No entanto, outros pesquisadores têm trabalhado com *D. tertiolecta* Butcher além destes limites, citando intervalos de tolerância de 0,05-3,0 M de NaCl. Esse notável grau de adaptação ambiental deve-se a produção de  $\beta$ -caroteno e glicerol em excesso para manter o equilíbrio osmótico. Essas produções excessivas têm sido bem exploradas em condições de grande escala para uma ampla gama de aplicações (Ollivier *et al.*, 1994; Jahnke e White, 2003).

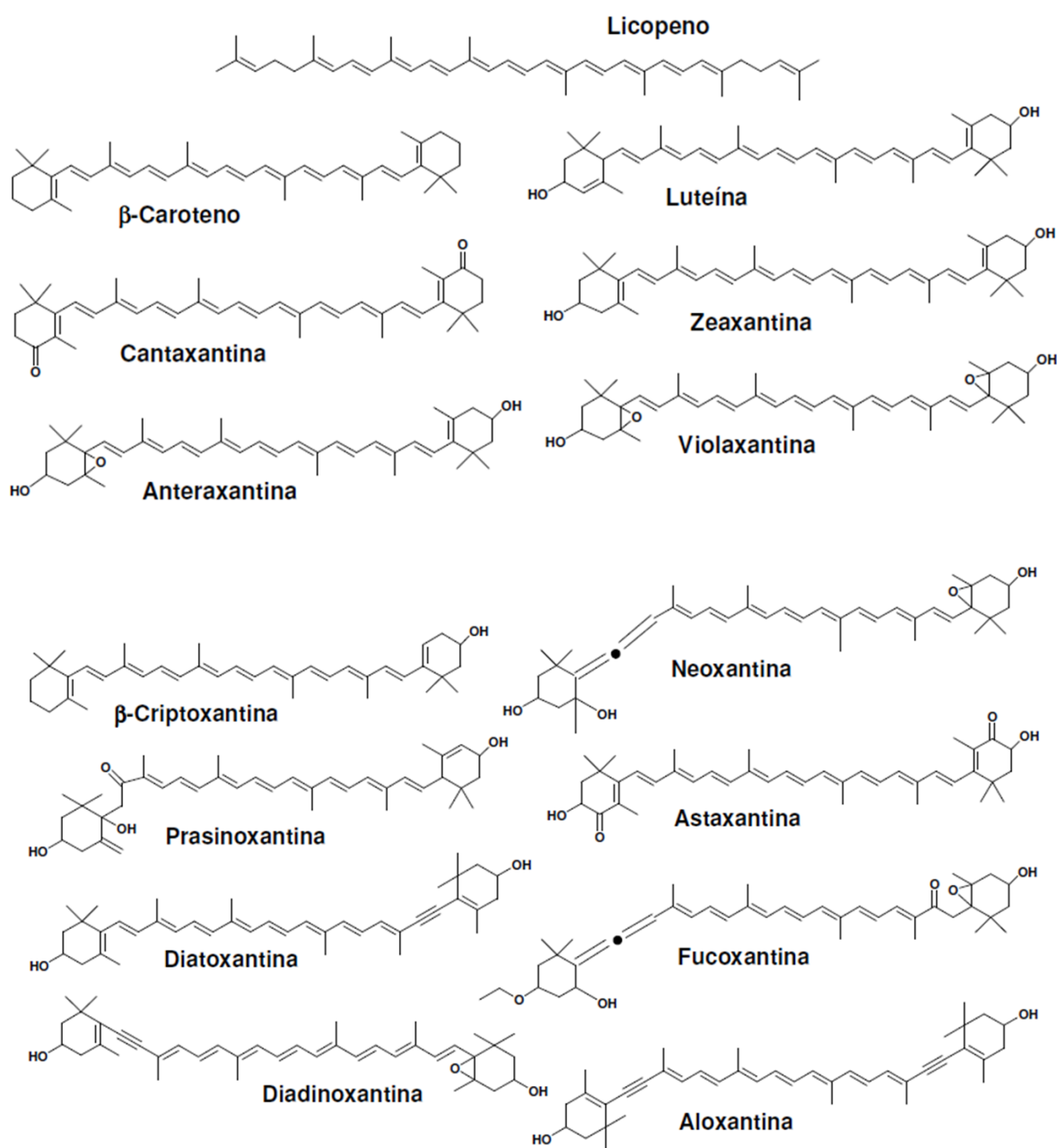
A *Dunaliella* é explorada para a produção de biomassa seca ou extrato celular, que é utilizado como alimento medicinal. Com o avanço neste campo nos últimos anos, a produção de compostos bio-orgânicos como  $\beta$ -caroteno está estabelecida em muitos países. A produção em larga escala de  $\beta$ -caroteno é controlada por inúmeros fatores de *stress* como alta intensidade de luz, salinidade alta, temperatura de crescimento baixa e disponibilidade de

nutrientes. Um *stress* por alta intensidade de luz é criado quando a intensidade da luz incidente é maior do que a necessária para saturar a fotossíntese. Infelizmente, existe uma relação inversa entre o conteúdo de  $\beta$ -caroteno e a velocidade de crescimento específico. Nas indústrias, as condições de cultivo em sistemas fechados são otimizadas visando maior produção de  $\beta$ -caroteno (Fazeli *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008; Mogedas *et al.*, 2009).

## 2.5 Carotenoides

A estrutura básica dos carotenoides é um tetraterpeno com 40 átomos de carbono, formado por oito unidades isoprenoides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear com simetria invertida no centro. A principal característica dos carotenoides é um sistema de ligações duplas conjugadas, que corresponde ao cromóforo, e que permite a estes compostos absorver luz na região do visível (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1998). Algumas dessas estruturas estão exemplificadas na Figura 2.3.

Os carotenoides são inicialmente divididos em dois grandes grupos, os carotenos que quimicamente são hidrocarbonetos, ou seja, compostos apenas por carbono e hidrogênio (por exemplo, licopeno e  $\beta$ -caroteno, vide Figura 2.3) e as xantofilas que são derivados oxigenados (por exemplo, cantaxantina e zeaxantina, vide Figura 2.3). Neste último grupo estão incluídos pigmentos que possuem em sua estrutura grupos hidroxílicos, carbonílicos, carboxílicos e/ou epóxidos, podendo ser também acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos. Muitas outras modificações estruturais ainda são possíveis permitindo obtenção de uma diversidade de compostos (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1998).



**Figura 2.3:** Estrutura de alguns carotenoides (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1998).

Portanto, o sistema de ligações duplas conjugadas confere cor aos carotenoides, mas também os tornam muito suscetíveis à isomerização e oxidação. Considerando a alta sensibilidade destes pigmentos a luz, calor, oxigênio, ácidos e, em alguns casos, a álcalis; estas condições devem ser evitadas durante as análises (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1998).

Além de atuarem como corantes, importantes ações biológicas têm sido atribuídas aos carotenoides tais como proteção contra certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares,

cataratas e degeneração macular, bem como a melhora do sistema imunológico (Baker e Günther, 2004).

Particularmente, o  $\beta$ -caroteno é um nutriente essencial e tem alta demanda no mercado como corante natural de alimentos e também aditivo para cosméticos. Ele ocorre naturalmente como seus isômeros (Wang *et al.*, 1994) e funciona como um pigmento protetor do aparelho fotossintético contra os danos causados pela luz em todas as plantas verdes, incluindo algas (Ben-Amotz e Fishier, 1998).

A capacidade potencial do  $\beta$ -caroteno como agente antioxidante e imunomodulador levou a pesquisas sobre sua aplicação na prevenção de cânceres humanos. Muitos outros estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de provar que a suplementação diária de outros carotenoides como luteína e zeaxantina podem prevenir doenças crônicas e degenerativas, carcinogênese, processos inflamatórios severos, e outras reações induzidas por radiações ultravioleta (Fraser e Bramley, 2004).

A luteína, carotenoide di-hidroxilado pertencente à classe das xantofilas de coloração amarela, atua como antioxidante protegendo as células dos danos oxidativos e, conseqüentemente, reduz o risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas degenerativas. É um carotenoide capaz de dissipar a energia dos radicais livres e sequestrar o oxigênio singlete. Radicais livres agem continuamente no organismo, podendo desencadear danos celulares e serem os responsáveis pelo desenvolvimento de câncer e certas doenças crônicas. Estudos mostram que a luteína protege moléculas de lipídios, membranas proteicas, lipoproteínas de baixa densidade, proteínas e DNA contra o ataque dos radicais, tendo um papel essencial na proteção de doenças, notadamente na redução do risco da degeneração macular relacionada à idade. Como prevenção, preconiza-se o consumo de dietas com alimentos ricos em luteína (Baker e Günther, 2004).

É importante salientar que o número de duplas ligações conjugadas na molécula afeta a capacidade antioxidante do carotenoide. A ação sequestrante de radicais é proporcional ao número de ligações duplas conjugadas presentes nas moléculas dos carotenoides. Além disso, os carotenoides devem possuir no mínimo nove ligações duplas conjugadas para apresentar função como antioxidante (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1998).

Analisando-se a luteína e a zeaxantina observa-se que apresentam estrutura química muito similar, ambas possuem o mesmo número de ligações duplas na cadeia, porém há uma diferença na posição de uma dessas duplas ligações no anel (Figura 2.3). Essa diferença faz da zeaxantina um melhor antioxidante por apresentar uma dupla ligação conjugada a mais do que a luteína (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1998).

Os carotenoides são amplamente distribuídos na natureza, encontrados em todos os tecidos fotossintetizantes, fungos, bactérias, leveduras, algas, animais e também em partes não fotossintéticas de plantas, como frutas, flores, sementes e raízes. Por este motivo, esses pigmentos naturais são responsáveis pelas diferentes cores de frutas, legumes e outras plantas. Até o momento, mais de 600 tipos de carotenoides foram encontrados na natureza e cerca de

50 são precursores da síntese da vitamina A, que inclui  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina (Ben-Amotz e Fishier, 1998).

As microalgas e cianobactérias também são fontes para obtenção de carotenoides. Semelhante ao que ocorre em outros organismos, cada classe de microalgas apresenta sua própria combinação de pigmentos e, conseqüentemente, coloração distinta. Os três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa de microalgas são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas (ficobiliproteínas) (Orosa *et al.*, 2000). A síntese destes compostos pelas microalgas pode ser aumentada através da manipulação das condições de cultivo, usualmente por algum *stress* ambiental (Borowitzka, 1999).

Os carotenoides primários são sintetizados por microalgas sob condições normais, favoráveis ao crescimento celular. Em condições de *stress*, as microalgas sintetizam carotenoides secundários como um mecanismo de defesa. A formação de carotenoides secundários pode ser provocada pela limitação de nitrogênio, luz de alta intensidade, pH, salinidade e presença de outros compostos orgânicos (Abalde *et al.*, 1991; Orosa *et al.*, 2000; Fazeli *et al.*, 2006).

Portanto, os carotenoides funcionam como fotoprotetores e como pigmentos fotossintéticos secundários, sendo que cada espécie pode conter entre 5 e 10 tipos de um universo de aproximadamente 60 diferentes carotenoides presentes nas células das microalgas. Diversas espécies podem acumular grande concentração de  $\beta$ -caroteno ou astaxantina, por exemplo (Baker e Günther, 2004).

O  $\beta$ -caroteno é um pigmento tipicamente encontrado nas microalgas. Geralmente é encontrado numa fração inferior a 1 % da massa seca, mas pode ser acumulado até aproximadamente 10 % em espécies halotolerantes (crescem em elevada concentração de sal), como naquelas do gênero *Dunaliella*. A espécie *D. salina* é reconhecidamente uma importante fonte de  $\beta$ -caroteno (Jahnke e White, 2003; Takagi *et al.*, 2006).

Carotenoides produzidos naturalmente por microalgas compreendem apenas uma fração do mercado mundial. Embora haja usos crescentes de carotenoides em alimentos, produtos farmacêuticos e rações, há predomínio de formas sintéticas. A síntese de carotenoides envolve custos menores e elimina a necessidade de realização de cultivos para a obtenção de biomassa e separação da substância de interesse, reduzindo a carga de trabalho e o tempo de produção. Essas características acarretam menor preço de venda. Entretanto, importantes fatores sustentam a continuidade dos cultivos de microalgas para a produção de carotenoides. Há um crescimento mundial do segmento do mercado que prefere consumir produtos naturais, rejeitando formas sintéticas de diversas substâncias. Consumidores com esse perfil aceitam pagar mais caro para consumir produtos naturais, desde que tenham certeza da procedência do produto (Lourenço, 2006). Além disso, a rígida regulamentação para a aplicação de corantes sintéticos na indústria de alimentos estimula pesquisas visando o desenvolvimento produtivo e o uso de carotenoides de microalgas como aditivo alimentar (Baker e Günther, 2004).

## 2.6 Ácidos graxos poli-insaturados

Uma grande importância tem sido dada à provisão das fontes de ácidos graxos poli-insaturados. Isto é devido às mudanças na dieta humana, nos últimos séculos, e ao acentuado aparecimento de uma série de doenças relacionadas ao baixo consumo destes compostos, bem como a sua reconhecida significância terapêutica, especialmente àqueles da família Ômega-3 (Simopoulos, 2002).

Os ácidos graxos podem ser obtidos de fontes animais ou vegetais, tanto terrestres quanto aquáticas, e diversos microrganismos têm sido considerados como uma alternativa às fontes usuais desta classe de lipídios. Além disso, os ácidos graxos poli-insaturados de microalgas têm um mercado muito promissor na biotecnologia, em especial na indústria de alimentos funcionais (Gill e Valivety, 1997; Certik e Shimizu, 1999).

O conteúdo de lipídios da biomassa de microalgas pode variar entre 1 a 40 % do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85 %. Os lipídios das algas são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poli-insaturados. Os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os PUFA (“*polyunsaturated fatty acids*”) representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (Brown, 1991; Gill e Valivety, 1997; Medina *et al.*, 1998).

Os lipídios de algumas espécies (quase sempre marinhas) contêm quantidades relativamente altas de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, notadamente de EPA (20:5 n-3) e DHA (22:6 n-3) (Volkman *et al.*, 1989; Zhukova e Aizdaicher, 1995; Medina *et al.*, 1998).

A importância terapêutica dos PUFA tem sido demonstrada por diversos estudos clínicos e epidemiológicos (Jiang *et al.*, 1999). Ao EPA e ao DHA são atribuídas propriedades benéficas à saúde. Os PUFA têm função na prevenção e tratamento de uma série de doenças cardiovasculares, da aterosclerose e da arritmia, da redução da pressão arterial, da redução dos níveis de colesterol e triglicerídios no plasma, da artrite reumatóide, do câncer e são aparentemente essenciais na nutrição infantil e no desenvolvimento cerebral (Fabregas *et al.*, 1989; Radwan, 1991; Gill e Valivety, 1997; Simopoulos, 2002).

Dentre as espécies conhecidas de microalgas que apresentam quantidades significativas de PUFA das famílias Ômega-3 e Ômega-6, encontram-se representantes de Haptophyceae (*Isochrysis* spp. e *Pavlova lutheri* (Droop) Green), Bacillariophyceae (*Phaeodactylum tricorutum*, *Thalassiosira* spp. e *Odontella aurita* (Lyngbye) Agardh), Dinophyceae (*Cryptocodinium cohnii* (Seligo) Javornick), Rhodophyceae (*Porphyridium cruentum* Nägeli) e, em menor quantidade, de Chlorophyceae (Yongmanitchai e Ward, 1991).

## 2.7 Ácidos graxos para a produção de biocombustíveis

A volatilidade recente dos preços do petróleo e o esperado aumento de preços no futuro, juntamente com o desejo de reduzir as emissões de poluentes e gases de efeito estufa, criaram um novo interesse na produção de biodiesel. Existe a expectativa que nos próximos anos o desenvolvimento de novos meios para a produção de biocombustíveis vai se tornar cada vez mais importante. A produção doméstica em grande escala de biocombustíveis parece ser viável, reduzindo a dependência do petróleo importado e dos combustíveis derivados de petróleo, aumentando a segurança energética. Além disso, os biocombustíveis, sendo derivados de matérias-primas que absorvem CO<sub>2</sub> atmosférico, têm potencial de reduzir significativamente as emissões de CO<sub>2</sub> (Mata *et al.*, 2010).

Os biocombustíveis podem ser derivados de uma variedade de fontes, mas as microalgas têm atraído interesse particular como uma das fontes mais promissoras de biomassa para produção de biocombustíveis. Como organismos aquáticos, as microalgas podem ser produzidas em locais não cultiváveis, minimizando o impacto da produção de biocombustíveis na agricultura. Além disso, estima-se que a produção de biomassa por hectare pode ser dez ou mais vezes maior para microalgas do que para culturas convencionais (Chisti, 2008).

Embora ainda não seja rentável competir com o diesel fóssil sem apoio adicional (por exemplo, os subsídios do governo), pesquisas acadêmicas e também na indústria estão sendo realizadas para transformar o biodiesel de microalgas economicamente viável. Por exemplo, várias empresas foram criadas ou entraram nesse nicho de mercado, vendendo processos inteiros ou unidades chave de processo, tais como fotobioreatores, para o cultivo de microalgas para a produção de biodiesel e outras aplicações (Mata *et al.*, 2010).

Para muitas microalgas, o excesso de energia solar captada pela fotossíntese é primariamente armazenado como lipídios, muitas vezes com altos níveis de triacilgliceróis (TAG). O biodiesel, por sua vez, é produzido pela transesterificação de TAG com metanol (ou outros álcoois), na presença de um catalisador apropriado, com glicerol como subproduto (Mata *et al.*, 2010).

Como foi dito anteriormente, a maioria das espécies de microalgas produzem grande quantidade de TAG apenas sob condições de *stress*, por exemplo, sob privação de nitrogênio. Uma vez que as condições de *stress* conduzem geralmente a baixas velocidades de crescimento, a produção econômica de biodiesel a partir de algas requer a otimização das duas fases de crescimento das microalgas: (1) produção rápida de grandes quantidades de microalgas e (2) aplicação de condições de *stress* a grandes culturas para induzir a síntese de TAG (Evans *et al.*, 1982; Volkman *et al.*, 1989; Elenkov *et al.*, 1996).

O biodiesel de algas não contém enxofre e atua tão bem quanto o diesel do petróleo, reduzindo as emissões de partículas, CO, hidrocarbonetos e SO<sub>x</sub>. No entanto, as emissões de NO<sub>x</sub> podem ser maiores em alguns tipos de motores. Além do biodiesel, as microalgas podem



fornecer matéria-prima para outros tipos de combustíveis renováveis tais como metano, hidrogênio, etanol, entre outros (Chiu *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011).

No caso específico do cultivo da microalga *D. tertiolecta*, o fosfato inorgânico ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e os elementos traços: cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ), ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ), molibdênio ( $\text{Mo}^{2+}$ ) e manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ) foram identificados como necessários para o crescimento ótimo dessa microalga, bem como para o maior acúmulo de lipídios. Este organismo foi capaz de usar tanto nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) quanto amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte de nitrogênio inorgânico. No entanto, apenas as concentrações moderadas de amônio foram toleradas e altos níveis inibiram o crescimento. A máxima produção de biomassa foi obtida com fornecimento de nitrato. A redução no fornecimento de nitrogênio causou rápido acúmulo de lipídios nas células (Chen *et al.*, 2011). Em outro trabalho desenvolvido com a *D. tertiolecta* (*D. tertiolecta*, UTEX# LB999) foi relatado um rendimento de óleo de 36-42 % (Mata *et al.*, 2010).

Muitas espécies de microalgas podem ser induzidas a acumular quantidades substanciais de lipídios contribuindo para um elevado rendimento de óleo. A Tabela 2.3 apresenta os teores de lipídios e produtividades de biomassa de diferentes espécies de microalgas, mostrando diferenças significativas entre várias espécies (Mata *et al.*, 2010).

Como mostra a Tabela 2.3, o teor de óleo em microalgas pode chegar a 75 % em peso de biomassa seca, mas associado com baixa produtividade (por exemplo, para *Botryococcus braunii*). Algas mais comuns (*Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*) têm níveis de óleo entre 20 e 50 %, mas maiores produtividades podem ser alcançadas (Mata *et al.*, 2010).

**Tabela 2.3:** Conteúdo lipídico e produtividade de diferentes espécies de microalgas (Mata *et al.*, 2010).

Espécies de microalgas	Conteúdo lipídico (% de biomassa seca)	Produtividade de lipídios (mg/L/dia)	Produtividade de biomassa (g/litro/dia)
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0 - 75,0	-	0,02
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8	0,07
<i>Chaetoceros muelleri</i>	14,6 - 16,4/39,8	17,6	0,04
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0 - 63,0	10,3-50,0	0,036 - 0,041
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0 - 22,0	44,7	0,23 - 1,47
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0 - 58,0	11,2 - 40,0	0,02 - 0,20
<i>Chlorella sp.</i>	10,0 - 48,0	42,1	0,02 - 2,5
<i>Chlorococcum sp.</i>	19,3	53,7	0,28
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20,0 - 51,1	-	10
<i>Dunaliella salina</i>	6,0 - 25,0	116,0	0,22 - 0,34
<i>Dunaliella primolecta</i>	23,1	-	0,09
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,0 - 71,0	-	0,12
<i>Dunaliella sp.</i>	17,5 - 67,0	33,5	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25	-	0,05 - 0,06
<i>Isochrysis sp.</i>	7,1 - 33,0	37,8	0,08 - 0,17
<i>Nannochloris sp.</i>	20,0 - 56,0	60,9 - 76,5	0,17 - 0,51
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7 - 29,7	84,0 - 142,0	0,37 - 0,48
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12,0 - 53,0	37,6 - 90,0	0,17 - 1,43
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0 - 57,0	44,8	0,003 - 1,9
<i>Porphyridium cruentum</i>	9,0 - 18,8/60,7	34,8	0,36 - 1,50
<i>Spirulina platensis</i>	4,0 - 16,6	-	0,06 - 4,3
<i>Spirulina maxima</i>	4,0 - 9,0	-	0,21 - 0,25
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20,6	17,4	0,08
<i>Tetraselmis suecica</i>	8,5 - 23,0	27,0 - 36,4	0,12 - 0,32

## 2.8 Condições de cultivo

No ambiente natural, assim como nos cultivos em fotobiorreatores, as condições ambientais podem influenciar na quantidade de biomassa e na síntese de produtos pelas microalgas. Na literatura são principalmente reportados estudos sobre iluminação, disponibilidade de nutrientes, temperatura e salinidade. A tolerância das microalgas à salinidade e ao *stress* osmótico tem sido enfatizada por alguns grupos de pesquisa (Fazeli *et al.*, 2006). A microalga *D. tertiolecta* pode crescer em concentrações salinas entre 0,17 e 1,5 M de NaCl (Ollivier *et al.*, 1994). Outros pesquisadores trabalharam com *D. tertiolecta*

além desses limites, citando um intervalo de tolerância em relação ao NaCl entre 0,05 e 3,0 M (Jahnke e White, 2003).

Os efeitos do *stress* salino no crescimento celular e na resposta de enzimas antioxidantes da microalga marinha *D. tertiolecta* foram estudados por Jahnke e White (2003). Para isso, elas foram cultivadas em sete diferentes concentrações de NaCl, variando entre 0,05 a 3,0 M. Os cultivos foram realizados em tubos *pyrex* (38 x 200 mm) com meio de cultura Tk e diferentes concentrações de NaCl. A temperatura, intensidade luminosa e as condições de aeração foram 26 °C, 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (10,7 klx) e 150 – 200  $\text{mL min}^{-1}$  de ar enriquecido com 2 %  $\text{CO}_2$ , respectivamente. O crescimento celular foi maior nos cultivos com concentrações de NaCl entre 0,2 e 0,5 M (semelhante ao ambiente marinho). As taxas de crescimento foram reduzidas em 30 e 55 % nas salinidades extremas 0,05 e 3,0 M NaCl, respectivamente, indicando culturas estressadas. Os teores de  $\alpha$ -tocoferol e glutathiona total duplicaram nas células obtidas a partir de cultivos com baixas concentração de NaCl quando comparados aos cultivos realizados nas condições ideais de crescimento das células (0,5 M NaCl) e com altas concentração de NaCl.

Fazeli *et al.* (2006) também estudaram os efeitos das concentrações salinas entre 0,05 e 3,0 M de NaCl na cinética de crescimento, carotenoides totais e  $\beta$ -caroteno (*all-trans* e *9-cis*) acumulados pela *D. tertiolecta*. As células foram cultivadas em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo 200 mL de cultura. A temperatura e intensidade luminosa foram mantidas em  $25 \pm 1$  °C e 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (iluminação contínua), respectivamente. As concentrações de NaCl de 0,1 M e 0,5 M favoreceram igualmente o crescimento da microalga. A maior quantidade de carotenoides (11,73  $\text{mg L}^{-1}$ ) foi obtida nos cultivos com 0,5 M de NaCl, durante a fase de crescimento estacionário. Os percentuais de  $\beta$ -caroteno (*all-trans* e *9-cis*) obtidos na fase exponencial de crescimento foram de 92 % e 32 % nos cultivos com 3,0 M e 0,5 M de NaCl, respectivamente.

Takagi *et al.* (2006) estudaram o efeito do *stress* salino no crescimento e no acúmulo de lipídios nas células da microalga *D. tertiolecta*. Os cultivos foram realizados em frascos de 500 mL com meio de cultura NORO modificado e com concentrações iniciais de NaCl de 0,5 e 1,0 M. A temperatura, intensidade luminosa e as condições de aeração foram 30 °C, 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e 250  $\text{mL min}^{-1}$  de ar enriquecido com 3 %  $\text{CO}_2$ , respectivamente. O aumento da concentração inicial de NaCl de 0,5 M (semelhante a concentração de NaCl da água do mar) para 1,0 M não diminuiu a concentração de células. Porém testes realizados anteriormente com concentrações iniciais de NaCl de 1,5 e 2,0 M inibiram significativamente o crescimento celular. Embora as culturas com concentrações iniciais de NaCl de 0,5 e 1,0 M demonstraram crescimento celular e consumo de nitrato semelhantes durante os cultivos, o conteúdo lipídico das células cultivadas com concentração inicial de NaCl de 1,0 M foi 7 % maior do que das células cultivadas com concentração inicial de NaCl de 0,5 M.

A fim de continuar a investigação sobre o efeito da adição de NaCl no crescimento das células e no conteúdo lipídico, Takagi *et al.* (2006) também adicionaram porções de uma solução concentrada de NaCl (5,0 M) durante os cultivos com concentração inicial de NaCl de 1,0 M. Foram adicionados (i) 0,5 ou 1,0 M de NaCl no final da fase logarítmica de

crescimento das células ou (ii) 0,5 M de NaCl no meio do período da fase logarítmica de crescimento. O aumento da concentração inicial de NaCl de 1,0 M para 1,5 e 2,0 M resultou na diminuição da biomassa final de 6-10 % e 17 %, respectivamente. A adição de 0,5 ou 1,0 M de NaCl no meio ou no final da fase logarítmica de crescimento celular nos cultivos com concentração inicial de NaCl de 1,0 M aumentou o teor de lipídios em aproximadamente 3 %.

A microalga *Dunaliella* utiliza mecanismos fisiológicos para superar elevadas salinidades e intensidades luminosas. A síntese de glicerol no citoplasma e o acúmulo de  $\beta$ -caroteno são algumas dessas respostas fisiológicas importantes. O *stress* luminoso é criado sempre que a luz incidente tem intensidade maior do que a necessária para a realização de fotossíntese. O acúmulo de  $\beta$ -caroteno depende da intensidade luminosa que a microalga é exposta durante o ciclo de divisão. Além da luz visível, a radiação ultravioleta também pode afetar a produção de  $\beta$ -caroteno (Raja *et al.*, 2007).

Janssen *et al.* (2001) cultivaram a microalga *D. tertiolecta* utilizando luz contínua e diferentes ciclos com períodos curtos de claro e escuro. Os cultivos foram realizados num fotobiorreator de placas com volume útil de 1000 mL. A temperatura foi mantida em 30 °C. Uma mistura de ar e CO<sub>2</sub> (21,5 L h<sup>-1</sup>) foi utilizada para aeração e para a manutenção do pH entre 7,85 e 8,05. Toda a parte frontal do reator foi iluminada por um painel (largura x altura = 20 x 30 cm) com 1452 lâmpadas de LED. A velocidade específica de crescimento da microalga *D. tertiolecta* foi maior com iluminação contínua de 433  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e foi igual a  $0,077 \pm 0,0016 \text{ h}^{-1}$ .

Tang *et al.* (2011) estudaram a influência da fonte e da intensidade de luz, do fotoperíodo e da concentração de CO<sub>2</sub> no crescimento da microalga *D. tertiolecta*. Os efeitos desses parâmetros ambientais no conteúdo lipídico e na composição de ácidos graxos da microalga *D. tertiolecta* também foram investigados. Os cultivos foram realizados em frascos de 650 mL com meio de cultura Erdschreiber. Misturas de ar e CO<sub>2</sub> (60 mL min<sup>-1</sup>) foram utilizadas para aeração. Os frascos foram iluminados com lâmpadas externas que foram automaticamente ligadas e desligadas. A temperatura dos reatores foi mantida em 23 °C e o pH entre 6,4 e 7,0.

A densidade máxima de células obtida por Tang *et al.* (2011) foi  $1,2 \times 10^7$  células/mL que corresponde a 0,39 g L<sup>-1</sup> de biomassa seca em nove dias de cultivo. Esse resultado foi obtido com a maior intensidade de luz (350  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) testada e com iluminação permanente. O aumento da intensidade da luz resultou numa velocidade de crescimento maior e o aumento no período de luz também aumentou a produtividade de biomassa. Não foram observadas diferenças significativas no crescimento das células utilizando lâmpadas de LED vermelhas ou brancas ou lâmpadas fluorescentes. As velocidades de crescimento foram similares quando foram utilizadas misturas de ar com 2, 4 e 6 % CO<sub>2</sub>. Velocidades de crescimento menores que as anteriores e similares foram obtidas com 1 e 10 % de CO<sub>2</sub>, seguidas de 0,1 %, 0,03 % e 20 %. As algas cresceram muito lentamente com 100 % de CO<sub>2</sub> e não cresceram sem CO<sub>2</sub>. As diferentes fontes e intensidades de luz não tiveram efeito significativo na composição de ésteres metílicos de ácidos graxos da *D. tertiolecta*. O linolenato de metila (C18:3) e

palmitato de metila (C16:0) foram os principais ésteres metílicos de ácidos graxos produzidos a partir do óleo da *D. tertiolecta*. Os autores concluíram que o óleo derivado da *D. tertiolecta* é uma matéria-prima adequada para a produção de biocombustíveis.

A falta ou restrição dos nutrientes limitantes afeta o crescimento das microalgas e causa modificações nas funções fisiológicas das células com o acúmulo de determinadas moléculas para suportar estas condições de estresse. Limitações de nitrogênio e fósforo afetam o sistema fotossintético de *D. tertiolecta* (Raja *et al.*, 2007).

Chen *et al.* (2011) investigaram o efeito de alguns nutrientes no crescimento e no acúmulo de lipídios pela microalga *D. tertiolecta*. Os cultivos foram realizados em frascos de 650 mL, iluminados por lâmpadas fluorescentes e aerados com uma mistura de ar e 4 % CO<sub>2</sub> (60 L min<sup>-1</sup>). A temperatura dos cultivos foi mantida em 23 °C. Para determinar a melhor fonte de nitrogênio para o crescimento microalga *D. tertiolecta*, os autores utilizaram o meio de cultura Erdschreiber modificado com diferentes concentrações de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Esse organismo foi capaz de usar tanto o nitrato quanto amônio como fonte de nitrogênio. Porém, a maior produção de biomassa foi obtida utilizando nitrogênio inorgânico na forma de nitrato e não na forma de amônio. A maior densidade ótica, 2,8 (OD 405 nm), foi atingida nos cultivos com 23 mM de NaNO<sub>3</sub>, em comparação com uma densidade de 1,8 nos cultivos com 2,3 mM de NaNO<sub>3</sub>. No entanto, a adição 46 mM de NaNO<sub>3</sub> não aumentou a densidade ótica máxima obtida. O crescimento celular com 1,0 mM de NH<sub>4</sub>Cl foi comparável ao crescimento com 2,3 mM de NaNO<sub>3</sub>. No entanto, o crescimento com concentrações maiores de NH<sub>4</sub>Cl (10 mM e 50 mM) foi menor do que com 1,0 mM de NH<sub>4</sub>Cl. Estes resultados indicam que elevadas quantidades de amônio no meio de cultivo inibem o crescimento celular. O íon fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) inorgânico e os elementos traços: cobalto (Co<sup>2+</sup>), ferro (Fe<sup>3+</sup>), molibdênio (Mo<sup>2+</sup>) e manganês (Mn<sup>2+</sup>) foram identificados como necessários para o maior crescimento da microalga.

Quanto ao acúmulo de lipídios, após um período de cultivo de sete dias, a maior quantidade de lipídios totais foi obtida a partir de células crescidas com meio padrão, não submetidas a condições de *stress* devido à falta de nutrientes limitantes ao crescimento. Porém, uma quantidade substancialmente maior de lipídios totais por unidade de densidade ótica (OD) foi obtida em três dias com meio de cultivo deficiente em nitrogênio. Além do nitrogênio, a deficiência, em menor grau de ferro e cobalto, também resultou no acúmulo de lipídios (Chen *et al.*, 2011).

Jiang *et al.* (2012) também estudaram o efeito da deficiência de nitrogênio no crescimento da *D. tertiolecta* e no acúmulo de lipídios. Inicialmente as microalgas cresceram em dez litros de meio f/2 repleto de nitrogênio. Quando os cultivos alcançaram a fase estacionária de crescimento, as células foram separadas do meio por centrifugação e foram inoculadas na mesma quantidade de meio f/2, porém preparado sem nitrogênio. Após a transferência, as células continuaram a crescer no meio sem nitrogênio durante cinco dias. Após este período até o final do cultivo (15º dia) houve uma redução da densidade ótica de 0,4 para 0,1 aproximadamente (OD 750 nm). O teor médio de lipídios obtido a partir das

células cultivadas no meio f/2 repleto de nitrogênio foi 11,5 %. O teor de lipídios da *D. tertiolecta* não aumentou significativamente após a primeira semana no meio sem nitrogênio.

## 2.9 Sistemas de cultivo

O cultivo de microalgas pode ser feito em sistemas abertos, como lagoas *raceway*, ou em sistemas fechados e controlados chamados de fotobiorreatores, com volume variando desde poucos litros até bilhões de litros (Mata *et al.*, 2010). A Figura 2.4 mostra a representação gráfica de um sistema de cultivo aberto (lagoa *raceway*) e de dois sistemas fechados (fotobiorreator tubular e fotobiorreator de placas).



**Figura 2.4:** Sistemas de cultivo de microalgas: (a) lagoa *raceway*; (b) fotobiorreator de placas, (c) fotobiorreator tubular inclinado e (d) fotobiorreator horizontal/contínuo (Bitog *et al.*, 2011).

Muitas empresas utilizam sistemas de cultivo abertos pouco sofisticados que estão normalmente localizados ao ar livre, sob condições naturais de iluminação e temperatura, e com baixo ou nenhum controle destes parâmetros ambientais. Os tanques utilizados são geralmente rasos, construídos em concreto, fibra de vidro, policarbonato, com fundo de terra ou revestido com material plástico, sendo que as culturas são constantemente agitadas. Logo, os custos de instalação e operação desses sistemas são baixos (Pulz *et al.*, 1995; Grobelaar, 2000). O cultivo em grande escala de monoculturas de algas ainda é limitado a um pequeno

número de espécies nesses sistemas de cultivo. O fator limitante é que muitas espécies necessitam de condições controladas e assépticas e, portanto, precisam ser cultivadas em fotobiorreatores (Janssen *et al.*, 2001).

As empresas que utilizam fotobiorreatores visam alcançar elevadíssima produtividade. Os cultivos são realizados em painéis de forma achatada ou em serpentinas, espirais ou cilindros, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato. Nos fotobiorreatores é possível controlar a quantidade dos nutrientes, temperatura, iluminação, pH etc. Isto também viabiliza a produção de uma série de compostos de elevado valor comercial (Borowitzka, 1999; Eriksen, 2008).

Os fotobiorreatores utilizados para o cultivo de microalgas são iluminados natural ou artificialmente. Sistemas de cultivo de algas com luz natural necessitam de grandes áreas superficiais iluminadas. Normalmente, em escala laboratorial, os fotobiorreatores são iluminados artificialmente com lâmpadas fluorescentes ou outras (Molina *et al.*, 2001; Marxen *et al.*, 2005).

Embora o cultivo de microalgas pareça fácil, existem muitos desafios: minimização de contaminações, fornecimento eficiente de CO<sub>2</sub> e luz, controle das condições de cultivo, redução de capital de investimento e custos de produção, minimização da necessidade de espaço, entre outros (Marxen *et al.*, 2005). Por exemplo, embora uma alta intensidade de luz a pleno sol pareça desejável, pode levar a fotoinibição (Long *et al.*, 1994). Por outro lado, uma baixa intensidade de luz pode limitar a atividade fotossintética e, portanto, a produção de biomassa. O nível de sensibilidade à luz varia de acordo com a espécie (Chisti, 2008).

A Tabela 2.4 apresenta uma comparação entre os sistemas abertos e os fotobiorreatores em relação a diversas condições e parâmetros de cultivo (Pulz *et al.*, 1995; Grobbelaar, 2000; Mata *et al.*, 2010).

**Tabela 2.4:** Comparação entre fotobiorreatores e sistemas abertos para a produção em grande escala de microalgas (Mata *et al.*, 2010).

Item de comparação	Sistemas abertos	Fotobiorreatores
Controle de contaminação	Difícil	Fácil
Risco de contaminação	Alto	Baixo
Esterilidade	Nenhum	Alcançável
Perdas de CO <sub>2</sub>	Depende do pH, alcalinidade etc.	Depende do pH, alcalinidade etc.
Inibição por O <sub>2</sub>	Menor que em fotobiorreatores	Maior que em sistemas abertos
Perdas por evaporação	Alto	Baixo
Uso eficiente da luz	Pobre	Excelente
Controle de temperatura	Difícil	Alcançável
Razão área/volume	Baixo (5 - 10 m <sup>-1</sup> )	Alto (20 - 200 m <sup>-1</sup> )
Concentração celular	Baixa	Alta
Área requerida	Alto	Baixo
Controle de processo	Difícil	Fácil
Controle de espécies	Difícil	Fácil
Agitação	Baixa	Uniforme
Regime de operação	Batelada ou semi-contínuo	Batelada ou semi-contínuo
Produtividade de biomassa	Baixo	3 - 5 vezes mais produtivo
Tensão hidrodinâmica sobre as células	Muito baixa	Baixa - alta
Controle de transferência gasosa	Baixo	Alto
Custos de investimento	Baixo	Alto
Custos de operação	Baixo	Alto
Custos de colheita	Alto	Relativamente baixo
<i>Scale-up</i>	Difícil	Difícil

Após o cultivo em qualquer dos sistemas apresentados, a biomassa deve ser separada do meio de cultura. O processo de separação envolve uma ou mais etapas sólido/líquido, como floculação, centrifugação e filtração, por exemplo. Essa etapa é considerada uma etapa cara e problemática da produção industrial devido à baixa densidade de células obtida com culturas de microalgas, que é tipicamente na faixa de 0,3 - 0,5 g de massa seca de células por litro e, em casos excepcionais, de 5 g de massa seca de células por litro. A filtração, que opera sob pressão ou vácuo, é o método preferido para a separação de microalgas filamentosas relativamente grandes tais como a *Spirulina platensis*. Para células pequenas de microalgas, como *Chlorella* e *Dunaliella*, a filtração convencional não se mostrou adequada (Wang *et al.*, 2008).



A seguir, a biomassa precisa ser desidratada. Para tanto, podem ser empregadas diversas técnicas, como a secagem ao sol, o *spray-drying* e a liofilização. Para a extração dos compostos, as células das microalgas são rompidas, empregando métodos de homogeneização, ultra-som, choque osmótico, solventes, enzimas etc. As substâncias de interesse são então recuperadas e, na maioria dos casos, sofrem algum processo de purificação, como ultrafiltração, cromatografia ou fracionamento (Molina Grima *et al.*, 1999).

Nos próximos itens serão abordados os fotobiorreatores tubulares, de placas e *airlift* devido à importância destes sistemas de cultivos fechados.

## 2.10 Fotobiorreatores tubulares

Os fotobiorreatores tubulares consistem de um conjunto de tubos transparentes retos (Figura 2.4 (C)) ou em serpentina feitos de plásticos transparentes ou vidro. As algas circulam dentro dos tubos por bombeamento ou tecnologia *airlift*. O uso de dispositivo *airlift* tem algumas vantagens: permite trocas de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> entre o meio líquido e o gás de aeração, minimiza potenciais danos celulares associados com bombeamento mecânico e a circulação é realizada sem movimentação de peças. Em alguns casos a temperatura dos fotobiorreatores tubulares é mais bem controlada quando os tubos são submersos numa piscina com água (Molina Grima *et al.*, 1999; Sánchez Mirón *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 2003).

O diâmetro do tubo é limitado (normalmente 0,1 m). O aumento no diâmetro do tubo resulta na diminuição da razão superfície/volume e isso tem um forte impacto sobre a cultura. Com o crescimento das algas em número, elas começam a fazer sombra umas as outras e isso resulta numa redução volumétrica de biomassa por unidade de luz incidente (Jiménez *et al.*, 2003).

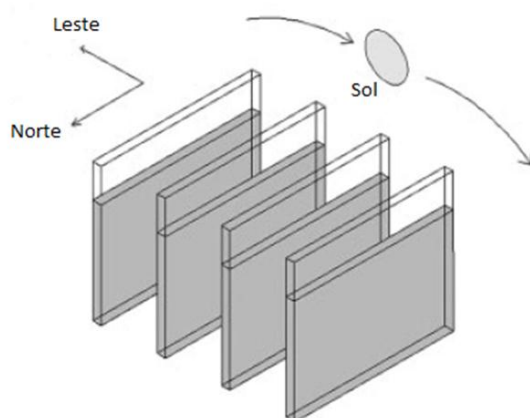
Também há limitações para o comprimento dos tubos. Quando os tubos são muito longos pode ocorrer um acúmulo de O<sub>2</sub> produzido pelas algas por fotossíntese, possivelmente maior que a concentração existente no ar. As concentrações de oxigênio acima de 35 mg/L são tóxicas para a maioria das algas (Borowitzka, 1999; Eriksen, 2008).

Além disso, nos tubos longos, um gradiente decrescente de CO<sub>2</sub> pode ser estabelecido entre a entrada e a saída de gás levando ao esgotamento antes da saída, provocando a morte das algas devido a falta de CO<sub>2</sub> (única fonte de carbono). Gradientes de fixação de carbono também podem resultar em gradientes de pH. Altos índices de fixação de CO<sub>2</sub> podem resultar em pH até 11. Por outro lado, uma fixação inadequada do CO<sub>2</sub> pode resultar na acidificação do meio devido à formação de ácido carbônico (Xu *et al.*, 2009).

Além do diâmetro e do comprimento do tubo, a mistura também é problemática neste tipo de reator (Molina *et al.*, 2000). Pelas razões acima expostas, os fotobiorreatores tubulares não podem ser ampliados indefinidamente e plantas em grande escala de produção dependem de conjuntos de unidades modulares (Eriksen, 2008).

## 2.11 Fotobiorreatores de placas

Normalmente, os painéis dos fotobiorreatores de placas estão ao ar livre e são iluminados pelo menos em um dos lados pela luz direta do sol. Conforme apresentado na Figura 2.5, os painéis são posicionados na vertical ou inclinados num ângulo ideal para maior exposição da cultura a luz do sol (Janssen *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2009).



**Figura 2.5:** Representação do posicionamento dos painéis de um fotobiorreator de placas ao ar livre (Xu *et al.*, 2009).

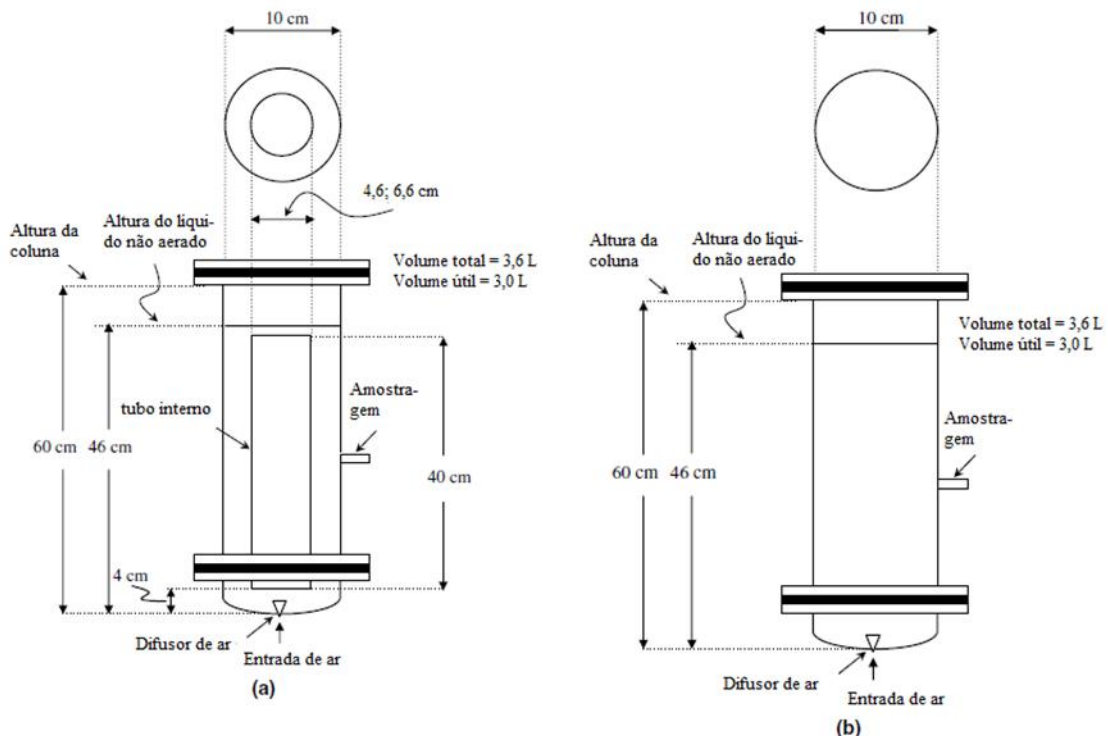
Os fotobiorreatores de placas também podem ser utilizados em ambientes fechados, com iluminação artificial. Cada cultura de microalgas parece ter uma distribuição de luminosidade ideal no meio de cultivo de forma a evitar a inibição do crescimento nas camadas mais profundas, devido à iluminação insuficiente, e a inibição pelo excesso de luz ou efeito de saturação nas camadas mais superficiais. Além disso, deve ser considerada a concentração de biomassa, pois, à medida que esta aumenta, reduz a penetração da luz (Xu *et al.*, 2009).

A utilização dos fotobiorreatores de placas apresenta importantes vantagens, incluindo grande área superficial de iluminação, baixo acúmulo de oxigênio dissolvido quando comparado com fotobiorreatores tubulares horizontais, *design* modular e fácil *scale-up* (Xu *et al.*, 2009). Elevadas concentrações de biomassa (> 80 g/L) podem ser conseguidas (Hu *et al.*, 1998), mas há algumas limitações na utilização destes fotobiorreatores: quantidade considerável de algas pode ficar aderida nas paredes e a aeração pode causar dano às células. Além disso, os sistemas não são passíveis de esterilização e são incompatíveis com equipamentos de fermentação industrial existentes no mercado. O controle de temperatura também é uma limitação, mas pode ser resolvido com a instalação de um trocador de calor composto por tubos de aço inoxidável no interior das placas (Pulz *et al.*, 1995; Carballo-Cárdenas *et al.*, 2003; Sierra *et al.*, 2008).

## 2.12 Fotobiorreatores *airlift*

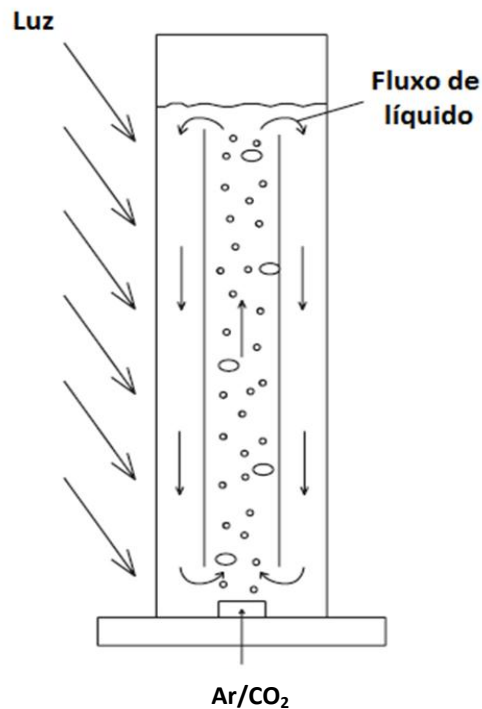
O termo reator *airlift* (ALR) abrange uma ampla gama de dispositivos pneumáticos de contato que são caracterizados pela circulação de fluidos segundo um padrão cíclico definido através de canais construídos especificamente para essa finalidade. Nos ALRs, o conteúdo é pneumaticamente agitado por uma corrente de ar ou por outros gases. Neste segundo caso, o nome utilizado é reator *gaslift*. Além da agitação, a corrente de gás tem a importante função de facilitar o intercâmbio de materiais entre a fase gasosa e o meio, por exemplo a troca de gases, como  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ . Em alguns casos, produtos de reação são retirados através do intercâmbio com a fase gás (Merchuk *et al.*, 1998).

As colunas de bolhas (Figura 2.6) também são agitadas pneumaticamente, mas a principal diferença em relação aos ALRs consiste no tipo de fluxo do fluido, o qual depende da geometria do sistema. A coluna de bolhas é um vaso simples no qual gás é injetado, normalmente na parte inferior, sendo a mistura promovida pela ascensão das bolhas. Nos ALRs, os padrões de circulação dos fluidos são determinados pelo *design* do reator. Os reatores *airlift* são dispositivos que superam significativamente as colunas de bolhas nas medidas de desempenho como mistura, suspensão de sólidos e transferência de calor (Kaewpintong *et al.*, 2007; Chisti, 2008). A representação de um reator *airlift* de tubos concêntricos é apresentada na Figura 2.7.



**Figura 2.6:** Diagramas esquemáticos de (a) biorreator *airlift* e (b) coluna de bolhas (Kaewpintong *et al.*, 2007).





**Figura 2.8:** Representação de um fotobiorreator *airlift* utilizado para o cultivo de microalgas (Xu *et al.*, 2009).

Ao contrário do que acontece nas colunas de bolhas, nos ALRs a contribuição direta da injeção do gás na dinâmica do sistema é pequena. A circulação de líquido e gás é facilitada pela diferença de *gas holdup* entre o *riser* e o *downcomer*, o que gera uma diferença de pressão na parte inferior do equipamento, expressa pela equação (2.1):

$$\Delta P_b = \rho_L \cdot g \cdot (\varphi_r - \varphi_d), \quad (2.1)$$

onde  $\Delta P_b$  é a diferença de pressão,  $\rho_L$  é a densidade do líquido (a densidade do gás é considerada negligenciável),  $g$  é a constante gravitacional, e  $\varphi_r$  e  $\varphi_d$  são as frações de *gas holdup* do *riser* e do *downcomer*, respectivamente. A diferença de pressão do fluido na parte inferior do *downcomer* em relação ao *riser* promove a circulação do fluido no ALR.  $\varphi_r$  e  $\varphi_d$  são valores médios integrados ao longo da altura do reator. Não há pontos isolados de dissipação de energia e a distribuição das forças de cisalhamento é homogênea em todo o reator. Há, portanto, um ambiente relativamente homogêneo, com minimização das mudanças bruscas nas forças mecânicas atuando nas partículas em suspensão. Porém as forças de cisalhamento não podem ser completamente evitadas, pois uma mistura eficiente é necessária. Um dos pontos mais críticos é na *base*, onde há uma curva acentuada de 180 ° (Gavrilescu e Tudose, 1998; Merchuk *et al.*, 1998).

Estudos demonstraram que o crescimento de algas é maior em fotobiorreatores *airlift* do que em fotobiorreatores tipo coluna de bolhas. A uma baixa taxa de aeração (1 L/min), culturas de *Undaria pinnatifida* e *Porphyridium* sp. cresceram de 30 a 50 % mais do que quando cultivadas em colunas de bolhas. Ao contrário da coluna de bolhas, no sistema *airlift* o fluxo de células é mais aleatório e, portanto, homogêneo, movendo as células entre as zonas escura e clara. Na coluna de bolhas as células podem ser expostas a alta ou baixa intensidade de luz por longo tempo, sem circulação. Além disso, pode ocorrer sedimentação de células, o que não ocorre nos fotobiorreatores *airlift*, pois as células são mantidas mais uniformemente suspensas no meio (Merchuk *et al.*, 1998; Kaewpintong *et al.*, 2007).

O desempenho dos ALRs para o crescimento de microrganismos é considerado superior ao dos tradicionais fermentadores de tanque agitado, apesar dos fermentadores convencionais fornecerem os requisitos básicos para o crescimento de microrganismos: interface entre gás e meio de cultura para fornecimento de oxigênio e remoção dos gases residuais; agitação para garantir uma distribuição adequada dos nutrientes e para minimizar danos resultantes da adição de ácido ou base concentrados (para o controle de pH); transferência de calor (controle de temperatura); e um ambiente livre de contaminação. Portanto, a razão para crescimentos mais bem sucedidos observados em ALRs parece estar nas diferenças relacionadas a dinâmica de fluidos entre ALRs e os fermentadores mais convencionais. Em tanques agitados convencionais e colunas de bolhas, a energia necessária para a movimentação do fluido é introduzida localmente, num único ponto no reator, via pás agitadoras ou dispersores de ar, respectivamente. Consequentemente, a dissipação de energia é muito alta perto do agitador e diminui a medida que se aproxima das paredes do reator. Similarmente, as forças de cisalhamento serão maiores perto do agitador, uma vez que a transferência de momento ocorre diretamente para o fluido naquela região, que, por sua vez, transfere esta energia para elementos mais distantes do fluido. Isto resulta numa grande variação de forças de cisalhamento (Gavrilescu e Tudose, 1998; Merchuk *et al.*, 1998; Molina *et al.*, 2000; Gouveia *et al.*, 2003; Kaewpintong *et al.*, 2007).

Portanto, nos vasos mecanicamente agitados, as células no meio de cultura podem ser expostas a ambientes bastante diferentes. Diferentes forças de cisalhamento podem gerar gradientes potencialmente indesejáveis de temperatura, concentrações metabólicas e eletrolíticas. Em zonas altamente turbulentas, não há problemas de transferência de massa e calor, mas gradientes muito altos de cisalhamento podem causar o rompimento das células, especialmente as filamentosas, ou exercer alguma influência na morfologia e metabolismo das células (Merchuk *et al.*, 1998; Loubière *et al.*, 2009).

Além de não ter partes móveis (por exemplo: eixo agitador, vedações e rolamentos), o que também favorece a assepsia, os fotobiorreatores *airlift* possuem outras vantagens para o cultivo de microalgas: têm baixo consumo de energia, alta taxa de transferência de massa, boa suspensão de sólidos, mistura rápida e menor necessidade de espaço para instalação devido orientação vertical. Porém o *scale-up* desses fotobiorreatores pode ser um problema, pois a penetração de luz no reator diminui exponencialmente com a distância da fonte de luz (Bosma *et al.*, 2007).

As vantagens descritas a cima contrabalançam outra desvantagem óbvia dos ALRs, a necessidade de um volume mínimo de líquido para adequada operação. De fato, as variações de volume de líquido nestes reatores são limitadas pela região do *gas separator*, uma vez que a altura do líquido deve ser sempre suficiente para permitir a recirculação do líquido no reator (Merchuk *et al.*, 1998; Gouveia *et al.*, 2003; Loubière *et al.*, 2009).

## 2.13 Modelagem matemática do bioprocesso

O crescimento de uma população microalgal é resultado de interações complexas entre fatores biológicos relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como fatores físicos-químicos relacionados às condições de cultivo. A modelagem matemática do crescimento de microalgas e síntese de bioprodutos é um método eficaz para estudar os efeitos de parâmetros como salinidade, temperatura, iluminação e consumo de nitrogênio a fim de controlar e otimizar a produção comercial dessas culturas em fotobiorreatores (Yuan *et al.*, 2014).

O nitrogênio é um dos principais nutrientes limitantes ao crescimento do fitoplâncton, pois desempenha papel importante no metabolismo celular, estando presente em muitos processos bioquímicos. Ele é usado principalmente para construir proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos nas células (Bougaran *et al.*, 2010). Os modelos cinéticos mais amplamente empregados para reproduzir o crescimento de microalgas com limitação do crescimento celular pelo substrato são os modelos de Monod (1949) e Droop (1968).

O modelo de Monod (1949) assume que o nutriente consumido é instantaneamente transformado em biomassa. Esta suposição é expressa pela proporcionalidade linear entre a velocidade de crescimento ( $\mu$ ) e a velocidade de absorção de nutriente ( $\rho$ ). O modelo Droop (1968) separa a velocidade de crescimento da concentração externa de nutriente através da introdução de uma reserva intracelular de nutriente. A velocidade de crescimento ( $\mu$ ) passa a depender hipoteticamente de uma quantidade ( $q$ ) chamada de quota intracelular, ou seja, uma quantidade média de nutriente armazenado em cada célula (Vatcheva *et al.*, 2006).

O modelo de Droop (1968) é amplamente utilizado para microalgas, pois reproduz a capacidade de absorção de nutriente, não relacionando diretamente o crescimento com a concentração de substrato no meio (Bougaran *et al.*, 2010). O modelo cinético de Monod (1949) é comumente utilizado para descrever a velocidade de crescimento celular em muitos processos. Porém, este modelo é simples, levando em consideração somente o efeito da limitação pelo substrato. A fim de reproduzir adequadamente o comportamento de cada processo, o modelo de Monod (1949) normalmente é modificado. A limitação do crescimento celular pela quantidade de biomassa é uma ampliação normalmente realizada no modelo original de Monod (1949), pois essa situação é muito comum na prática, especialmente em processos regidos por regime batelada (Vatcheva *et al.*, 2006).

O modelo de Luedeking e Piret (1959) é utilizado para reproduzir a cinética de formação de produtos relacionada com o crescimento celular. Este modelo permite avaliar se a formação de produto está associada ao crescimento ou não através de parâmetros que normalmente são funções das concentrações de produto e substrato. No caso da formação de produto associada ao crescimento, tal como o crescimento celular progride, a formação de produto acontece. A máxima formação de produto ocorre quando o crescimento celular máximo é alcançado, isto é, no final da fase exponencial de crescimento celular ou imediatamente antes da fase estacionária. No caso da formação de produto não associada ao crescimento celular, a concentração de produto é independente do padrão de crescimento das células.

## 2.14 Referências Bibliográficas

ABALDE, J.; FABREGAS, J.; HERRERO, C.  $\beta$ -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. *Bioresource Technology*, v. 38, n. 2-3, p. 121-125, 1991.

BAKER, R.; GÜNTHER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, n. 10, p. 484-488, 2004.

BEN-AMOTZ, A.; FISHIER, R. Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis- $\beta$ -carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel. *Food Chemistry*, v. 62, n. 4, p. 515-520, 1998.

BITOG, J. P.; LEE I.-B.; LEE C.-G.; KIM K.-S.; HWANG H.-S.; HONG S.-W.; SEO I.-H.; KWON K.-S.; MOSTAFA E. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. *Computers and Electronics in Agriculture*, v. 76, p. 131-147, 2011.

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

BOSMA, R.; VAN ZESSEN, E.; REITH, J. H.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Prediction of volumetric productivity of an outdoor photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, n. 5, p. 1108-1120, 2007.

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.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 145, n. 1, p. 79-99, 1991.



- CARBALLO-CÁRDENAS, E. C.; TUAN, P. M.; JANSSEN, M.; WIJFFELS, R. H. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*, v. 20, n. 4-6, p. 139-147, 2003.
- CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 87, n. 1, p. 1-14, 1999.
- CHELF, P.; BROWN, L. M.; WYMAN, C. E. Aquatic biomass resources and carbon dioxide trapping. *Biomass and Bioenergy*, v. 4, n. 3, p. 175-183, 1993.
- CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; NG, K. Y. S.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 1649-1655, 2011.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.
- CHIU, S.; KAO, C.; TSAI, M.; ONG, S.; CHEN, C.; LIN, C. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 2, p. 833-838, 2009.
- DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Conversion and Management*, v. 48, n. 7, p. 2169-2173, 2007.
- DEL CAMPO, J. A.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, H.; ANGELES VARGAS, M.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, v. 76, n. 1, p. 51-59, 2000.
- 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. 3, p. 689-733, 1968.
- ELENKOV, I.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; POPOV, S. Effect of salinity on lipid composition of *Cladophora vagabunda*. *Phytochemistry*, v. 42, n. 1, p. 39-44, 1996.
- ERIKSEN, N. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, v. 30, n. 9, p. 1525-1536, 2008.
- EVANS, R. W.; KATES, M.; GINZBURG, M.; GINZBURG, B. Z. Lipid composition of halotolerant algae, *Dunaliella parva* lerche and *Dunaliella tertiolecta*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, v. 712, n. 1, p. 186-195, 1982.
- FABREGAS, J.; ABALDE, J.; HERRERO, C. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*, v. 83, n. 3-4, p. 289-304, 1989.

- FAZELI, M. R.; TOFIGHI, H.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H. Effects of salinity on  $\beta$ -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 18, p. 2453-2456, 2006.
- FRANCAVILLA, M.; TROTTA, P.; LUQUE, R. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 11, p. 4144-4150, 2010.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, v. 43, n. 3, p. 228-265, 2004.
- GAUTHIER, D. A.; TURPIN, D. H. Interactions between inorganic phosphate (Pi) assimilation, photosynthesis and respiration in the Pi-limited green alga *Selenastrum minutum*. *Plant, Cell & Environment*, v. 20, n. 1, p. 12-24, 1997.
- GAVRILESCU, M.; TUDOSE, R. Z. Concentric-tube airlift bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 19, n. 1, p. 37-44, 1998.
- GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 10, p. 401-409, 1997.
- GOUVEIA, E. R.; HOKKA, C. O.; BADINO-JR, A. C. The effects of geometry and operational conditions on gas holdup, liquid circulation and mass transfer in an airlift reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 20, p. 363-374, 2003.
- GROBBELAAR, J. U. Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, n. 3, p. 201-206, 2000.
- GUPTA, H.; FAN, L. Carbonation–Calcination Cycle Using High Reactivity Calcium Oxide for Carbon Dioxide Separation from Flue Gas. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 41, n. 16, p. 4035-4042, 2002.
- GUTIÉRREZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, R.; NAFIDI, A. Trend analysis using nonhomogeneous stochastic diffusion processes. Emission of CO<sub>2</sub>; Kyoto protocol in Spain. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*, v. 22, n. 1, p. 57-66, 2008.
- HALL, D. O.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; GUERRERO, E. C.; RAO, K. K.; GRIMA, E. M. Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: Modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 82, n. 1, p. 62-73, 2003.
- HU, C.; LIN, J.; LU, F.; CHOU, F.; YANG, D. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, v. 109, n. 2, p. 439-446, 2008.
- HU, Q.; KURANO, N.; KAWACHI, M.; IWASAKI, I.; MIYACHI, S. Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, n. 6, p. 655-662, 1998.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 8, p. 631-635, 2000.

IWASAKI, I.; HU, Q.; KURANO, N.; MIYACHI, S. Effect of extremely high-CO<sub>2</sub> stress on energy distribution between photosystem I and photosystem II in a 'high-CO<sub>2</sub>' tolerant green alga, *Chlorococcum littorale* and the intolerant green alga *Stichococcus bacillaris*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 44, n. 3, p. 184-190, 1998.

JAHNKE, L. S.; WHITE, A. L. Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Plant Physiology*, v. 160, n. 10, p. 1193-1202, 2003.

JANSSEN, M.; SLENDERS, P.; TRAMPER, J.; MUR, L. R.; WIJFFELS, R. H. Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, n. 4-5, p. 298-305, 2001.

\_\_\_\_\_. Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 81, n. 2, p. 193-210, 2003.

JIANG, Y.; CHEN, F.; LIANG, S. Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Process Biochemistry*, v. 34, n. 6-7, p. 633-637, 1999.

JIANG, Y.; YOSHIDA, T.; QUIGG, A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 54, p. 70-77, 2012.

JIMÉNEZ, C.; COSSÍO, B. R.; NIELL, F. X. Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. *Aquaculture*, v. 221, n. 1-4, p. 331-345, 2003.

JIMÉNEZ, C.; NIELL, F. X. Influence of temperature and salinity on carbon and nitrogen content in *Dunaliella viridis* teodoresco under nitrogen sufficiency. *Bioresource Technology*, v. 38, n. 2-3, p. 91-94, 1991.

JORQUERA, O.; KIPERSTOK, A.; SALES, E. A.; EMBIRUÇU, M.; GHIRARDI, M. L. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 4, p. 1406-1413, 2010.

KAERPINTONG, K.; SHOTIPRUK, A.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 2, p. 288-295, 2007.

KISHIMOTO, M.; OKAKURA, T.; NAGASHIMA, H.; MINOWA, T.; YOKOYAMA, S.; YAMABERI, K. CO<sub>2</sub> fixation and oil production using micro-algae. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 78, n. 6, p. 479-482, 1994.

LEE, Y. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *Journal of Applied Phycology*, v. 9, n. 5, p. 403-411, 1997.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from Microalgae. *Biotechnology Progress*, v. 24, n. 4, p. 815-820, 2008.

LONG, S. P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P. G. Photoinhibition of Photosynthesis in Nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 45, p. 633-662, 1994.

LOUBIÈRE, K.; OLIVO, E.; BOUGARAN, G.; PRUVOST, J.; ROBERT, R.; LEGRAND, J. A new photobioreactor for continuous microalgal production in hatcheries based on external-loop airlift and swirling flow. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 1, p. 132-147, 2009.

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

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, v. 1, n. 4, p. 393-412, 1959.

MARTÍNEZ, M. E.; JIMÉNEZ, J. M.; EL YOUSFI, F. Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, v. 67, n. 3, p. 233-240, 1999.

MARXEN, K.; VANSELOW, K.; LIPPEMEIER, S.; HINTZE, R.; RUSER, A.; HANSEN, U. A photobioreactor system for computer controlled cultivation of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, v. 17, n. 6, p. 535-549, 2005.

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

MEDINA, A. R.; GRIMA, E. M.; GIMÉNEZ, A. G.; GONZÁLEZ, M. J. I. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, v. 16, n. 3, p. 517-580, 1998.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Effects of Ripening, Cultivar Differences, and Processing on the Carotenoid Composition of Mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 1, p. 128-130, 1998.

MERCHUK, J. C.; RONEN, M.; GIRIS, S.; ARAD, S. Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium* sp. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59, n. 6, p. 705-713, 1998.

MINOWA, T.; YOKOYAMA, S.; KISHIMOTO, M.; OKAKURA, T. Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *Fuel*, v. 74, n. 12, p. 1735-1738, 1995.

MOGEDAS, B.; CASAL, C.; FORJÁN, E.; VÍLCHEZ, C.  $\beta$ -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 108, n. 1, p. 47-51, 2009.

MOLINA, E.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; GARCÍA CAMACHO, F.; CAMACHO RUBIO, F.; CHISTI, Y. Scale-up of tubular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, n. 3, p. 355-368, 2000.

\_\_\_\_\_. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, v. 92, n. 2, p. 113-131, 2001.

MOLINA GRIMA, E.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GARCÍA CAMACHO, F.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, v. 70, n. 1-3, p. 231-247, 1999.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 371-394, 1949.

MURAKAMI, M.; IKENOUCHI, M. The biological CO<sub>2</sub> fixation and utilization project by rite (2) - Screening and breeding of microalgae with high capability in fixing CO<sub>2</sub>. *Energy Conversion and Management*, v. 38, Supplement, n. 0, p. S493-S497, 1997.

OLLIVIER, B.; CAUMETTE, P.; GARCIA, J.; MAH, R. A. Anaerobic Bacteria from Hypersaline Environments. *Microbiological Reviews*, v. 58, n. 1, p. 27-38, 1994.

OROSA, M.; TORRES, E.; FIDALGO, P.; ABALDE, J. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, n. 3, p. 553-556, 2000.

PULZ, O.; GERBSCH, N.; BUCHHOLZ, R. Light energy supply in plate-type and light diffusing optical fiber bioreactors. *Journal of Applied Phycology*, v. 7, n. 2, p. 145-149, 1995.

RADWAN, S. S. Sources of C<sub>20</sub>-polyunsaturated fatty acids for biotechnological use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 4, p. 421-430, 1991.

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S.; RENGASAMY, R. Exploitation of *Dunaliella* for  $\beta$ -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, n. 3, p. 517-523, 2007.

RAVEN, J. A.; EVANS, M. C. W.; KORB, R. E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms. *Photosynthesis Research*, v. 60, n. 2, p. 111-150, 1999.

REBOLLOSO-FUENTES, M. M.; NAVARRO-PÉREZ, A.; GARCÍA-CAMACHO, F.; RAMOS-MIRAS, J. J.; GUIL-GUERRERO, J. L. Biomass Nutrient Profiles of the Microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 6, p. 2966-2972, 2001.

RODEN, E. E.; ZACHARA, J. M. Microbial reduction of crystalline iron (III) oxides: influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environmental Science & Technology*, v. 30, p. 1618-1628, 1996.

SCRAGG, A. H.; ILLMAN, A. M.; CARDEN, A.; SHALES, S. W. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, v. 23, n. 1, p. 67-73, 2002.

SIERRA, E.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; GARCÍA, J. L.; GONZÁLEZ, C.; MOLINA, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*, v. 138, n. 1-3, p. 136-147, 2008.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

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

SÁNCHEZ MIRÓN, A.; CONTRERAS GÓMEZ, A.; GARCÍA CAMACHO, F.; MOLINA GRIMA, E.; CHISTI, Y. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology*, v. 70, n. 1-3, p. 249-270, 1999.

TAKAGI, M.; KARSENKO; YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, n. 3, p. 223-226, 2006.

TANG, H.; ABUNASSER, N.; GARCIA, M. E. D.; CHEN, M.; SIMON NG, K. Y.; SALLEY, S. O. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3324-3330, 2010.

TORNABENE, T. G.; HOLZER, G.; LIEN, S.; BURRIS, N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 5, n. 6, p. 435-440, 1983.

USUI, N.; IKENOUCI, M. The biological CO<sub>2</sub> fixation and utilization project by RITE(1) - Highly-effective photobioreactor system. *Energy Conversion and Management*, v. 38, Supplement, n. 0, p. S487-S492, 1997.

VATCHEVA, I.; JONG, H.; BERNARD, O.; MARS, N. J. I. Experiment selection for the discrimination of semi-quantitative models of dynamical systems. *Artificial Intelligence*, v. 170, n. 4-5, p. 472-506, 2006.

VOLKMAN, J. K.; JEFFREY, S. W.; NICHOLS, P. D.; ROGERS, G. I.; GARLAND, C. D. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 128, n. 3, p. 219-240, 1989.

WALKER, T.; PURTON, S.; BECKER, D.; COLLET, C. Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Reports*, v. 24, n. 11, p. 629-641, 2005.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008.

WANG, X. D.; KRINSKY, N. I.; BENOTTI, P. N.; RUSSELL, R. M. Biosynthesis of 9-cis-Retinoic Acid from 9-cis- $\beta$ -Carotene in Human Intestinal Mucosa in Vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 313, n. 1, p. 150-155, 1994.

XU, L.; WEATHERS, P. J.; XIONG, X.; LIU, C. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Engineering in Life Sciences*, v. 9, n. 3, p. 178-189, 2009.

YAMABERI, K.; TAKAGI, M.; YOSHIDA, T. Nitrogen depletion for intracellular triglyceride accumulation to enhance liquefaction yield of marine microalgal cells into a fuel oil. *Journal of Marine Biotechnology*, v. 6, n. 1, p. 44-48, 1998.

YONGMANITCHAI, W.; WARD, O. P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry*, v. 30, n. 9, p. 2963-2967, 1991.

YUAN, S.; ZHOU, X.; CHEN, R.; SONG, B. 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.; LEE, S. B.; PARK, J. M.; LEE, C.; YANG, J. Carbon Dioxide Fixation by Algal Cultivation Using Wastewater Nutrients. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 69, n. 4, p. 451-455, 1997.

ZHUKOVA, N. V.; AIZDAICHER, N. A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, v. 39, n. 2, p. 351-356, 1995.





## Capítulo 3

### Materiais e Métodos

#### 3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste estudo foi a microalga unicelular *Dunaliella tertiolecta* BE 003, cedida pelo professor Sérgio Lourenço do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense (Rio de Janeiro / Brasil). As microalgas estavam em pipetas Paster de plástico lacradas no volume de 3 mL. As células foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura f/2 (Guillard, 1975) estéril. Elas foram mantidas em incubadora com agitação orbital (Figura 3.1) com temperatura controlada de 28 °C e iluminação permanente através de lâmpada eletrônica de 30 watts, correspondente a uma intensidade luminosa de aproximadamente 5,8 klx, durante dez dias.



**Figura 3.1:** Incubadora com agitação orbital utilizada para o preparo dos inóculos.

Posteriormente, 10 mL desses cultivos foram inoculados em 100 mL de meio f/2 (Guillard, 1975) estéril em frascos Erlenmeyer de 250 mL e transferidos para uma câmara de germinação com temperatura controlada (20 °C) com fotoperíodo de 12 horas fornecido por lâmpada eletrônica de 30 watts, correspondente a uma intensidade luminosa de aproximadamente 5,8 klx.

Desde então, os cultivos estão sendo mantidos no banco de algas no Laboratório 117 do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS. A cada quatro semanas, os cultivos são renovados, ou seja, 10 mL do último cultivo são transferidos para 100 mL de meio estéril em frascos Erlenmeyer de 250 mL, tornando-se, respectivamente, cultura mãe e cultura filha. As microalgas permanecem no banco por três gerações, que corresponde ao tempo no qual permanecem como células ativas.

### 3.2 Meio de cultura

Nos experimentos foi empregado o meio de cultura f/2 acrescido de NaCl. Nas Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3 é apresentada a composição do meio f/2.

**Tabela 3.1:** Meio de cultura f/2 (Guillard, 1975).

Componente	Composição
Sal marinho (Red Sea)	34 g L <sup>-1</sup>
NaNO <sub>3</sub>	75 mg L <sup>-1</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5 mg L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	30 mg L <sup>-1</sup>
Solução de metais traço	1 mL L <sup>-1</sup>
Solução de vitaminas	1 mL L <sup>-1</sup>
Solução tampão de pH	1 mL L <sup>-1</sup>

**Tabela 3.2:** Solução de metais traço.

Componente	Composição (mg L <sup>-1</sup> )
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	9,8
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	180
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	6,3
Na <sub>2</sub> EDTA	4,36
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,15

**Tabela 3.3:** Solução de vitaminas.

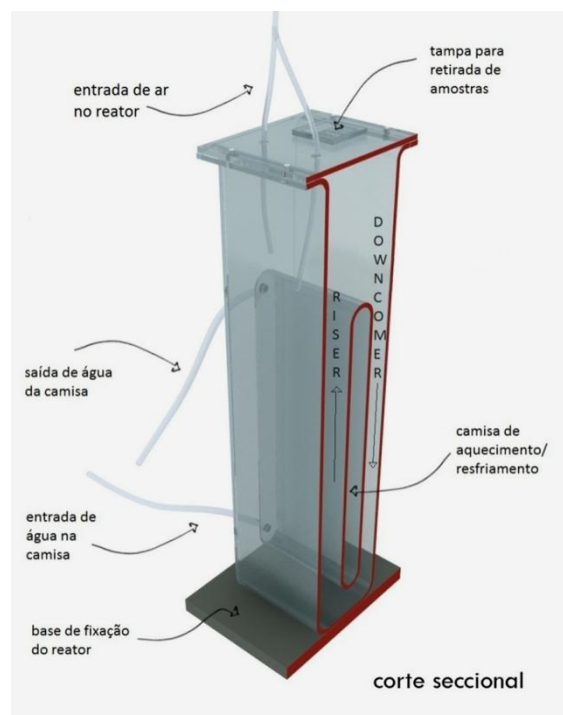
Componente	Composição (mg L <sup>-1</sup> )
Tiamina	100
Cianocobalamina	0,5
Biotina	0,5

As soluções-estoque anteriormente feitas (Lourenço, 2006) foram utilizadas para preparar o meio de cultivo. Este foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. A solução de vitaminas foi esterilizada por microfiltração e adicionada após o resfriamento do cultivo. A solução tampão de pH foi preparada utilizando-se 50 g de Tris (2-amino-2-[hidroximetil]-1-3propanediol) e aproximadamente 30 mL de ácido clorídrico para um volume total de solução de 200 mL. O pH da solução ficou entre 7,1 e 7,3.

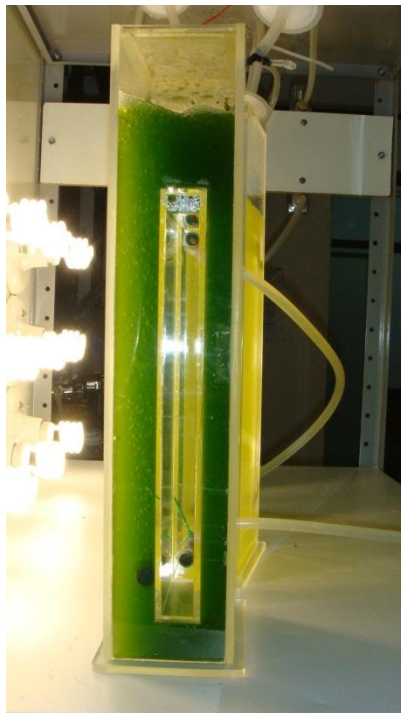
### 3.3 Experimentos em fotobiorreator

A fim de obter um volume de 200 mL de cultura com concentração inicial de células de aproximadamente 0,25 g L<sup>-1</sup> para inocular os fotobiorreatores, uma alíquota de 10 mL de microalgas da cultura mãe do banco de cultivo foi inoculada em 100 mL de meio de cultivo estéril em frascos Erlenmeyer de 500 mL. Estes frascos foram colocados em incubadora com agitação orbital com temperatura controlada de 28 ± 1 °C e iluminação permanente através de lâmpada eletrônica de 30 watts, correspondente a uma intensidade luminosa de aproximadamente 5,8 klx. Após seis dias, mais 100 mL de meio de cultivo estéril foi adicionado a cada frasco Erlenmeyer. Estes permaneceram na incubadora com agitação orbital por mais quatro dias. Após este período, os pré-inóculos foram considerados prontos para serem utilizados nos fotobiorreatores.

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores de placa do tipo *airlift*, confeccionados em acrílico, com volume útil de 2,2 L e com camisa interna de aquecimento/resfriamento conectada a banhos térmicos por mangueiras (Figuras 3.2 e 3.3).

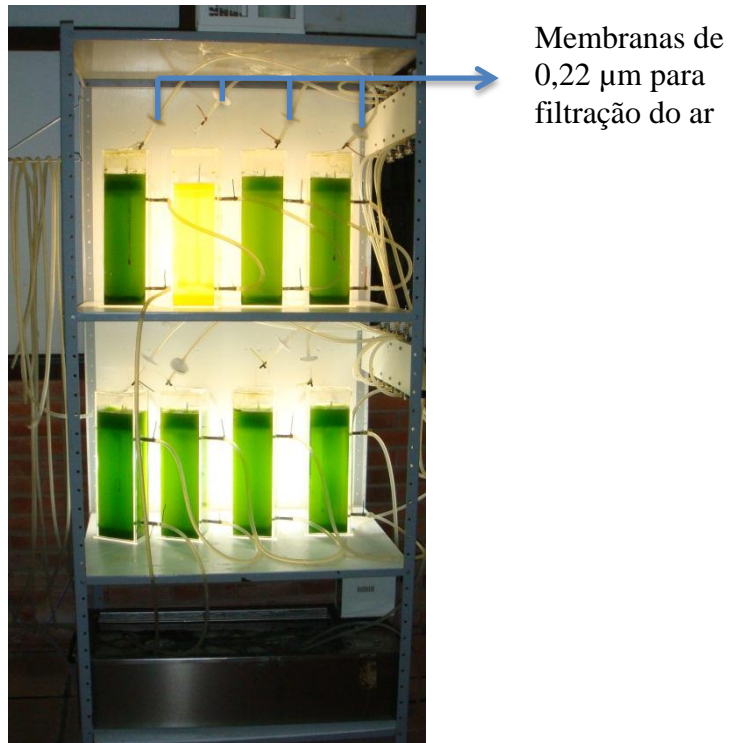


**Figura 3.2:** Desenho 3D do fotobiorreator de 2,2 L (Kochem *et al.*, 2014).



**Figura 3.3:** Fotobiorreator de 2,2 L.

Para realizar a limpeza/asepsia dos reatores, os mesmos foram totalmente preenchidos com água destilada e 10 mL de solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5 %). Após 15 minutos, foram adicionados 2,5 mL de solução de tiosulfato de sódio  $250 \text{ g L}^{-1}$  para a completa neutralização do cloro. Após 2 horas esta solução foi descartada e os reatores foram preenchidos com 2,0 L de meio de cultura estéril. Os fotobiorreatores foram distribuídos em duas prateleiras (Figura 3.4).



**Figura 3.4:** Prateleira com oito cultivos realizados em série.

Os cultivos nos fotobiorreatores foram realizados com diferentes concentrações salinas, temperaturas, fontes e concentrações de nitrogênio, conforme descrito a seguir.

### **3.3.1 Cultivos com diferentes concentrações salinas e temperaturas**

Os pré-inóculos foram inoculados nos fotobiorreatores estéreis contendo 2 litros de meio f/2 estéril acrescido de NaCl (0,430 M, 0,513 M, 0,715 M, 0,917 M e 1,0 M) conforme delineamento experimental. Os fotobiorreatores foram iluminados continuamente na face do *riser* a 18,0 klx por um painel de lâmpadas eletrônicas ( $24 \times 13 \text{ W}$ , luz branca, Tashibra). A temperatura foi mantida constante (21, 23, 28, 33 e 35 °C) através da passagem de água de banhos termostáticos pelo trocador de calor de cada fotobiorreator. Os cultivos foram realizados em triplicata de acordo com o delineamento composto central rotacional (DCCR) apresentado na Tabela 3.4. Os valores de temperatura e salinidade foram escolhidos a partir de testes preliminares realizados com a finalidade de verificar o crescimento das microalgas através de medidas de densidade ótica. Estes testes foram realizados em frasco Erlenmeyer da mesma forma como foram obtidos os pré-inóculos.

**Tabela 3.4:** Planejamento experimental da realização dos cultivos.

Número do experimento	Temperatura (°C) (Valores reais)	Salinidade (M NaCl)	Temperatura (°C) (Valores codificados)	Salinidade (M NaCl)
1	21	0,715	-1,4	0
2	23	0,513	-1,0	-1,0
3	23	0,917	-1,0	+1,0
4	28	0,430	0	-1,4
5	28	0,715	0	0
6	28	1,0	0	+1,4
7	33	0,513	+1,0	-1,0
8	33	0,917	+1,0	+1,0
9	35	0,715	+1,4	0

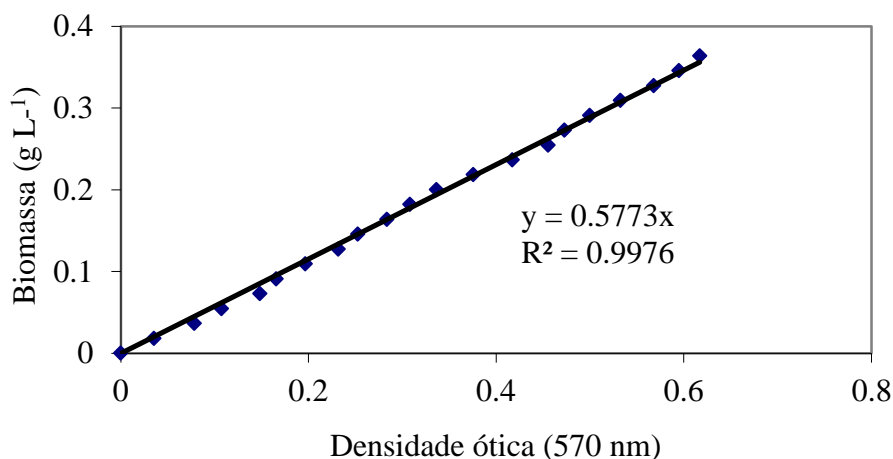
A aeração foi realizada com vazão  $0,5 \text{ L min}^{-1}$  de ar comprimido filtrado com membrana de  $0,22 \mu\text{m}$  Midisart<sup>®</sup>2000 da Sartorius Stedim Biotech utilizando-se duas pedras porosas conectadas em mangueiras inseridas pelo topo dos reatores até o fundo dos mesmos. As vazões de ar foram controladas utilizando-se rotômetros (Dwyer).

A temperatura dos cultivos foi monitorada com termômetros de mercúrio e a intensidade luminosa com auxílio de um luxímetro digital MS6610 da Akso. O pH foi medido através de fita indicadora de pH Alkalit<sup>®</sup> da marca Merck, que mede na faixa de 7,5 a 14. O crescimento das microalgas foi acompanhado através de medidas de densidade ótica a 570 nm (Lourenço, 2006) com espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 Pro e relacionadas com biomassa ( $X$ ) por medida de peso-seco. As medidas de temperatura, intensidade luminosa, pH e densidade ótica foram realizadas três vezes ao dia com intervalos aproximados de oito horas.

Para obter a curva de peso-seco realizou-se o mesmo procedimento descrito no início deste capítulo para obtenção de células para inocular os fotobiorreatores. O conteúdo de três Erlenmeyers foi reunido num único frasco e medidas de densidade ótica a 570 nm (Lourenço, 2006) dessa cultura e de suas diluições foram realizadas em espectrofotômetro. A fim de determinar a massa de células da cultura inicial em triplicata, foram utilizados três tubos falcons previamente limpos, secos e pesados. Em cada um dos tubos falcons foram adicionados 12 mL da cultura sem diluição. Estes foram centrifugados por aproximadamente 15 minutos em centrífuga de mesa da marca Fanen modelo 204-NR. O sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foram adicionados mais 12 mL da mesma cultura em cada um dos tubos falcons. Os mesmos foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi repetido doze vezes até completar um total de 144 mL de cultura centrifugados, a fim de obter uma massa de células suficientemente grande para minimizar erros de pesagem. Então, os tubos falcons com as células foram colocados em estufa a  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os tubos foram pesados diariamente até atingirem massa constante. Uma massa média resultante das massas obtidas nos três tubos falcons foi relacionada com a medida de

densidade ótica da cultura inicial, sem diluição. A partir desta relação, das medidas de densidade ótica e das diluições conhecidas realizadas obteve-se o gráfico apresentado na Figura 3.5. A partir deste gráfico obteve-se a Equação 3.1 que relaciona as medidas de densidade ótica a 570 nm com a biomassa.

$$X \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 0,5773 \times OD_{570} \quad (3.1)$$



**Figura 3.5:** Relação entre biomassa (g L<sup>-1</sup>) e densidade ótica (570 nm).

A duração média dos cultivos foi de quatro dias, tempo necessário para atingir a fase de estabilização ou de início de declínio das culturas. Posteriormente, as células de cada fotobiorreator foram separadas do meio salino por centrifugação. A remoção completa de água do material centrifugado de cada tratamento foi obtida através do processo de liofilização.

Amostras do material liofilizado obtido em cada experimento foram utilizadas para determinação do teor de lipídios totais em extrator Soxhlet e para a realização de análises de carotenoides em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

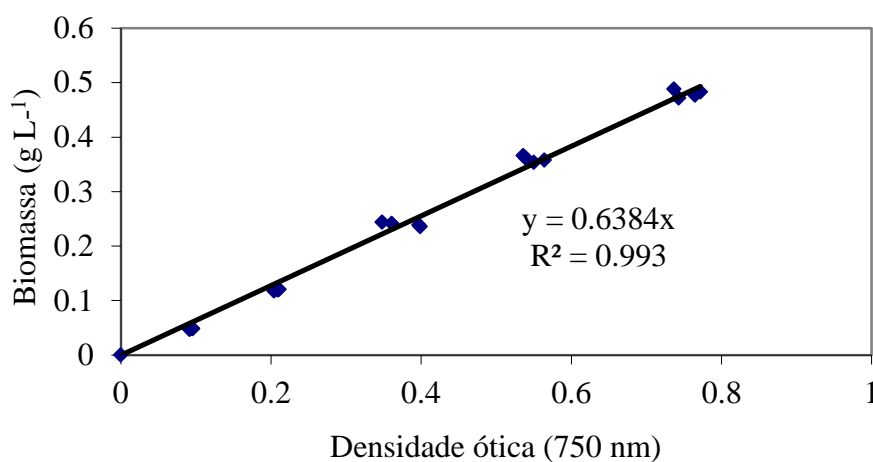
### 3.3.2 Cultivos com diferentes intensidades de luz

Os pré-inóculos foram inoculados nos fotobiorreatores estéreis contendo dois litros de meio f/2 estéril, como descrito no item 3.2, porém com 16,5 g L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio. Os fotobiorreatores foram continuamente iluminados na seção riser com diferentes intensidades de luz (2,5; 10; 17,5 ou 24 klx) por painéis com diferentes quantidades de lâmpadas eletrônicas (13 W, luz branca, Tashibra) a fim de obter a intensidade de luz desejada em cada fotobiorreator. Os experimentos foram realizados em duplicata, ou seja, foram realizados oito cultivos simultaneamente, dois com cada intensidade luminosa.

Em todos os experimentos, a temperatura foi mantida constante em 28 °C através da passagem de água de banhos termostáticos pelo trocador de calor de cada fotobiorreator. A aeração foi realizada com vazão 0,5 L min<sup>-1</sup> de ar comprimido filtrado. Durante os cultivos, os controles de intensidade luminosa, temperatura, pH e medidas de densidade ótica a 750 nm foram realizados três vezes ao dia com intervalos aproximados de oito horas. Além disso, nestes mesmos intervalos, foram retiradas duas alíquotas de 2 mL de cada fotobiorreator, uma para a realização de medidas da densidade ótica dos cultivos e outra para análise de carotenoides produzidos pelas células. Essa alíquota foi centrifugada (16000 × g) durante cinco minutos, o precipitado foi congelado (-18 °C) para posterior análise de pigmentos, enquanto o sobrenadante foi descartado.

O crescimento das microalgas foi acompanhado através de medidas de densidade ótica a 750 nm com espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 Pro e relacionadas com biomassa ( $X$ ) por medida de peso-seco. Para obter a curva de peso-seco realizou-se o mesmo procedimento descrito no capítulo 3.3.1, porém as medidas de densidade ótica foram realizadas a 750 nm. A partir do gráfico apresentado na Figura 3.6 e da Equação 3.2, as medidas de densidade ótica a 750 nm podem ser relacionadas com a biomassa.

$$X \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 0,6384 \times OD_{750} \quad (3.2)$$



**Figura 3.6:** Relação entre biomassa (g L<sup>-1</sup>) e densidade ótica (750 nm).

A duração média dos cultivos foi de 92 horas, tempo necessário para atingir a fase de estabilização ou de início de declínio das culturas. As células de cada fotobiorreator foram separadas do meio por centrifugação e posterior liofilização. Amostras do material liofilizado obtido em cada experimento foram utilizadas para determinação do teor de lipídios totais em extrator Soxhlet.



### 3.3.3 Cultivos com diferentes fontes de nitrogênio

A fim de avaliar o crescimento das microalgas com diferentes fontes de nitrogênio, pré-inóculos foram inoculados nos fotobiorreatores estéreis contendo dois litros de meio f/2 estéril, como descrito no capítulo 3.2, porém com diferentes sais contendo nitrogênio (0,050 M NaNO<sub>3</sub>, 0,025 M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ou 0,050 M KNO<sub>3</sub>) e 16,5 g L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio. Em todos os cultivos, a aeração foi realizada com vazão 0,5 L min<sup>-1</sup> de ar enriquecido com 1 a 2 % de CO<sub>2</sub> (White Martins), a fim de manter o pH da cultura entre 7,5 e 8,5 durante todo o cultivo. A temperatura foi mantida constante em 28 °C e os fotobiorreatores foram continuamente iluminados na seção *riser* a 17,5 klx. Os experimentos foram realizados em duplicata, ou seja, foram realizados seis cultivos simultaneamente, dois com cada sal contendo nitrogênio.

Durante os cultivos, o crescimento das microalgas foi acompanhado através de medidas de densidade ótica a 750 nm. As medidas de temperatura, intensidade luminosa, pH e densidade ótica foram realizadas duas vezes ao dia com intervalos aproximados de doze horas. A duração média dos cultivos foi de 220 horas, tempo necessário para atingir a fase de estabilização ou de início de declínio das culturas. A duração desses cultivos foi maior em relação aos anteriores devido à suplementação do meio de cultura com nitrogênio, como será discutido posteriormente.

### 3.3.4 Cultivos com diferentes concentrações de nitrogênio

Uma vez escolhido o nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, procedeu-se a avaliação de diferentes concentrações deste sal para o crescimento das microalgas. Para isto, pré-inóculos foram inoculados nos fotobiorreatores estéreis contendo dois litros de meio f/2 estéril, como descrito no capítulo 3.2, porém com diferentes concentrações de nitrato de sódio (75, 300, 600 ou 900 mg L<sup>-1</sup>) e 16,5 g L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio. Os experimentos foram realizados em duplicata, ou seja, foram realizados oito cultivos simultaneamente, dois com cada concentração de nitrato de sódio. As demais condições de cultivo foram idênticas às utilizadas na escolha do sal contendo nitrogênio (28 °C e 17,5 klx).

A verificação da temperatura, intensidade luminosa e pH foi realizada duas vezes ao dia com intervalos aproximados de doze horas. Além disso, nestes mesmos intervalos, foram retiradas duas alíquotas de 2 mL de cada fotobiorreator, uma para a realização de medidas da densidade ótica (750 nm) dos cultivos e outra para análise de nitrogênio do meio de cultura e de carotenoides produzidos pelas células. Essa alíquota foi centrifugada a 16000 × *g* durante 5 minutos. O sobrenadante (meio de cultura) foi removido com auxílio de uma pipeta *Pasteur* e congelado (-18 °C) para posterior análise de nitrogênio do meio de cultura. O precipitado (*pellet*) também foi congelado separadamente para posterior análise de carotenoides totais.

A duração média dos cultivos com diferentes concentrações de nitrato de sódio foi de 190 horas, tempo necessário para atingir a fase de estabilização ou de início de declínio das culturas. Finalizados os cultivos, as células de cada fotobiorreator foram separadas do meio de cultura por centrifugação e posterior liofilização. Amostras do material liofilizado obtido em

cada experimento foram utilizadas para determinação do teor de lipídios totais em extrator Soxhlet.

### **3.3.5 Cultivos submetidos a condições de estresse**

Oito cultivos foram realizados a fim de avaliar o estresse salino e luminoso na microalga *D. tertiolecta*. Os pré-inóculos foram inoculados nos fotobiorreatores estéreis contendo dois litros de meio f/2 estéril, como descrito no capítulo 3.2, porém com 16,5 g L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio e 300 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio. Em todos os cultivos, a aeração foi realizada com vazão 0,5 L min<sup>-1</sup> de ar enriquecido com 1 a 2 % de CO<sub>2</sub> (White Martins), a fim de manter o pH da cultura entre 7,5 e 8,5 durante todo o cultivo. A temperatura foi mantida constante em 28 °C e os fotobiorreatores foram continuamente iluminados na seção *riser* a 17,5 klx. Nos cultivos submetidos ao estresse salino, uma solução concentrada de NaCl (5,0 M) foi adicionada no final da fase log, após 140 horas de cultivo. Nesse mesmo tempo (140 h), também foi aumentada a intensidade luminosa na seção *riser* nos cultivos submetidos ao estresse luminoso.

Então, após 140 horas, dois cultivos continuaram sendo realizados nas mesmas condições, sem adição de NaCl e aumento da intensidade de luz (0,715 M NaCl e 17,5 klx). Após o mesmo intervalo de tempo, outros dois cultivos foram submetidos apenas ao estresse salino (1,215 M NaCl e 17,5 klx), mais dois cultivos foram submetidos apenas ao estresse luminoso (0,715 M NaCl e 30 klx) e dois cultivos foram submetidos ao estresse salino e luminoso (1,215 M NaCl e 30 klx). Os experimentos foram realizados simultaneamente e em duplicata.

A verificação da temperatura, intensidade luminosa e pH foi realizada duas vezes ao dia com intervalos aproximados de doze horas. Além disso, nestes mesmos intervalos, foram retiradas duas alíquotas de 2 mL de cada fotobiorreator, uma para a realização de medidas da densidade ótica (750 nm) dos cultivos e outra para análise de nitrogênio do meio de cultura e de carotenoides produzidos pelas células. Essa alíquota foi centrifugada a 16000 × g durante 5 minutos. O sobrenadante (meio de cultura) foi removido com auxílio de uma pipeta *Pasteur* e congelado (-18 °C) para posterior análise de nitrogênio do meio de cultura. O precipitado (*pellet*) também foi congelado separadamente para posterior análise de carotenoides totais.

A duração média desses cultivos foi de 210 horas, tempo necessário para atingir o início de declínio das culturas. Finalizados os cultivos, as células de cada fotobiorreator foram separadas do meio de cultura por centrifugação e posterior liofilização. Amostras do material liofilizado obtido em cada experimento foram utilizadas para determinação do teor de lipídios totais em extrator Soxhlet.

## 3.4 Métodos analíticos

### 3.4.1 Análise de carotenoides por CLAE

A fim de analisar os carotenoides via CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), foram pesados em torno de 0,0500 g de microalgas liofilizadas com auxílio de balança analítica. Após o descongelamento da amostra, foram adicionados 1 mL de álcool metílico, 1 mL de álcool etílico e 2 mL de éter de petróleo. A mistura foi homogeneizada em vortex e colocada em banho com ultra-som por 10 minutos para a completa extração dos pigmentos.

O material foi centrifugado por 15 minutos a  $2000 \times g$  e  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para um vidro âmbar com auxílio de uma pipeta Pasteur. Todo este procedimento, desde a adição dos solventes, foi repetido até que não se verificasse a presença de pigmentos no material sólido, marcada pela coloração completamente branca do mesmo.

A saponificação do extrato foi realizada adicionando-se um volume igual (1:1) de uma solução de NaOH 10 % em álcool metílico. Os frascos âmbar foram cobertos com papel alumínio e guardados por 12 horas em local escuro para a completa reação de saponificação.

Posteriormente, a mistura saponificada foi transferida para funis de separação de 500 mL. Foram adicionados água destilada até completar um terço do volume do funil, 50 mL de éter de petróleo, 50 mL de éter etílico e, novamente, água destilada até completar o volume total do funil de separação. Aguardou-se a separação das fases orgânica e aquosa, sendo esta última descartada (Figura 3.7). Adicionou-se novamente água destilada ao funil de separação. Após separação das fases, descartou-se a fase aquosa. Este procedimento foi realizado até o pH da fase aquosa atingir valor 7 (neutro), medido por papel indicador.



**Figura 3.7:** Extração dos carotenoides existentes nas microalgas com solventes orgânicos.

A fase orgânica foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL e uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro foi adicionada a fim de remover qualquer resíduo da

fase aquosa. Então, a fase orgânica livre de umidade e sem sulfato de sódio foi transferida para balões de vidro para evaporação dos solventes a vácuo em rota-vapor a 35 °C.

Finalmente, os pigmentos foram transferidos para frasco âmbar através de diluição na menor quantidade possível de éter etílico. Os pigmentos foram secos com baixa vazão de gás nitrogênio no interior do frasco âmbar. Estes frascos foram guardados em *freezer* a - 18 °C.

Imediatamente antes da injeção da amostra no CLAE, os pigmentos foram dissolvidos em 0,5 mL de éter etílico e colocados em um banho de ultrassom por cinco minutos. A amostra foi transferida para uma seringa e filtrada com uma membrana de 0,45 µm para solventes orgânicos (Millipore Indústria e Comércio Ltda.) diretamente para o tubo de injeção do CLAE.

O sistema utilizado para as análises das amostras foi Agilent 1100 Series HPLC equipado com bomba quaternária para os solventes (Waters 2695 series) e detecção por UV/Vis (Waters 2487 Dual series I). Para a análise dos carotenoides foi utilizada uma coluna de fase reversa C30 YCM. Como fase móvel foi utilizado um gradiente constituído de água/metanol/éter metil-terc-butílico (MTBE) conforme descrito na Tabela 3.5 (Zanatta e Mercadante, 2007).

**Tabela 3.5:** Gradiente da fase móvel utilizado para as análises no CLAE.

Tempo (min)	Água (%)	Metanol (%)	MTBE (%)
0	5	90	5
12	0	95	5
25	0	89	11
40	0	75	25
60	0	50	50

Em estudos realizados previamente no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS foram identificados os tempos de retenção dos carotenoides: luteína (aproximadamente 18 minutos), zeaxantina (aproximadamente 21 minutos) e β-caroteno (aproximadamente 42 minutos), notadamente presentes na microalga *Dunaliella tertiolecta* e marcados por picos bem definidos nos cromatogramas obtidos. Foram geradas curvas de calibração a partir de padrões comerciais destes carotenoides, obtendo-se os coeficientes das retas utilizados para a determinação das concentrações desses pigmentos nas amostras analisadas a partir das áreas desses picos obtidas nos cromatogramas.

### 3.4.2 Determinação de carotenoides totais

Em tubos de ensaio, dois mililitros (2,0 mL) de acetona (solvente puro, Synth) foram adicionados ao precipitado de microalgas (descongelado). A mistura foi homogeneizada em vortex até a completa extração dos pigmentos. Os tubos de ensaio foram cobertos com papel alumínio e colocados no refrigerador (-4 °C) por 12 horas. Posteriormente, o material foi

centrifugado ( $16000 \times g$ ) durante cinco minutos. Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, o extrato (sobrenadante) foi transferido para uma cubeta de vidro. Foram medidas as absorvâncias ( $OD$ ) nos comprimentos de onda 661,6, 644,8 e 470 nm. Medidas de turbidez foram realizadas em 750 e 520 nm (Lichtenthaler e Buschmann, 2001b). O caminho ótico do espectrofotômetro utilizado foi 1 cm. As concentrações de clorofilas ( $C_{Chla}$  e  $C_{Chlb}$ ) e a concentração de carotenoides totais das células ( $C_{Ct}$ ) foram calculadas com as Equações 3.3, 3.4 e 3.5 (Lichtenthaler e Buschmann, 2001a), onde a concentração de pigmentos é dada em  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de solução do extrato.

$$C_{Chla} = 11,24A_{661,6} - 2,04A_{644,8} \quad (3.3)$$

$$C_{Chlb} = 20,13A_{644,8} - 4,19A_{661,6} \quad (3.4)$$

$$C_{Ct} = \frac{1000A_{470} - 1,90C_{Chla} - 63,14C_{Chlb}}{214} \quad (3.5)$$

### 3.4.3 Determinação de lipídios totais

A análise do teor de lipídios totais na biomassa foi realizada no extrator Soxhlet (Foss/Soxtec 2055<sup>TM</sup>). Esta análise consiste em colocar a amostra (microalgas liofilizadas) num cartucho que permite a permeação do solvente (éter de petróleo) que é colocado num copo metálico abaixo do cartucho com a amostra. Esse sistema é aquecido numa placa metálica e o solvente vaporizado, passa pela amostra, condensa no condensador resfriado por água, num sistema em refluxo, extraíndo os lipídios existentes na amostra (Figura 3.8).



**Figura 3.8:** Extrator Soxhlet.

Os copos metálicos utilizados foram previamente secos em estufa e resfriados em dessecador e, posteriormente, pesados. O conteúdo de microalgas liofilizadas foi

homogeneizado em equipamento *vortex* e amostras de 0,1000 g foram pesadas nos cartuchos, utilizando-se balança analítica. Volumes de 100 mL de éter de petróleo foram transferidos para cada copo metálico com auxílio de proveta graduada. Procedeu-se a extração dos lipídios das amostras durante uma hora a temperatura de 135 °C. Foram adicionados mais 100 mL de éter de petróleo a cada copo metálico e mais uma extração foi realizada nas mesmas condições, a fim de garantir a completa extração dos lipídios existentes nas amostras.

Posteriormente, os copos metálicos foram transferidos para estufa para completa remoção do solvente durante trinta minutos. Após atingirem a temperatura ambiente no dessecador foram novamente pesados em balança analítica, sendo a massa adicional verificada proveniente do conteúdo lipídico das amostras. Com a massa de lipídios extraídos e com a massa inicial da amostra liofilizada foi possível calcular o percentual de lipídios totais de cada amostra.

#### **3.4.4 Análise elementar**

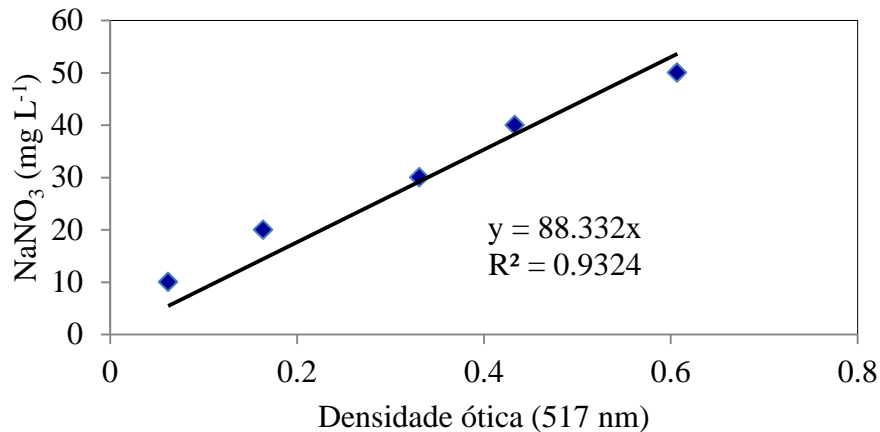
Na análise elementar foram realizadas as determinações dos elementos individuais da microalga *D. tertiolecta*. Esta análise envolveu a determinação dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre da biomassa liofilizada por análise instrumental (ELEMENTAR Analysensysteme BmbH, model VARIOEL V5 19.9.23, Alemanha), através da combustão das amostras com detecção dos elementos por condutividade térmica.

#### **3.4.5 Determinação de $\text{NaNO}_3$ no meio de cultivo**

Em tubos de ensaio, 30  $\mu\text{L}$  de cada uma das quatro soluções reagentes que compõem o teste colorimétrico para determinação de nitrato de sódio em água de aquário (Mydor, USA) foram adicionados às amostras descongeladas de meio de cultivo (sobrenadante), coletadas durante os cultivos. Para isso foram utilizados 1,0 mL de cada amostra com a diluição necessária para a obtenção da concentração de nitrato de sódio dentro da curva padrão (entre zero e 50  $\text{mg L}^{-1}$ ).

Medidas de densidade ótica dos padrões e amostras foram realizadas em 517 nm, comprimento de onda no qual se observou a maior absorbância do nitrato de sódio. O caminho ótico do espectrofotômetro (Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 Pro) utilizado foi 1 cm. Uma curva padrão (Figura 3.9) foi obtida a partir das medidas de densidade ótica relacionadas às concentrações conhecidas de nitrato de sódio (10, 20, 30, 40, 50  $\text{mg L}^{-1}$ ). As concentrações de nitrato de sódio nas amostras dos meios de cultivo foram determinadas a partir das medidas de densidade ótica relacionadas com as concentrações de nitrato de sódio através da Equação 3.6.

$$C_{\text{NaNO}_3} (\text{mg L}^{-1}) = 88,332 \times OD_{517 \text{ nm}} \quad (3.6)$$



**Figura 3.9:** Relação entre concentração de NaNO<sub>3</sub> (mg L<sup>-1</sup>) e densidade ótica (517 nm).

### 3.5 Modelagem matemática e estimação de parâmetros

Os dados experimentais utilizados para a estimação de parâmetros dos modelos foram de cultivos realizados em fotobiorreator com diferentes concentrações de nitrato de sódio (75, 300, 600 ou 900 mg L<sup>-1</sup>), apresentados no Capítulo 5. O procedimento experimental utilizado nestes cultivos foi detalhado no Capítulo 3.3.4.

A modelagem matemática combinou equações diferenciais para crescimento celular ( $X$ ), consumo de nitrogênio ( $N$ ) e formação de carotenoides ( $C_{Cl}$ ), de acordo com as Equações 3.7, 3.8 e 3.18, respectivamente. Os modelos matemáticos para o crescimento de microalgas *D. tertiolecta* tiveram como ponto de partida a formulação básica de Monod (1949). Duas modificações foram propostas para tentar melhor representar o crescimento de microalgas *D. tertiolecta* em função do consumo de nitrogênio: (i) a velocidade de absorção de nitrogênio tem um termo associado ao crescimento celular ( $Y_{XN}$ ) e um termo não associado ao crescimento celular ( $m_N$ ) e (ii) a velocidade de absorção de nitrogênio é catalisada pela concentração de nitrogênio como uma reação ordem  $n$ . O modelo ModN proposto é mostrado nas equações a seguir:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.7)$$

$$\frac{dN}{dt} = -\rho \cdot X \quad (3.8)$$

$$\rho = \left( \frac{\mu}{Y_{XN}} + m_N \right) \cdot N_{dl}^n \quad (3.9)$$

$$N_{dl} = \frac{N}{N_{ref}} \quad (3.10)$$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left( \frac{N}{N + k_N} \right) \quad (3.11)$$

onde a concentração de nitrogênio de referência ( $N_{ref}$ ) é  $1 \text{ g L}^{-1}$ .

A limitação do crescimento pela disponibilidade de luz devido ao efeito de sombreamento mútuo das células foi considerado nas culturas começando com 300, 600 e 900  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ , nas quais maiores concentrações de biomassa foram alcançadas e/ou o nitrogênio não foi completamente consumido. Duas expressões matemáticas foram usadas para representar este fenômeno. O modelo ModNXmax foi representado pela substituição da Equação 3.11 pela Equação 3.12.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left( \frac{N}{N + k_N} \right) \cdot \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (3.12)$$

O termo  $(1 - X / X_{\max})$  descreve a auto inibição celular e foi usada para modelar o crescimento heterotrófico de *Haematococcus pluvialis* (Zhang *et al.*, 1999a).

O modelo ModNKx foi representado pela substituição da Equação 3.11 pela Equação 3.13, utilizando a abordagem usada por Jerusalimsky (Birol *et al.*, 1998).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left( \frac{N}{N + k_N} \right) \cdot \left( \frac{k_X}{X + k_X} \right) \quad (3.13)$$

O modelo de Droop (1968) tal como descrito na literatura também foi avaliado para o crescimento celular e consumo de nitrogênio, e consiste de seis equações descritas a baixo:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.7)$$

$$\frac{dN}{dt} = -\rho \cdot X \quad (3.8)$$

$$\frac{dq}{dt} = \rho - \mu \cdot q \quad (3.14)$$

$$\mu = \bar{\mu} \cdot \left( 1 - \frac{k_q}{q} \right) \quad (3.15)$$

$$\rho = \rho_{\max} \cdot \left( \frac{N}{N + k_N} \right) \quad (3.16)$$

$$q = \frac{N_{in} - N}{X} \quad (3.17)$$



A quota celular interna de nitrogênio ( $q$ ) foi calculada a partir da diferença entre a concentração inicial de nitrogênio e a concentração de nitrogênio no meio de cultura ao longo do tempo (Bougaran *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2014).

A expressão de Luedeking e Piret (1959) (Equação 3.18) foi utilizada para reproduzir a formação de carotenoides, independentemente dos modelos utilizados para o nitrogênio e a biomassa.

$$\frac{dC_{ct}}{dt} = (\alpha \cdot \mu + \beta) \cdot X \quad (3.18)$$

O modelo indica que a formação de produto pelas células tem um termo associado ao crescimento celular ( $\alpha$ ) e um termo não associado ao crescimento celular ( $\beta$ ).

Os modelos ModN e Droop foram avaliados para todas as concentrações iniciais de nitrato de sódio testadas. Os modelos ModNXmax e ModNKx foram avaliados para as concentrações iniciais de 300 mg L<sup>-1</sup>, 600 mg L<sup>-1</sup> e 900 mg L<sup>-1</sup>, pois o crescimento poderia ser limitado por falta de nitrogênio e aumento da concentração de biomassa.

Os parâmetros foram estimados a partir dos dados experimentais utilizando o software EMSO (Environment for Modeling, Simulation and Optimization) (Soares e Secchi, 2003), utilizando o método dos poliedros flexíveis (Nelder e Mead, 1965), para minimizar a função objetivo ( $F_{Obj}$ ) dos quadrados mínimos ordinários. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o erro médio quadrático (MSE) foram utilizados para comparar a qualidade do ajuste para os modelos testados.

### 3.6 Referências Bibliográficas

BIROL, G.; DORUKER, P.; KIRDAR, B.; ÖNSAN, Z. I.; ÜLGEN, K. Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 7, p. 763-771, 1998.

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.

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. 3, p. 689-733, 1968.

GUILLARD, R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. e CHANLEY, M. (Ed.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*: Springer US, 1975, chap. 3, p. 29-60.

KOCHEM, L. H.; DA FRÉ, N. C.; REDAELLI, C.; RECH, R.; MARCÍLIO, N. R. Characterization of a novel flat-panel airlift photobioreactor with an internal heat exchanger. *Chemical Engineering & Technology*, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2001a, p. F4.3.1-F4.3.8.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids. In: (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2001b, p. F4.2.1-F4.2.6.

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

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, v. 1, n. 4, p. 393-412, 1959.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 371-394, 1949.

NELDER, J. A.; MEAD, R. A simplex method for function minimization. *The Computer Journal*, v. 7, n. 4, p. 308-313, 1965.

SOARES, R. D. P.; SECCHI, A. R. EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimisation. *Computer Aided Chemical Engineering*, v. 14, p. 947-952, 2003.

YUAN, S.; ZHOU, X.; CHEN, R.; SONG, B. 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.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007.

ZHANG, X. W.; GONG, X. D.; CHEN, F. Kinetic models for astaxanthin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 23, n. 1, p. 691-696, 1999a.

## **Capítulo 4**

### **Artigo 1 - Effect of temperature and salinity on the production of carotenoids and lipids by marine microalga**

Este artigo foi submetido para publicação no periódico *Ciência Rural*.

## Effect of temperature and salinity on the production of carotenoids and lipids by marine microalga

Nicéia Chies Da Fré,<sup>a,c</sup> Alessandro de Oliveira Rios,<sup>b</sup> André Jablonski,<sup>b</sup> Rosane Rech,<sup>b\*</sup> Nilson Romeu Marcílio<sup>c</sup>

### Abstract

This research identified the carotenoids present in *Dunaliella tertiolecta* extract and evaluated the effects of temperature and medium salinity on the elemental composition and lipid and carotenoid contents of this marine microalga cultured in a flat-panel airlift photobioreactor. The experiments were performed according to a central composite design (CCD). Six carotenoids were identified by high-performance liquid chromatography (HPLC): all-*trans*-lutein, all-*trans*- $\beta$ -carotene, all-*trans*-zeaxanthin, all-*trans*-neoxanthin, all-*trans*-antheraxanthin and 9-*cis*- $\beta$ -carotene. The ideal conditions for carotenoid and lipid production by *D. tertiolecta* were 27 to 29 °C and 0.7 to 0.8 M NaCl. Under test conditions, the greatest amounts of lipid, lutein,  $\beta$ -carotene and zeaxanthin obtained were, respectively,  $11.75 \pm 1.8 \%$ ,  $1315 \pm 36 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $732 \pm 51 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $244 \pm 76 \mu\text{g g}^{-1}$ .

**Keywords:** microalga, *Dunaliella tertiolecta*, airlift, carotenoid, lipids.

<sup>a</sup> *Bioprocess Engineering and Biotechnology, Bento Gonçalves Unit, State University of Rio Grande do Sul (UERGS), ZC 95700-000, Rua Benjamin Constant, 229, Bento Gonçalves, RS, Brazil*

<sup>b</sup> *Bioengineering Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), PO Box 15090 – ZC 91501-970, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>c</sup> *Chemical Engineering Department, School of Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), ZC 90040-040, Rua Luis Englert s/nº - Prédio 12204, Porto Alegre, RS, Brazil*

\* *Correspondence to: Rosane Rech, Tel.: +55 51 3308 6683; Fax: +55 51 3308 7048; E-mail: rrech@ufrgs.br*

## 4.1 Introduction

The potential of microalgae as a commercial source of carotenoids and polyunsaturated fatty acids is widely recognised (Derner *et al.*, 2006). Carotenoids, such as  $\beta$ -carotene, lutein and zeaxanthin have a wide variety of market applications: natural food colouring agent; components in cosmetics and health foods; diagnostics and biomedical research (Francavilla *et al.*, 2010). In addition to their colouring properties, the carotenoids are known to have several others biological functions, including the enhancement of pro-vitamin A activity, cancer-preventing effects, cardiovascular disease protective effects and the reduction of cataract risks and age-related macular degeneration (Del Campo *et al.*, 2000; Raja *et al.*, 2007). Additionally, *Dunaliella* cells are rich in lipids and antioxidants, can be used as food supplement or food additive (Tafreshi and Shariati, 2009).

Large-scale production of microalgae bio-products is controlled by several environmental parameters as salinity, temperature, light intensity and nutrient availability. The use of closed bioreactors provides controlled and aseptic conditions for cultivation and efficient light utilisation, resulting in a consistent product quality and high cell densities (Raja *et al.*, 2007).

*Dunaliella* is a unicellular green alga (Chlorophyta, Chlorophyceae), found from mixed and euryhaline to hypersaline waters (Francavilla *et al.*, 2010). The salt tolerance of *Dunaliella tertiolecta* has been reported to be up to 3 M of NaCl (Jahnke and White, 2003).

In this paper, we report the effects of two key physicochemical variables, temperature and medium salinity (without interference from high concentrations of nutrients, such as nitrogen and carbon dioxide), on the production of lutein,  $\beta$ -carotene, zeaxanthin and total lipids by *D. tertiolecta*. From the analysis of the results, we report the optimal conditions for maximising the formation of bio-products. We present and discuss profiles of obtained carotenoids (all-*trans* forms of lutein,  $\beta$ -carotene, zeaxanthin, neoxanthin, antheraxanthin and 9-*cis*- $\beta$ -carotene) as a function of growth conditions. Due to the expected increase in worldwide demand for these natural components, the findings of this study could lead to better industrial exploitation of *D. tertiolecta* biomass for carotenoid and lipid production.

## 4.2 Materials and Methods

### 4.2.1 Microorganism and culture medium

Marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* BE 003 was obtained from the culture collection of the Department of Marine Biology, Federal University Fluminense (Niterói, Rio de Janeiro, Brazil) and maintained in f/2 medium (Guillard, 1975).

### 4.2.2 Photobioreactor cultivation

The experiments were performed in flat-panel airlift photobioreactors (Kochem *et al.*, 2014). The aseptic photobioreactors were filled with 2.0 L of sterile f/2 medium and inoculated with 200 mL of algae pre-culture to a total 2.2 L working volume.

The cultures were performed in triplicate according to a central composite design at different temperatures (21 °C, 23 °C, 28 °C, 33 °C and 35 °C) and salinities (0.430 M, 0.513 M, 0.715 M, 0.917 M and 1.000 M). Different concentrations of NaCl were added to the medium to achieve the required salinity. The photobioreactors were continuously illuminated on the riser side at light intensity of 18 klx, and the airflow rate was kept at 0.5 L min<sup>-1</sup>. At the end of the experiment, the entire biomass content was centrifuged (3000 × g, 10 min) and lyophilised.

### 4.2.3 Biomass analysis

The carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur contents of lyophilised biomasses were analysed in duplicate using an elemental analyser (ELEMENTAR Analysensysteme BmbH, model VARIOEL V5 19.9.23, Hanau, Germany). The lipid content was determined by the weight difference before and after extraction with petroleum ether (at 135 °C) using Soxhlet equipment (Foss/Soxtec 2055TM, Hillerød, Denmark). The carotenoids were extracted from the freeze-dried biomass and analysed by HPLC as described previously (Mercadante and Rodriguez-Amaya, 1998; Zanatta and Mercadante, 2007; Chagas *et al.*, 2015). For quantification, calibration curves were constructed for  $\beta$ -carotene (5 – 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), lutein (1 – 65  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and zeaxanthin (1 – 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The carotenoid standards were acquired from Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). The limits of quantitation (LOQ) and detection (LOD) were respectively,  $10.89 \times 10^{-2} \mu\text{g g}^{-1}$  and  $6.53 \times 10^{-2} \mu\text{g g}^{-1}$  for  $\beta$ -carotene,  $1.15 \times 10^{-2} \mu\text{g g}^{-1}$  and  $6.9 \times 10^{-3} \mu\text{g g}^{-1}$  for lutein and  $1.59 \times 10^{-2} \mu\text{g g}^{-1}$  and  $9.56 \times 10^{-2} \mu\text{g g}^{-1}$  for zeaxanthin. Carotenoid quantification was performed by comparing the peak area of the sample with that of standards.

### 4.2.4 Statistical analysis

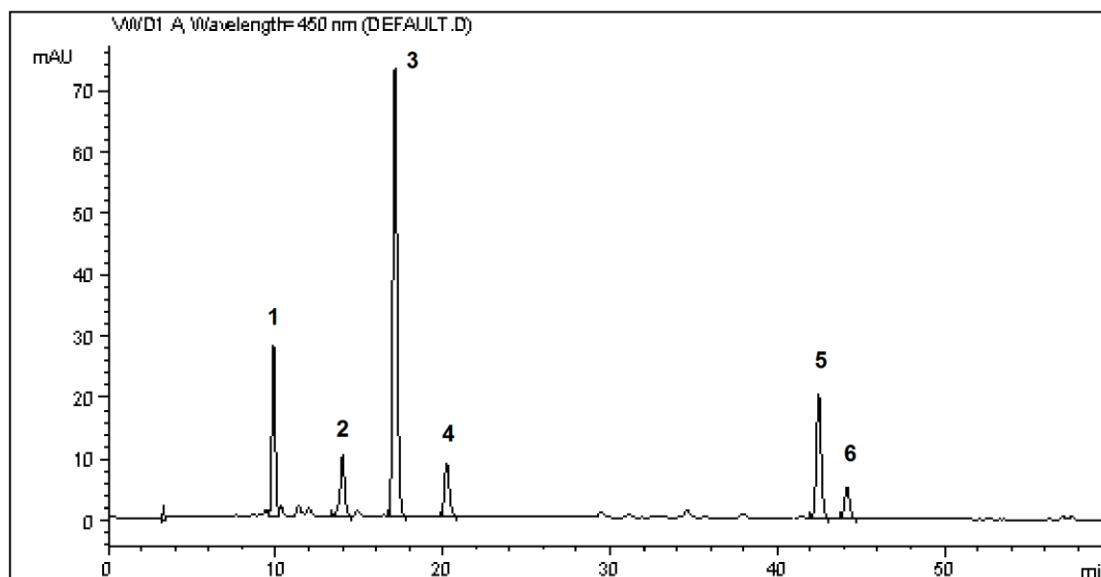
Experimental data were analysed using *Statistica* 12.0 software (StatSoft, Inc. Tulsa, United States). Experimental results were approximated by a quadratic polynomial equation (Equation 1):

$$Y = \beta_0 + \beta_T x_T + \beta_S x_S + \beta_{T^2} x_T^2 + \beta_{S^2} x_S^2 + \beta_{TS} x_T x_S, \quad (1)$$

where  $x_T$  and  $x_S$  are regression variables (temperature and salinity, respectively), and  $Y$  represents the dependent variable, in these cases, lipid,  $\beta$ -carotene, lutein or zeaxanthin contents. The symbols  $\beta_0$ ,  $\beta_T$ ,  $\beta_S$ ,  $\beta_T^2$ ,  $\beta_S^2$  and  $\beta_{TS}$  are regression coefficients of the model.

## 4.3 Results and Discussion

The carotenoid extract from *D. tertiolecta* showed six peaks as separated by HPLC (Figure 4.1 and Table 4.1). Peaks 3, 4 and 5 were all-*trans* forms of lutein, zeaxanthin and  $\beta$ -carotene, respectively. Peaks 1, 2 and 6 were identified based on the wavelengths of maximum absorption ( $\lambda_{\text{max}}$ ) and spectral fine structural values (% III/II). The data agreed well with those of the literature for all-*trans*-neoxanthin, all-*trans*-antheraxanthin and 9-*cis*- $\beta$ -carotene, respectively (De Rosso and Mercadante, 2007; Hu *et al.*, 2008).



**Figure 4.1:** HPLC chromatogram of carotenoid extract from *Dunaliella tertiolecta*. Peak identification: (1) all-*trans*-neoxanthin, (2) all-*trans*-antheraxanthin, (3) all-*trans*-lutein, (4) all-*trans*-zeaxanthin, (5) all-*trans*- $\beta$ -carotene, (6) 9-*cis*- $\beta$ -carotene.

**Table 4.1:** Assignment data for carotenoids in *Dunaliella tertiolecta*.

Peak number	Compound	Retention time (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	% III/II
1	all- <i>trans</i> -neoxanthin	9.9	415 438 468	85
2	all- <i>trans</i> -antheraxanthin	14.0	420 444 472	50
3	all- <i>trans</i> -lutein	17.1	418 443 471	60
4	all- <i>trans</i> -zeaxanthin	20.2	425 449 475	30
5	all- <i>trans</i> - $\beta$ -carotene	42.5	421 451 476	20
6	9- <i>cis</i> - $\beta$ -carotene	44.2	423 445 472	28

$\lambda_{\max}$ : wavelengths of maximum absorption, % III/II: spectral fine structural value.

Members of the *Dunaliella* genera contain valuable carotenoid pigments such as  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene, violaxanthin, neoxanthin, zeaxanthin and lutein (Tafreshi and Shariati, 2009). The absence of violaxanthin and the presence of the antheraxanthin and zeaxanthin in our *D. tertiolecta* extract can be explained by the xanthophyll cycle. Xanthophylls are essential for light-dependent growth. These molecules possess various functions in photosynthetic organisms, mainly the protection against photo-oxidative damage. When light absorption exceeds photochemical utilisation, the xanthophyll cycle in higher plants and green algae consists of the conversion of violaxanthin via a de-epoxidation reaction to form antheraxanthin and subsequently, zeaxanthin resulting in the accumulation of zeaxanthin. In darkness or when light absorption is no longer in excess, antheroxanthin is converted to violaxanthin through reverse epoxidation. Thus, the xanthophyll cycle is a dynamically

regulated reversible interconversion of violaxanthin to antheraxanthin to zeaxanthin; it occurs in the thylakoid membrane of photosynthetic cells and plays a role in photoprotection (Long *et al.*, 1994; Jin *et al.*, 2003). Formation of both antheraxanthin and zeaxanthin is closely associated with the use of continuous light in our experiments and the consequent irradiative stress in cells.

The carotenoids lutein and  $\beta$ -carotene were the major carotenoids accumulated under the assayed conditions. Under the test conditions, the highest amount of lutein,  $\beta$ -carotene and zeaxanthin attained in dry biomass were, respectively,  $1315 \pm 36 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $732 \pm 51 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $244 \pm 76 \mu\text{g g}^{-1}$ , at 93 h of culture.

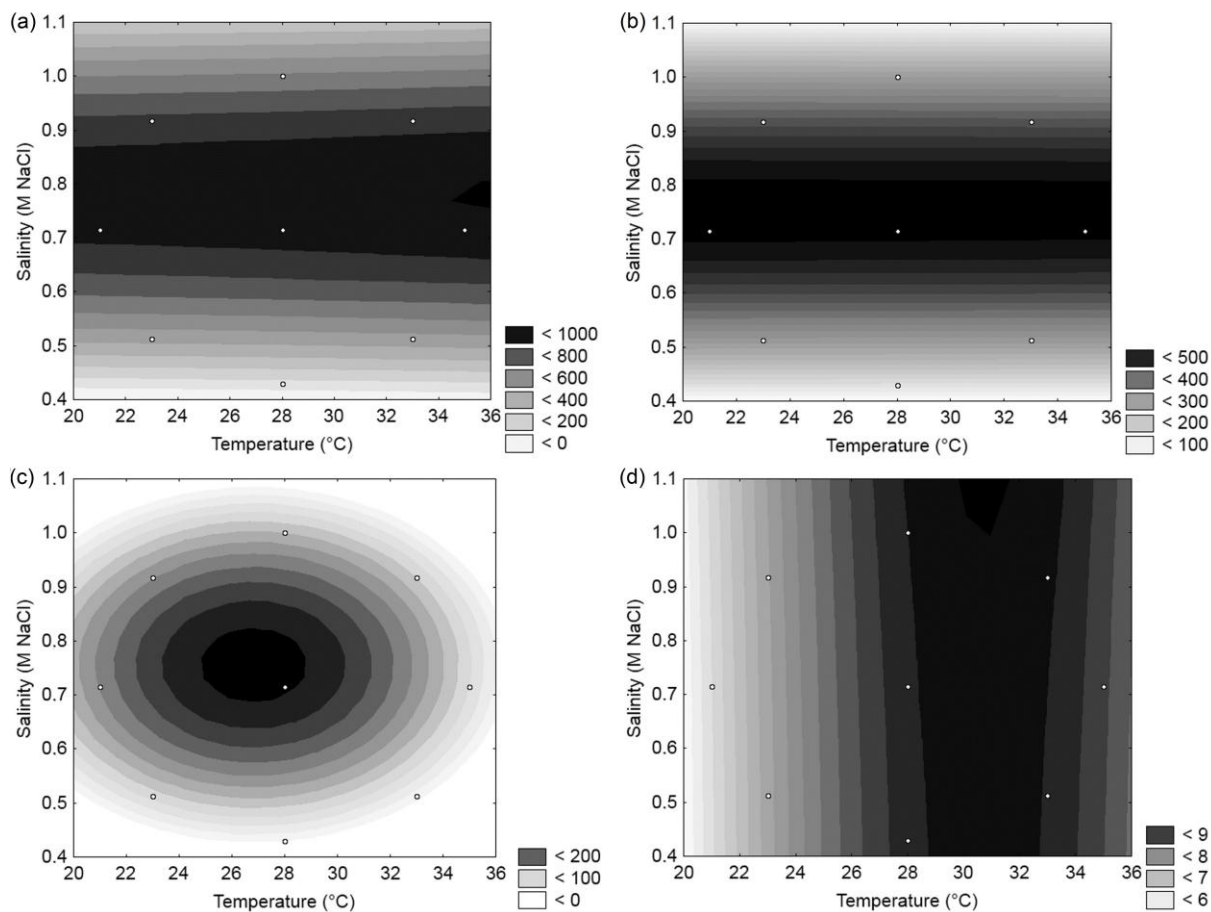
The statistical analysis shows that both salinity and temperature affected the amounts of lutein, zeaxanthin and  $\beta$ -carotene produced by *D. tertiolecta* (Table 4.2). Response surfaces for lutein (Figure 4.2a) and  $\beta$ -carotene (Figure 4.2b) show that salinity had a strong effect on these carotenoids. The highest  $\beta$ -carotene content occurred between 0.7 and 0.8 M NaCl. The effect of temperature on the amount of  $\beta$ -carotene was negligible. The highest lutein content occurred at a salinity range slightly higher, between 0.70 and 0.85 M NaCl. The increase in the cultivation temperature slightly increased the lutein content. The response surface for zeaxanthin (Figure 4.2c) shows that salinity and temperature had a strong effect on the amount of zeaxanthin. The highest zeaxanthin content occurred between 0.7 and 0.8 M NaCl and between 26 °C and 28 °C, and the maximum point occurred at 0.756 M NaCl and 26.8 °C.

**Table 4.2:** Values of the regression coefficients of the coded variables and regression parameters for the amount of lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -carotene and total lipids at 93 h of cultivation of *Dunaliella tertiolecta*.

	Lutein ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		Zeaxanthin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		$\beta$ -carotene ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		Lipids (%)	
	Coefficient	<i>p</i> -value	Coefficient	<i>p</i> -value	Coefficient	<i>p</i> -value	Coefficient	<i>p</i> -value
$\beta_0$	1310.554	0.0000	243.578	0.0000	631.860	0.0000	11.767	0.0000
$\beta_T$	-	-	-29.075	0.0336	-	-	0.8929	0.0040
$\beta_{T^2}$	-248.510	0.0172	-62.399	0.0089	-77.812	0.0881	-2.0071	0.0001
$\beta_S$	193.794	0.0013	35.275	0.0077	59.912	0.0474	-	-
$\beta_{S^2}$	-467.950	0.0001	-86.795	0.0006	-200.270	0.0002	-1.9194	0.0001
$\beta_{TS}$	-	-	-	-	-	-	-	-
Regression								
<i>p</i> -value	< 0.0001		0.0011		0.0005		< 0.0001	
F	14.75		8.1		9.88		15.3	
$R^2$	0.735		0.682		0.622		0.754	
<i>LOF</i> *	0.386		0.8644		0.1044		0.6867	

\* *p*-value of lack of fit





**Figure 4.2:** Response surfaces for the amounts of: (a) lutein ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), (b)  $\beta$ -carotene ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), (c) zeaxanthin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), (d) total lipids (%) at 93 h of culture as functions of the temperature and salinity.

There are studies that have investigated the production of  $\beta$ -carotene from *D. tertiolecta*, but few have examined the influence of physicochemical properties of the medium on the production of lutein and zeaxanthin. Unlike the results of this work, *D. tertiolecta* DCCBC26 increased the total carotenoid content in the biomass when NaCl was increased from 0.5 M to 3 M (Fazeli *et al.*, 2006). Studies on *D. tertiolecta* CCAP 19/6B also showed that the lutein content in the biomass was about twice the  $\beta$ -carotene content (Barbosa *et al.*, 2005), similar to the results of this work.

Regarding the total lipid content in *D. tertiolecta*, temperature showed the strongest effect and the highest lipid content occurred at a temperature range between 28 °C and 32 °C. The increase in the medium salinity slightly increased the lipid content (Table 4.2, Figure 4.2d).

The highest experimental value of total lipid content ( $11.8 \pm 1.8$  %) was achieved in cultures performed at 28 °C and 0.715 M NaCl. In another work, *D. tertiolecta* SAG-13.86 presented a very similar lipid content ( $11.4 \pm 1.8$  %) (Sydney *et al.*, 2010). A review paper on

the hydrothermal catalytic production of fuels and chemicals from aquatic biomass provides different lipid contents for different algae, ranging between 2 % and 22 % of dry matter, with a 6 % lipid content for *D. salina* (Becker, 2007).

Temperature and salinity showed no significant effect on *D. tertiolecta* elemental composition. Average values of carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur content of all experiments were  $41.19 \pm 0.78$  %,  $3.48 \pm 0.06$  %,  $1.55 \pm 0.21$  %,  $0.36 \pm 0.04$  %, respectively. Shuping *et al.* (2010) found similar results for carbon (39 %), hydrogen (5.37 %) and nitrogen (1.99 %), while Sydney *et al.* (2010) found a carbon content of 36 %, both for *D. tertiolecta* biomasses.

## 4.4 Conclusions

The experiments performed in this work showed that the physicochemical variables temperature and medium salinity strongly affected biomass composition during *D. tertiolecta* BE 003 growth. Temperature had a strong effect on the total lipid content, while medium salinity had a weaker effect on lipid content. However, medium salinity affected the concentration of the main carotenoids of *D. tertiolecta* biomass (lutein and  $\beta$ -carotene). Neither the temperature nor the salinity showed significant effect on *D. tertiolecta* elemental composition. These results show the importance of systematic studies on the effects of environmental factors on the microalgal growth parameters and biomass composition.

## 4.5 Acknowledgements

The authors wish to thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Coal National Network (RNC, [http://www.ufrgs.br/rede\\_carvao](http://www.ufrgs.br/rede_carvao)) and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support.

## 4.6 References

BARBOSA, M. J.; ZIJFFERS, J. W.; NISWORO, A.; VAES, W.; VAN SCHOONHOVEN, J.; WIJFFELS, R. H. Optimization of biomass, vitamins, and carotenoid yield on light energy in a flat-panel reactor using the A-stat technique. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 89, n. 2, p. 233-242, 2005.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007.

- CHAGAS, A. L.; RIOS, A. O.; JARENKOW, A.; MARCÍLIO, N. R.; AYUB, M. A. Z.; RECH, R. Production of carotenoids and lipids by *Dunaliella tertiolecta* using CO<sub>2</sub> from beer fermentation. *Process Biochemistry*, v. 50, n. 6, p. 981-988, 2015.
- DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 9135-9141, 2007.
- DEL CAMPO, J. A.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, H.; ANGELES VARGAS, M.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, v. 76, n. 1, p. 51-59, 2000.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; DE CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- FAZELI, M. R.; TOFIGHI, H.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H. Effects of salinity on  $\beta$ -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 18, p. 2453-2456, 2006.
- FRANCAVILLA, M.; TROTTA, P.; LUQUE, R. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 11, p. 4144-4150, 2010.
- GUILLARD, R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: SMITH, W. e CHANLEY, M. (Ed.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*: Springer US, 1975. chap. 3, p. 29-60.
- HU, C.; LIN, J.; LU, F.; CHOU, F.; YANG, D. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, v. 109, n. 2, p. 439-446, 2008.
- JAHNKE, L. S.; WHITE, A. L. Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Plant Physiology*, v. 160, n. 10, p. 1193-1202, 2003.
- JIN, E.; FETH, B.; MELIS, A. A mutant of the green alga *Dunaliella salina* constitutively accumulates zeaxanthin under all growth conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 81, n. 1, p. 115-124, 2003.
- KOCHEM, L. H.; DA FRÉ, N. C., REDAELLI, C., RECH, R.; MARCÍLIO, N. R. Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. *Chemical Engineering & Technology*, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014.
- LONG, S. P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P. G. Photoinhibition of Photosynthesis in Nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 45, p. 633-662, 1994.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Effects of Ripening, Cultivar Differences, and Processing on the Carotenoid Composition of Mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 1, p. 128-130, 1998.

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S.; RENGASAMY, R. Exploitation of *Dunaliella* for  $\beta$ -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, n. 3, p. 517-523, 2007.

SHUPING, Z.; YULONG, W.; MINGDE, Y.; KALEEM, I.; CHUN, L.; TONG, J. Production and characterization of bio-oil from hydrothermal liquefaction of microalgae *Dunaliella tertiolecta* cake. *Energy*, v. 35, n. 12, p. 5406-5411, 2010.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; DE CARVALHO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 15, p. 5892-5896, 2010.

TAFRESHI, A. H.; SHARIATI, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, n. 1, p. 14-35, 2009.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007.

## **Capítulo 5**

### **Artigo 2 - Carotenoid and lipid content of *Dunaliella tertiolecta* cultured at different nitrogen concentrations, light intensities and stress conditions**

Este artigo foi submetido para publicação no periódico *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*.

## Carotenoid and lipid content of *Dunaliella tertiolecta* cultured at different nitrogen concentrations, light intensities and stress conditions

Nicéia Chies Da Fré,<sup>a,c</sup> Rosane Rech,<sup>b\*</sup> Nilson Romeu Marcílio<sup>c</sup>

### Abstract

The marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* is a unicellular photosynthetic microorganism that can produce both carotenoids and lipids under a combination of controlled environmental conditions, such as light intensity, nitrogen availability and medium salinity. This study investigated the effects of the culture conditions during cultivation and after the log growth phase on the biomass and lipid and carotenoid contents of *D. tertiolecta* cultured in a flat-panel airlift photobioreactor. A light intensity of 17.5 klx and initial NaNO<sub>3</sub> concentration of 300 mg L<sup>-1</sup> resulted in the highest lipid, carotenoid and biomass productivities during the exponential growth phase. After the exponential growth phase, the stress conditions, such as high light intensity and high medium salinity, did not result in increased carotenoid or lipid contents in the biomass.

**Keywords:** microalgae, *Dunaliella tertiolecta*, airlift, photobioreactor, carotenoids, lipid.

<sup>a</sup> Bioprocess Engineering and Biotechnology, Bento Gonçalves Unit, State University of Rio Grande do Sul (UERGS), ZC 95700-000, Rua Benjamin Constant, 229, Bento Gonçalves, RS, Brazil

<sup>b</sup> Bioengineering Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), PO Box 15090 – ZC 91501-970, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Chemical Engineering Department, School of Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), ZC 90040-040, Rua Luis Englert s/nº - Prédio 12204, Porto Alegre, RS, Brazil

\*Correspondence to: Rosane Rech, Tel.: +55 51 3308 6683; Fax: +55 51 3308 7048; E-mail: rrech@ufrgs.br

## 5.1 Introduction

The genus *Dunaliella* can accumulate significant amounts of valuable fine chemicals, such as carotenoids, vitamins, lipids, glycerol, minerals and proteins, under certain environmental conditions.<sup>1</sup> Lipids from microalgae are useful for several applications, including as biodiesel, feedstock for the chemical industry or  $\omega$ -3 fatty acids for the food industry. The potential of microalgae as a commercial source of carotenoids is also widely recognized.<sup>2-9</sup> Regulations on the use of synthetic dyes in the food industry are currently very stringent, stimulating research and development on the production and use of carotenoids from microalgae as food additives, including as colorants, antioxidants and vitamins. Carotenoids also have applications in the cosmetic and pharmaceutical industries. Their ability to protect against oxygen free radicals has resulted in their use in some therapeutic

applications as degenerative disease preventives, anti-cancer agents, and immune system stimulators.<sup>10-13</sup>

Microalga growth parameters and metabolic products are affected by a combination of environmental parameters, such as medium salinity, nutrients and light availability.<sup>14</sup> The latter is one of the most challenging factors controlling the growth rate in any algal system.<sup>15,16</sup> When algal cells grow in photobioreactors, the light supply decreases rapidly with the culture depth and cell concentration. Away from the irradiated surface, the cells will receive less light because of mutual shading, decreasing their photosynthetic activity. In contrast, high light intensities may cause a decrease in growth rate because of the photoinhibition effect.<sup>17,18</sup>

Stress conditions generally lead to a high production of metabolites but low growth rates. *Dunaliella salina* produces large amounts of carotenoids at extreme salt concentrations.<sup>19</sup> The carotenoid content in *Dunaliella bardawil* may also be a response to excess irradiance because carotenoids are effective singlet oxygen quenchers that are able to eliminate activate oxygen radicals.<sup>20</sup> Nitrogen depletion results in high lipid accumulation but decreases the cell concentration of *D. tertiolecta*.<sup>21</sup>

The optimal conditions for high growth rates and metabolite productivities vary significantly among different types of algae. Therefore, systematic studies are needed to understand the relationship between the culture parameters that led to high cell concentrations combined with high carotenoid and lipid contents in the biomass. This work determined the effects of the light intensity and nitrogen availability on *D. tertiolecta* growth and the lipid and carotenoid contents in the biomass. We also report on the response of *D. tertiolecta* cells to light and salt stress, which were applied at the end of the exponential growth phase.

## 5.2 Materials and Methods

### 5.2.1 Microorganism and pre-cultures

The marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* BE 003 was obtained from the culture collection of the Department of Marine Biology, Federal University Fluminense (Niterói, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and maintained in f/2 medium.<sup>22</sup>

The pre-cultures were grown in a rotatory shaker at  $28 \pm 1$  °C under continuous illumination of 5.8 klx provided by a fluorescent lamp (30 W cool light) for 12 days. Homogeneous aliquots of 10 mL of culture from germination camera were inoculated in 500-mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of modified f/2 medium<sup>23,24</sup> consisting of distilled water, 34 g L<sup>-1</sup> natural sea salt (Red Sea, Houston, TX, USA), 16.5 g L<sup>-1</sup> NaCl, 75 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, 5 mg L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O, 30 mg L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O, 1 mL L<sup>-1</sup> of a trace elements solution (9.8 mg L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 22 mg L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 180 mg L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 6.3 mg L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 4.36 mg L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA and 3.15 mg L<sup>-1</sup>

FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O), and 1 mL L<sup>-1</sup> of a vitamin solution (100 mg L<sup>-1</sup> Thiamine, 0.5 mg L<sup>-1</sup> cyanocobalamin and 0.5 mg L<sup>-1</sup> Biotin). The pH of the medium was adjusted to 7.2 via the addition of 40 mM Tris-buffer. The culture medium was sterilized at 121 °C for 15 min, except for the vitamin solution, which was sterilized by filtering through a 0.22-μm membrane (Millipore, Barueri, SP, Brazil).

### 5.2.2 Photobioreactor cultivation

The experiments were performed in flat-panel-airlift photobioreactors.<sup>25</sup> The reactors were sterilized with 10 mL L<sup>-1</sup> of a commercial solution of sodium hypochlorite (2.5 %) for 15 min. The chlorine was neutralized with 2.5 mL L<sup>-1</sup> of sodium thiosulfate solution (250 g L<sup>-1</sup>). The photobioreactors were filled with 2.0 L of sterile culture medium and inoculated with 200 mL of algae pre-culture, totaling 2.2 L of working volume. The temperature was kept at 28 °C. The photobioreactors were continuously illuminated on the riser side by a panel of electronic lamps (24 × 13 W cool light). The light intensity was monitored by a digital light meter (MS6610, Akso, São Leopoldo, RS, Brazil). The light intensity and culture medium varied depending on the experiment. All experiments were performed in duplicate.

Samples were periodically withdrawn for determination of the pH and biomass. The samples were centrifuged (16000 × g, 5 min) and the supernatant and pellet were stored (-18 °C) separately to determine the nitrates and total carotenoids, respectively. At the end of the experiment, the entire biomass content was centrifuged (3000 × g, 10 min) and lyophilized.

### 5.2.3 Effect of light intensity

The experiments were performed in the modified f/2 medium, as described above. The photobioreactors were continuously illuminated on the riser side at different light intensities (2.5 klx, 10.0 klx, 17.5 klx or 24.0 klx). The airflow rate was kept at 0.5 L min<sup>-1</sup> of compressed filtered air (0.22 μm / Midisart<sup>®</sup>2000 / Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, NS, Germany) using a rotameter.

### 5.2.4 Effect of nitrogen concentration

The experiments were performed by increasing the nitrogen concentration in the culture medium described earlier (75 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>). Three different NaNO<sub>3</sub> concentrations (300 mg L<sup>-1</sup>, 600 mg L<sup>-1</sup> and 900 mg L<sup>-1</sup>) were tested at a continuous light intensity of



17.5 klx. The photobioreactors were aerated at 0.5 mL L<sup>-1</sup> of CO<sub>2</sub>-enriched air. The CO<sub>2</sub> concentration ranged between 1 % and 2 % to maintain the culture pH between 7.5 and 8.5.

### 5.2.5 Effect of stress conditions in the stationary growth phase

The experiments were performed in modified f/2 medium (using 16.5 g L<sup>-1</sup> of NaCl and 300 mg L<sup>-1</sup> of NaNO<sub>3</sub>) at a light intensity of 17.5 klx. The photobioreactors were aerated with CO<sub>2</sub>-enriched air as described above. After 140 h of cultivation, the cultures were subjected to salt stress by adding concentrated NaCl solution (5 M) and/or light stress by increasing the light intensity (Table 5.1).

**Table 5.1:** Salt and light intensity of the stress conditions.

Stress condition	NaCl (M)	Light (klx)
none	0.715	17.5
salt	1.215	17.5
light	0.715	30.0
salt and light	1.215	30.0

### 5.2.6 Analytical determinations

The biomass concentrations were determined by the optical density at 750 nm and correlated to the dry cell weight. The pH was measured using a pH indicator strip (Alkalit®, Merck, Darmstadt, HE, Germany).

The total carotenoid contents ( $C_{Ct}$ ) were determined spectrophotometrically by extracting cell pellets with acetone (Synth, Diadema, SP, Brazil) and measuring the absorbances at 661.6 nm, 644.8 nm and 470 nm. The turbidity was determined by measuring the absorbances at 750 nm and 520 nm.<sup>26</sup> The concentrations of chlorophyll-a ( $C_{Chla}$ ), chlorophyll-b ( $C_{Chlb}$ ) and total carotenoids ( $C_{Ct}$ ) of the cells were calculated using the following equations,<sup>27</sup> where the pigment concentrations are given in milligrams per liter of extract solution (mg L<sup>-1</sup>).

$$C_{Chla} = 11.24 \cdot A_{661.6} - 2.04 \cdot A_{644.8} \quad (1)$$

$$C_{Chlb} = 20.13 \cdot A_{644.8} - 4.19 \cdot A_{661.6} \quad (2)$$

$$C_{Ct} = (1000 \cdot A_{470} - 1.90 \cdot C_{Chla} - 63.14 \cdot C_{Chlb}) / 214 \quad (3)$$

The lipid content was determined in the lyophilized biomass via extraction with petroleum ether (135 °C) using Soxhlet equipment (Foss/Soxtec 2055<sup>TM</sup>, Hillerød, Denmark).

The sodium nitrate concentration was determined using a colorimetric test (Mydor<sup>TM</sup>, Ft. Lauderdale, FL, United States) at 517 nm and correlated to a standard curve.

### 5.2.7 Statistical analysis

The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test at the significance level of 5 % using *Statistica* 12.0 software (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, United States).

## 5.3 Results and Discussion

### 5.3.1 Effect of light intensity

*D. tertiolecta* was grown using four different light intensities (Table 5.2). The experiments performed at the highest light intensities (17.5 klx and 24.0 klx) showed the highest biomass concentration and productivities, and the highest specific growth rate. The light intensity of 2.5 klx limited the microalgae growth and yielded the lowest biomass concentration and biomass productivity, being only 20 % of the highest productivities. However, the biomass grown at 2.5 klx showed the highest carotenoid content, 65 % higher than the carotenoid content of the biomass grown at the highest light intensities. The low light intensity seems to stimulate carotenoid synthesis by *D. tertiolecta* to increase light uptake by the cells. The increase in the light intensity from 2.5 klx to 17.5 klx increased the biomass concentration, specific growth rate and biomass productivity but decreased the carotenoid content in the biomass. A further increase in the light intensity above 17.5 klx did not affect the *D. tertiolecta* growth and composition. The light intensity showed no effect on the lipid content. Tang *et al.*<sup>15</sup> studied the growth of *D. tertiolecta* in shake flasks with fluorescent light under three levels of light intensity (100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 350  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , corresponding to approximately 8.3 klx, 16.7 klx and 29.2 klx, respectively). The lowest light intensity yielded the lowest biomass concentration, and there were no significant differences in the fatty acid methyl ester contents based on the dry cell weights.

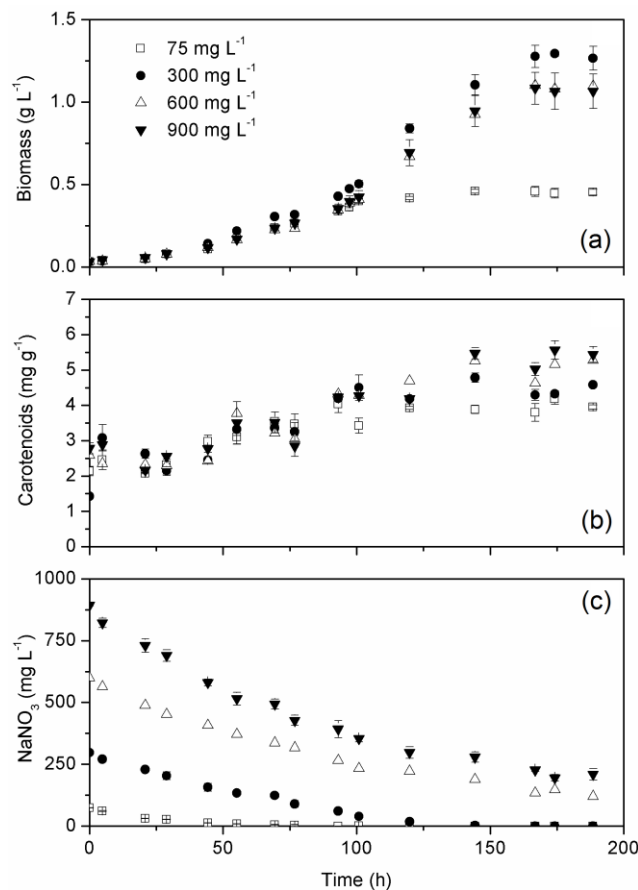
**Table 5.2:** Growth of *Dunaliella tertiolecta* cultivated at different light intensities ( $I$ ). Biomass ( $X$ ), maximum specific growth rate ( $\mu_m$ ), carotenoid content ( $C_{Ct}$ ), lipid content ( $L$ ), biomass productivity ( $P_X$ ), carotenoid productivity ( $P_C$ ), and lipid productivity ( $P_L$ ).

$I$ (klx)	$X$ (g L <sup>-1</sup> )	$\mu_m$ (d <sup>-1</sup> )	$C_{Ct}$ (mg g <sup>-1</sup> )	$L$ (mg g <sup>-1</sup> )	$P_X$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	$P_C$ (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	$P_L$ (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
2.5	0.12 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>c</sup>	4.35 ± 0.10 <sup>a</sup>	111.5 ± 7.0 <sup>a</sup>	0.021 ± 0.004 <sup>c</sup>	0.133 ± 0.004 <sup>c</sup>	3.51 ± 0.21 <sup>c</sup>
10.0	0.34 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.76 ± 0.01 <sup>b</sup>	3.13 ± 0.10 <sup>b</sup>	98.0 ± 8.9 <sup>a</sup>	0.080 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.275 ± 0.003 <sup>b</sup>	8.62 ± 0.95 <sup>b</sup>
17.5	0.45 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.77 ± 0.02 <sup>bc</sup>	117.9 ± 2.8 <sup>a</sup>	0.107 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.322 ± 0.006 <sup>a</sup>	16.74 ± 0.78 <sup>a</sup>
24.0	0.43 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.64 ± 0.08 <sup>c</sup>	87.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.105 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.296 ± 0.006 <sup>ba</sup>	9.77 ± 0.16 <sup>b</sup>

\* Different letters in the same columns are significantly different as determined by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.3.2 Effect of the nitrogen concentration

The effect of the nitrogen concentration was evaluated by comparing the results of the standard NaNO<sub>3</sub> concentration of f/2 medium (75 mg L<sup>-1</sup>) with three other concentrations: 300 mg L<sup>-1</sup>, 600 mg L<sup>-1</sup> and 900 mg L<sup>-1</sup>. The NaNO<sub>3</sub> concentration affected the growth parameters and biomass composition of *D. tertiolecta*. While cell growth ceased after approximately 100 h of culture in the NaNO<sub>3</sub> 75 mg L<sup>-1</sup> culture, the biomass continued to increase until approximately 140 h in the cultures with higher NaNO<sub>3</sub> concentrations (Figure 5.1a). The biomass increased by almost three times in the cultures performed with 300 mg L<sup>-1</sup> of sodium nitrate, compared to cultures performed with the standard nitrate concentration of f/2 medium (Table 5.3). However, increases in the NaNO<sub>3</sub> concentration above 300 mg L<sup>-1</sup> did not result in further increases in the final biomass concentration even though nitrogen was still available in the cultures with 600 mg L<sup>-1</sup> and 900 mg L<sup>-1</sup> of NaNO<sub>3</sub>, indicating that another nutrient or light was responsible for the biomass stabilization (Figure 5.1c). In another study, high nitrate concentrations also did not result in increases in the biomass. *D. salina* and *Dunaliella* sp. were cultivated using KNO<sub>3</sub> as the nitrogen source at concentrations of 1 mM, 3 mM, 5 mM or 7 mM. The maximum biomass concentrations of *Dunaliella* sp. (1.2 g L<sup>-1</sup>) and *D. salina* (2.7 g L<sup>-1</sup>) were achieved with 3 mM KNO<sub>3</sub> (303 mg L<sup>-1</sup>). The concentration of 1 mM was insufficient for cell growth, but concentrations higher than 3 mM KNO<sub>3</sub> did not improve biomass production.<sup>28</sup>



**Figure 5.1:** (a) Biomass ( $\text{g L}^{-1}$ ), (b) total carotenoid content ( $\text{mg g}^{-1}$ ), (c)  $\text{NaNO}_3$  concentration in the culture medium ( $\text{mg L}^{-1}$ ) of *Dunaliella tertiolecta* cultivated in FPA-IHE photobioreactors with different initial  $\text{NaNO}_3$  concentrations.

**Table 5.3:** Growth parameters of *Dunaliella tertiolecta* cultivated at different initial  $\text{NaNO}_3$  concentrations. Biomass ( $X$ ), maximum specific growth rate ( $\mu_m$ ), carotenoid content ( $C_{Cr}$ ), lipid content ( $L$ ), biomass productivity ( $P_X$ ), carotenoid productivity ( $P_C$ ), and lipid productivity ( $P_L$ ).

$\text{NaNO}_3$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$X$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	$\mu_m$ ( $\text{d}^{-1}$ )	$C_{Cr}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$L$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$P_X$ ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	$P_C$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	$P_L$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )
75	$0.45 \pm 0.02^b$	$0.56 \pm 0.00^b$	$3.95 \pm 0.06^b$	$113.2 \pm 0.8^a$	$0.057 \pm 0.004^c$	$0.228 \pm 0.006^b$	$6.53 \pm 0.22^b$
300	$1.27 \pm 0.07^a$	$0.66 \pm 0.02^a$	$4.58 \pm 0.03^{ab}$	$103.3 \pm 3.4^a$	$0.176 \pm 0.005^a$	$0.738 \pm 0.038^a$	$16.68 \pm 1.50^a$
600	$1.10 \pm 0.00^a$	$0.57 \pm 0.00^b$	$5.28 \pm 0.00^a$	$78.0 \pm 0.0^b$	$0.123 \pm 0.000^b$	$0.737 \pm 0.000^a$	$10.89 \pm 0.00^{ab}$
900	$1.07 \pm 0.10^a$	$0.55 \pm 0.00^b$	$5.44 \pm 0.23^a$	$82.3 \pm 2.2^b$	$0.133 \pm 0.006^b$	$0.735 \pm 0.042^a$	$11.20 \pm 1.40^{ab}$

\* Different letters in the same columns are significantly different as determined by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

High nitrate concentrations have been reported to trigger biomass growth, whereas nitrogen deficiency has been reported to increase the lipid contents in cells.<sup>21, 29</sup> This behavior

was observed for *D. tertiolecta* in our study, where the lipid content in the biomass was significantly lower in the cultures where nitrogen was not entirely consumed during cell growth (Table 5.3).

The carotenoid contents in the cells increased during the growth (Figure 5.1b). However, unlike the lipid content, the carotenoid content at the end of the culture was higher in the cultures with the high nitrate concentrations (600 mg L<sup>-1</sup> and 900 mg L<sup>-1</sup> of NaNO<sub>3</sub>). According to previous reports on *D. salina*, the results indicate that carotenoid and lipid accumulation were unrelated.<sup>30</sup> However, unlike our results obtained from *D. tertiolecta*, the results obtained by Lamers *et al.*<sup>30</sup> demonstrated what the intracellular concentration of the total fatty acid pool did not change significantly during nitrogen starvation, and the production of β-carotene was low at nitrogen-replete steady-state conditions but began to increase immediately after all residual nitrogen was depleted.

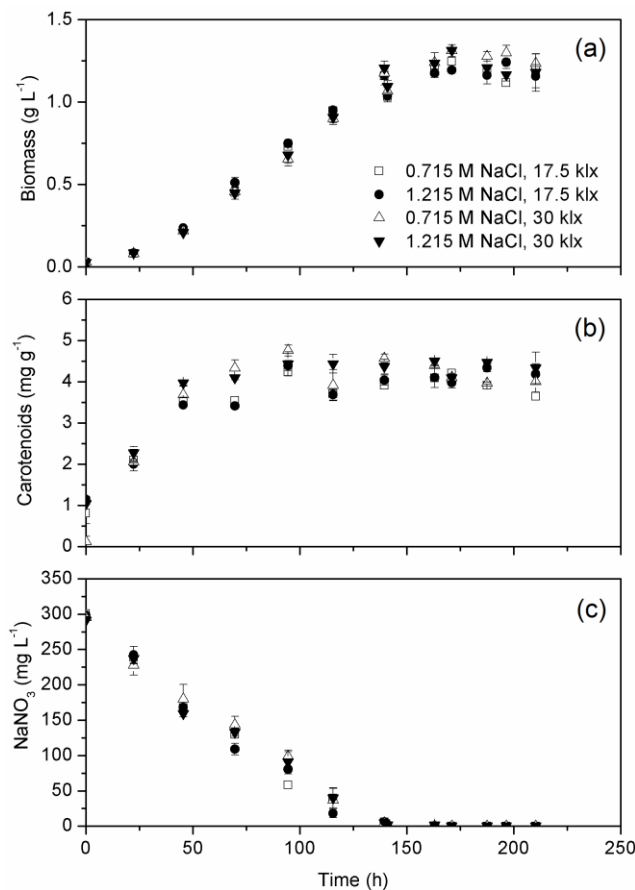
The increase in the nitrogen concentration from 75 mg L<sup>-1</sup> to 300 mg L<sup>-1</sup> also increased the specific growth rate and biomass, carotenoid and lipid productivities. The specific growth rate was at least 16 % higher in the cultures with 300 mg L<sup>-1</sup> in relation to the other cultures. Moreover, the cultures with 300 mg L<sup>-1</sup> showed the highest biomass and lipid productivities, 32 % and 49 % higher, respectively, than the productivities of the cultures with the highest NaNO<sub>3</sub> concentrations. The carotenoid productivities in the NaNO<sub>3</sub>-enriched cultures were similar but 3.2 times higher than that of the NaNO<sub>3</sub> 75 mg L<sup>-1</sup> culture (Table 5.3).

The culture with the initial NaNO<sub>3</sub> concentration of 300 mg L<sup>-1</sup> showed the highest specific growth rate and biomass, carotenoid and lipid contents, as well as the highest biomass, carotenoid and lipid productivities; therefore, this culture is considered suitable for cell growth and the concomitant production of carotenoids and lipids. In this particular culture, the high NaNO<sub>3</sub> initial concentration increased the carotenoid and biomass content, and N-depletion after 140 h of cultivation promoted the high lipid content.

### 5.3.3 Effect of the stress conditions

Several strategies have been used to maximize the yield of carotenoids and lipids by microalgae, including high salinities, low nutrient levels combined with high irradiance.<sup>1, 2, 17, 19, 30</sup> Thus, the effects of the stress conditions (salinity and light intensity) were evaluated after the cell growth. Initially, cultures were grown using the optimized growth conditions determined earlier (300 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, 17.5 klx). Near the end of the exponential growth phase (140 h), the cultures were subjected to salt stress (1.215 M NaCl) and/or light stress (30.0 klx) for 210 h of cultivation (Figure 5.2). The use of the initial concentration of 300 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> ensured N-depletion after 140 h of culture (Figure 5.2c). The stress conditions did not affect the biomass and carotenoid contents; however, the lipid content in the biomass was affected by both the salinity and the light intensity ( $p < 0.001$ ; Table 5.4). Comparing these results with the biomass, carotenoid and lipid contents at the end of

exponential growth phase in the same culture conditions,  $1.27 \text{ g L}^{-1}$ ,  $4.58 \text{ mg g}^{-1}$  and  $103.3 \text{ mg g}^{-1}$ , respectively (Table 5.3), one can conclude that stress conditions not only did not increase the carotenoid content but also significantly reduced the lipid content. As shown in Figure 5.3, the lipid content decreased at low light intensities and high salinities ( $R^2 = 0.989$ ).



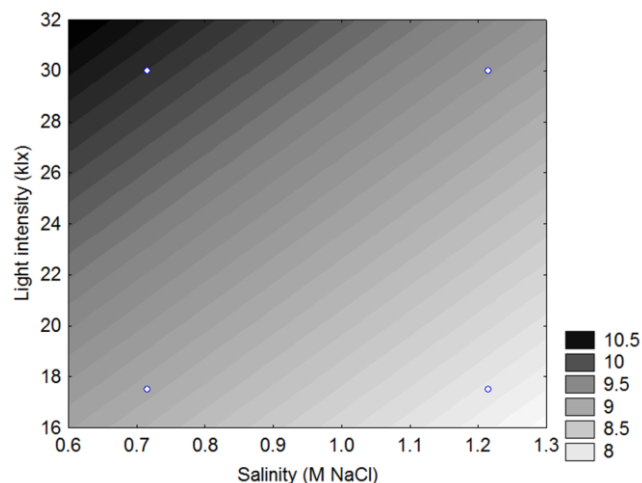
**Figure 5.2:** (a) Biomass ( $\text{g L}^{-1}$ ), (b) total carotenoid content ( $\text{mg g}^{-1}$ ), (c)  $\text{NaNO}_3$  concentration in the culture medium ( $\text{mg L}^{-1}$ ) of *Dunaliella tertiolecta* cultivated in FPA-IHE photobioreactors under stress conditions (salinity and light intensity).

**Table 5.4:** Biomass ( $X$ ), carotenoid content ( $C_{Ci}$ ), and lipid content ( $L$ ) of *Dunaliella tertiolecta* cultivated under the stress conditions (salinity and light intensity).

Stress condition		$X$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	$C_{Ci}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$L$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )
NaCl (M)	Light (klx)			
0.715	17.5	$1.19 \pm 0.00^a$	$3.64 \pm 0.00^a$	$89.3 \pm 1.3^b$
1.215	17.5	$1.16 \pm 0.07^a$	$4.18 \pm 0.26^a$	$79.8 \pm 0.9^c$
0.715	30.0	$1.24 \pm 0.06^a$	$4.00 \pm 0.25^a$	$102.1 \pm 0.3^a$
1.215	30.0	$1.18 \pm 0.11^a$	$4.34 \pm 0.28^a$	$92.0 \pm 1.1^b$

\* Different letters in the same columns are significantly different as determined by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

Our results contradict the ones reported previously by some authors who found that carotenoid production was strongly affected by the salinity. Fazeli *et al.*<sup>31</sup> studied the effect of different salt concentrations (0.05 M to 3.0 M of NaCl) on the growth kinetics and total carotenoids accumulated in *Dunaliella tertiolecta*. In this study, higher salinities increased the total specific amount of carotenoids (picogram of total carotenoids per cells), and the highest carotenoid content (2.07 pg/cell) was obtained at a salinity of 3.0 M. However, low salinities of 0.1 M and 0.5 M NaCl favored total carotenoids production by *D. tertiolecta* when compared on a volume basis. The highest amount of total carotenoids (2.81 mg L<sup>-1</sup>) was detected after 8 days of incubation at a salt concentration of 0.1 M. This result is lower than the one observed in our experiments (5.80 ± 0.30 mg L<sup>-1</sup>) using the optimized growth conditions (300 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, 0,715 M NaCl, 17.5 klx). The study by Gómez *et al.*<sup>32</sup> examined the effect of the salinity on the quantity of total carotenoids accumulated by *D. salina* and *D. bardawil* grown in media with different salt concentrations (1 M, 2 M and 3 M NaCl). The highest carotenoid content per cell was achieved at 2 M NaCl. Farhat *et al.*<sup>19</sup> cultured *D. salina* at salinities between 0.6 M and 4.5 M NaCl. The highest carotenoid concentration did not exceed 1 mg L<sup>-1</sup> at 1.5 M NaCl.



**Figure 5.3:** Response surface for the total lipid content (%) at 210 h of culture as functions of the salinity and light intensity.

## 5.4 Conclusions

This work examined the effects of light intensity, nitrogen concentration and medium salinity on the growth and lipid and carotenoid accumulation by *D. tertiolecta*. A light intensity of 17.5 klx and initial NaNO<sub>3</sub> concentration of 300 mg L<sup>-1</sup> showed the highest biomass, specific growth rate, carotenoid and lipid contents and biomass, carotenoid and lipid productivity during the exponential growth phase. N-depletion in cultures with NaNO<sub>3</sub> concentrations of 300 mg L<sup>-1</sup> promoted a high lipid content; nitrogen contents greater than 300 mg L<sup>-1</sup> of NaNO<sub>3</sub> did not contribute to an increase in the biomass. After the exponential

growth phase, the use of a high light intensity and a high medium salinity did not result in increased carotenoid or lipid contents in the biomass. Furthermore, our results indicate that the carotenoid and lipid accumulation were unrelated after the application of these stress conditions to the cultures. Ultimately, our results showed that *D. tertiolecta* was able to accumulate considerable amounts of lipids and carotenoids, maintaining high biomass production in response to a broad range of environmental conditions, which are fundamental factors to the large-scale cultivation of algal monocultures.

## 5.5 Acknowledgements

The authors wish to thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Coal National Network (RNC, [http://www.ufrgs.br/rede\\_carvao](http://www.ufrgs.br/rede_carvao)) and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support.

## 5.6 References

1. Tafreshi, A. H., Shariati, M., *Dunaliella* biotechnology: methods and applications, J. Appl. Microbiol. **107** (2009) 14.
2. Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., Eppink, M. H. M., Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels, Biofuels, Bioprod. Biorefin. **4** (2010) 287.
3. Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, Renew. Sustainable Energy Rev. **14** (2010) 217.
4. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., Commercial applications of microalgae, J. Biosci. Bioeng. **101** (2006) 87.
5. Walker, T. L., Purton, S., Becker, D. K., Collet, C., Microalgae as bioreactors, Plant Cell Rep. **24** (2005) 629.
6. Chiu, S. -Y., Kao, C. -Y., Tsai, M. -T., Ong, S. -C., Chen, C. -H., Lin, C. -S., Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration, Bioresour. Technol. **100** (2009) 833.
7. Chisti, Y., Biodiesel from microalgae, Biotechnol. Adv. **25** (2007) 294.
8. Chisti, Y., Biodiesel from microalgae beats bioethanol, Trends Biotechnol. **26** (2008) 126.



9. Choi, W. Y., Kim, G. -V., Lee, S. -Y., Lee, H. -Y., Biodiesel production from *Scenedesmus* sp. through optimized *in situ* acidic transesterification process, Chem. Biochem. Eng. Q. **28** (2014) 367.
10. Baker, R., Günther, C., The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption, Trends Food Sci. Technol. **15** (2004) 484.
11. Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodríguez, H., Angeles Vargas, M., Rivas, J., Guerrero, M. G., Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta), J. Biotechnol. **76** (2000) 51.
12. Ben-Amotz, A., Fishier, R., Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis- $\beta$ -carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel, Food Chem. **62** (1998) 515.
13. Ye, Z. -W., Jiang, J. -G., Wu, G. -H., Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects, Biotechnol. Adv. **26** (2008) 352.
14. Raja, R., Hemaiswarya, S., Rengasamy, R., Exploitation of *Dunaliella* for  $\beta$ -carotene production, Appl. Microbiol. Biotechnol. **74** (2007) 517.
15. Tang, H., Abunasser, N., Garcia, M. E. D., Chen, M., Simon Ng, K. Y., Salley, S. O., Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel, Appl. Energy **88** (2010) 3324.
16. Andreasson, K. I. M., Wängberg, S. -A., Reduction in growth rate in *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) and *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) induced by UV-B radiation, J. Photochem. Photobiol. B **86** (2007) 227.
17. Janssen, M., Slenders, P., Tramper, J., Mur, L. R., Wijffels, R. H., Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles, Enzyme Microb. Tech. **29** (2001) 298.
18. Merchuk, J. C., Ronen, M., Giris, S., Arad S. M., Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium* sp., Biotechnol. Bioeng. **59** (1998) 705.
19. Farhat, N., Rabhi, M., Falleh, H., Jouini, J., Abdelly, C., Smaoui, A., Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella salina* (Chlorophyceae), J. Phycol. **47** (2011) 1072.
20. Mogedas, B., Casal, C., Forján, E., Vílchez, C.,  $\beta$ -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors, J. Biosci. Bioeng. **108** (2009) 47.

21. Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T. C., Simon Ng, K. Y., Salley, S. O., Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*, *Bioresour. Technol.* **102** (2011) 1649.
22. Guillard, R. R. L., Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, in Smith, W. L. and Chanley, M. H. (Eds.), *Conference on culture of marine invertebrate animals*, Plenum Press, New York, 1975, pp 29-60.
23. Da Fré, N. C., Kochem, L. H., Dierings, T., Roman, G. M., Rech, R., Marcílio, N. R., Influence of temperature and salinity on the production of carotenoids by the microalgae *Dunaliella tertiolecta*, 16<sup>o</sup> World Conference of Food Science and Technology, 2012, Foz do Iguaçu, Brazil.
24. Da Fré, N. C., Kochem, L. H., Dierings, T., Roman, G. M., Rech, R., Marcílio, N. R., Influence of temperature and salinity on the cultivation of microalgae *Dunaliella tertiolecta* in airlift photobioreactor, Brazilian Coal Congress, 2011, Gramado, Brazil.
25. Kochem, L. H., Da Fré, N. C., Redaelli, C., Rech, R., Marcílio, N. R., Characterization of a novel flat-panel airlift photobioreactor with an internal heat exchanger, *Chem. Eng. Technol.* **37** (2014) 59.
26. Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids, in (Ed.), *Current protocols in food analytical chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2001b, pp F4.2.1-F4.2.6.
27. Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy, in (Ed.), *Current protocols in food analytical chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2001a, pp F4.3.1-F4.3.8.
28. Kim, W., Park, J. M., Gim, G. H., Jeong, S. -H., Kang, C. M., Kim, D. -J., Kim, S. W., Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **35** (2012) 19.
29. Roleda, M. Y., Slocombe, S. P., Leakey, R. J. G., Day, J. G., Bell, E. M., Stanley, M. S., Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy, *Bioresour. Technol.* **129** (2013) 439.
30. Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C. H., Bino, R. J., Wijffels, R. H., Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga, *J. Biotechnol.* **162** (2012) 21.
31. Fazeli, M. R., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar, H., Effects of salinity on  $\beta$ -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran, *Bioresour. Technol.* **97** (2006) 2453.

- 
32. Gómez, P. I., Barriga, A., Cifuentes, A. S., González, M. A., Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) chlorophyta, Biol. Res. **36** (2003) 185.



## Capítulo 6

### **Artigo 3 - Kinetic modeling of *Dunaliella tertiolecta* growth under different nitrogen concentrations**

Este artigo foi aceito para publicação no periódico *Chemical Engineering & Technology* (DOI: 10.1002/ceat.201500585).

## Kinetic modeling of *Dunaliella tertiolecta* growth under different nitrogen concentrations

Nicéia Chies Da Fré,<sup>a,c</sup> Arthur Lygeros das Chagas,<sup>b</sup> Rosane Rech,<sup>b\*</sup> Nilson Romeu Marcílio<sup>c</sup>

### Abstract

Mathematical models are presented to describe the relationship between nitrogen consumption, biomass growth and carotenoid production by the microalgae *Dunaliella tertiolecta* BE 003 grown in nitrogen-limited and non-limited conditions. The nitrogen uptake was modeled by an n-order nitrogen catalyzed reaction. Three different expressions were proposed for biomass specific growth rate. Carotenoid production was fitted using the Luedeking-Piret equation. The nitrogen catalyzed expression proved to be adequate to model nitrogen uptake by *D. tertiolecta* over a wide range of nitrogen concentration. Biomass expression must be improved to describe the cessation of growth when nitrogen is still available in the cultures. The Luedeking-Piret expression successfully modeled the carotenoid production.

**Keywords:** carotenoids, microalga, modeling, nitrogen, Luedeking-Piret.

<sup>a</sup> *Bioprocess Engineering and Biotechnology, Bento Gonçalves Unit, State University of Rio Grande do Sul (UERGS), ZC 95700-000, Rua Benjamin Constant, 229, Bento Gonçalves, RS, Brazil*

<sup>b</sup> *Bioengineering Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), PO Box 15090 – ZC 91501-970, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>c</sup> *Chemical Engineering Department, School of Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), ZC 90040-040, Rua Luis Englert s/nº - Prédio 12204, Porto Alegre, RS, Brazil*

\* *Correspondence to: Rosane Rech, Tel.: +55 51 3308 6683; Fax: +55 51 3308 7048; E-mail: rrech@ufrgs.br*

## 6.1 Introduction

Culture conditions strongly affect microalgae growth and their biochemical composition. Mathematical models that have the ability to predict the dynamics of algal cultures under different growth conditions can aid in process optimization and the scaling-up of cultivation systems for commercial algal-based technology. However, the development of appropriate and simple models of a biological system showing a good fit can be a complex task, mainly due to non-linearity, resulting from the large number of parameters and interactions among them [1].

Kinetic modelling based on the well-established Droop model [2] and Monod model [3] has traditionally been used to predict algal growth in response to the substrate concentration, such as nitrogen. Nitrogen is mainly used to build proteins, amino acids and

nucleic acids and can be from an organic or an inorganic source, such as ammonium or nitrate. The Monod model assumes that the consumed nutrient is instantaneously transformed into biomass. This assumption is expressed by the linear proportionality between the growth rate ( $\mu$ ) and the nutrient uptake rate ( $\rho$ ). The Droop model uncouples growth from external nutrient concentration introducing an intracellular stock of nutrients. The growth rate depends on the internal cell quota ( $q$ ), the average amount of stored nutrients in each cell.

Droop model and Droop-based models predict successfully biomass growth in cultures limited by the lack of nitrogen. This way, there is a need to build new models to predict biomass growth and product formation over a wide range of nitrogen concentrations. Different models to describe the growth kinetics of *D. tertiolecta* were tested, considering the effect of a wide range of initial nitrogen concentrations. The models, which are extensions of the Monod model, demonstrated the ability to provide a reliable fit for the experimental data. The fittings were compared with those provided by the Droop model. Furthermore, the use of a simple model for the production of carotenoids, using a growth associated term and a non-growth associated term, was successfully used.

## 6.2 Materials and Methods

### 6.2.1 Microorganism and pre-cultures

The marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* BE 003 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 Guillard f/2 medium [4].

The pre-cultures were grown in a rotatory shaker at  $28 \pm 1$  °C under continuous illumination of 5.8 klx provided by a fluorescent lamp (30 W cool light) for 12 days. Homogeneous aliquots of 10 mL of culture from germination camera were inoculated in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of modified f/2 medium, which consisted of distilled water, 34 g L<sup>-1</sup> natural sea salt (Red Sea, Houston, TX, USA), 16.5 g L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mL L<sup>-1</sup> phosphate solution (5 g L<sup>-1</sup> of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), 1 mL L<sup>-1</sup> of silicate solution (30 g L<sup>-1</sup> of Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O), 1 mL L<sup>-1</sup> of a trace elements solution (9.8 mg L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 22 mg L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 180 mg L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 6.3 mg L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 4.36 mg L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA and 3.15 mg L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O), 1 mL L<sup>-1</sup> of a vitamin solution (100 mg L<sup>-1</sup> Thiamine, 0.5 mg L<sup>-1</sup> Cyanocobalamine and 0.5 mg L<sup>-1</sup> Biotin) and different NaNO<sub>3</sub> concentrations (75 mg L<sup>-1</sup>, 300 mg L<sup>-1</sup>, 600 mg L<sup>-1</sup> or 900 mg L<sup>-1</sup>). The pH of the medium was adjusted to 7.2 via the addition of 40 mM Tris-buffer. The culture medium was sterilized at 121 °C for 15 min, except for the vitamin solution, which was sterilized by filtering through a 0.22- $\mu$ m membrane (Millipore, Barueri, SP, Brazil).

### 6.2.2 Photobioreactor cultivation

The experiments were performed in bench-scale flat-panel airlift photobioreactors [5]. The reactors were sterilized with 10 mL L<sup>-1</sup> of a commercial solution of sodium hypochlorite (2.5 %) for 15 min. The chlorine was neutralized with 2.5 mL L<sup>-1</sup> of sodium thiosulfate solution (250 g L<sup>-1</sup>). The photobioreactors were filled with 2.0 L of sterile culture medium and inoculated with 200 mL of algae pre-culture, totaling 2.2 L of working volume. The photobioreactors were maintained at 28 °C and illuminated on the riser side by a panel of electronic lamps (24 × 13 W cool light) at a continuous light intensity of 17.5 klx. The airflow rate was kept at 0.5 mL L<sup>-1</sup> of CO<sub>2</sub>-enriched air using a rotameter. The CO<sub>2</sub> concentration in the airflow ranged between 1 % and 2 % to maintain the culture pH between 7.5 and 8.5. All experiments were performed in duplicate, using the modified f/2 medium described above. To avoid nutrient limitation, 1 mL L<sup>-1</sup> of phosphate solution, 1 mL L<sup>-1</sup> of silicate solution and 1 mL L<sup>-1</sup> of trace-elements solution were added daily to the cultures.

Samples were periodically withdrawn to determine the pH and the amount of biomass. The samples were centrifuged (16000 × g, 5 min), and the supernatant and pellet were stored (-18 °C) to determine the nitrate and total carotenoids concentrations, respectively.

### 6.2.3 Analytical determinations

The biomass concentration was determined by optical density at 750 nm and correlated to the dry cell weight. The pH was measured using a pH indicator strip (Alkalit®, Merck, Darmstadt, HE, Germany). The total carotenoid contents were determined spectrophotometrically by extracting cell pellets with acetone (Synth, Diadema, SP, Brazil) and measuring at 661.6 nm, 644.8 nm and 470 nm [6]. The sodium nitrate concentration was determined using a colorimetric test (Mydor™, Ft. Lauderdale, FL, United States) at 517 nm and correlated to a standard curve.

## 6.3 Model Development

### 6.3.1 Biomass and Nitrogen

The Droop model is highly useful in reproducing the biomass growth and nitrogen consumption of microalgae under nitrogen limitation. It uses an internal substrate cell quota ( $q$ ) to model the uncoupling of substrate absorption and growth. The basic Droop model for batch cultivation consist of six equations, as described below. The internal nitrogen cell quota was estimated from the difference between the initial nitrogen concentration and the nitrogen concentration in the culture medium over time [7, 8].



$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (1)$$

$$\frac{dN}{dt} = -\rho \cdot X \quad (2)$$

$$\frac{dq}{dt} = \rho - \mu \cdot q \quad (3)$$

$$\mu = \mu_m \cdot \left(1 - \frac{k_q}{q}\right) \quad (4)$$

$$\rho = \rho_{\max} \cdot \left(\frac{N}{N + k_N}\right) \quad (5)$$

$$q = \frac{N_{\text{in}} - N}{X} \quad (6)$$

However, as shown in this study, the Droop model was adequate to model a culture with a low initial nitrogen concentration (75 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>) but failed to model the cultures with higher initial nitrogen concentrations, even when all the nitrogen was consumed during the growth. The new models proposed in this study use the basic formulation of the Monod model with nitrogen as the limiting substrate. Two modifications were proposed to attempt to better represent the growth of microalgae *D. tertiolecta* as a function of nitrogen consumption: (i) the nitrogen uptake rate has a growth associated term ( $Y_{XN}$ ) and a non-growth associated term ( $m_N$ ) and (ii) the nitrogen uptake rate is catalyzed by nitrogen concentration as an  $n$ -order reaction. The proposed ModN model is shown in the following Eq. (1; 2; 7–9).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (1)$$

$$\frac{dN}{dt} = -\rho \cdot X \quad (2)$$

$$\rho = \left(\frac{\mu}{Y_{XN}} + m_N\right) \cdot N_{\text{dl}}^n \quad (7)$$

$$N_{\text{dl}} = \frac{N}{N_{\text{ref}}} \quad (8)$$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{N}{N + k_N}\right) \quad (9)$$

where the reference nitrogen concentration ( $N_{\text{ref}}$ ) is 1 g L<sup>-1</sup>.

Nevertheless, in the cultures starting with 600 mg L<sup>-1</sup> or 900 mg L<sup>-1</sup> of NaNO<sub>3</sub>, the nitrogen was not completely consumed, and despite the good fitting of the nitrogen curve, the ModN model was unable to model the biomass growth curve. Since all the other nutrients (phosphorous and micronutrients) were added daily to the cultures, the light availability was considered to limit the growth. This phenomenon can be modeled in several forms [1, 8]. In this study, the growth limitation by light availability was considered an effect of the mutual shading of the cells, i.e., the cell concentration limits the autotrophic cell growth. Two mathematical expressions were proposed to represent this phenomenon. The ModNXmax model was represented by substituting Eq. (9) by Eq. (10).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left( \frac{N}{N + k_N} \right) \cdot \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (10)$$

The term  $(1 - X / X_{\max})$  describes the auto-inhibition of the cell itself and was used to model the heterotrophic growth of *Haematococcus pluvialis* [9].

The ModNKx was represented by substituting Eq. (9) by Eq. (11), using the approach used by Jerusalimsky [10].

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left( \frac{N}{N + k_N} \right) \cdot \left( \frac{k_X}{X + k_X} \right) \quad (11)$$

### 6.3.2 Carotenoid production

The Luedeking-Piret expression [11] was used for total carotenoids formation kinetics, regardless of the models used for nitrogen and biomass, as shown in Eq. (12).

$$\frac{dC_{ct}}{dt} = (\alpha \cdot \mu + \beta) \cdot X \quad (12)$$

The model states that product formation by cell has a growth-associated term ( $\alpha$ ) and a non-growth-associated term ( $\beta$ ).

### 6.3.3 Parameter estimation

The ModN and Droop models were evaluated for all NaNO<sub>3</sub> initial concentrations. The ModNXmax and ModNKx models were evaluated for NaNO<sub>3</sub> initial concentrations of 300 mg L<sup>-1</sup>, 600 mg L<sup>-1</sup> and 900 mg L<sup>-1</sup>, because the growth could be limited by both nitrogen starvation and biomass concentration.

The parameters were estimated from the experimental data using EMSO software (Environment for Modeling, Simulation and Optimization) [12] to minimize the objective function (FO<sub>bj</sub>) of the ordinary least squares. The determination coefficient ( $R^2$ ) and the mean squared error (MSE) were used to compare the goodness of fit for the tested models.

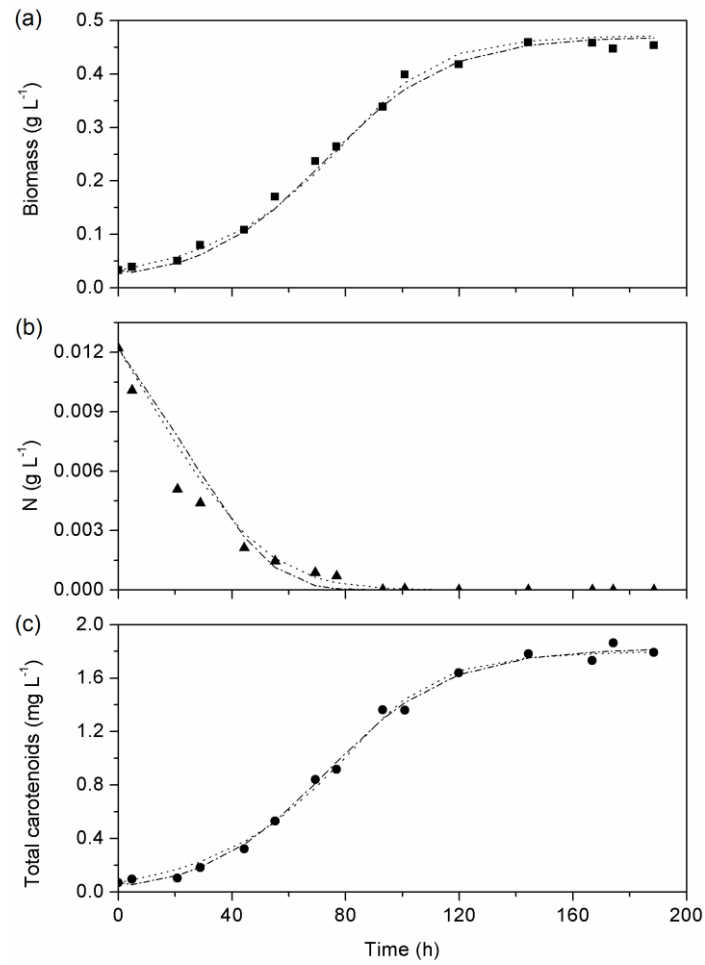
## 6.4 Results and Discussion

The increase of the initial NaNO<sub>3</sub> concentration from 75 mg L<sup>-1</sup> to 300 mg L<sup>-1</sup> increased the final biomass concentration from  $0.45 \pm 0.02$  g L<sup>-1</sup> to  $1.27 \pm 0.07$  g L<sup>-1</sup> and the total carotenoid content in the biomass from  $3.95 \pm 0.06$  mg g<sup>-1</sup> to  $5.1 \pm 0.4$  mg g<sup>-1</sup>. However, a further increase to 600 mg L<sup>-1</sup> or 900 mg L<sup>-1</sup> of NaNO<sub>3</sub> did not result in higher biomass concentrations or carotenoid content (Tukey's test,  $p \leq 0.05$ ). *Dunaliella salina* also showed that the biomass was 2.5 times higher in non-limited cultures compared with nitrogen-limited cultures. However, unlike our results, an increase in total carotenoid content was shown during nitrogen-limited growth [13].

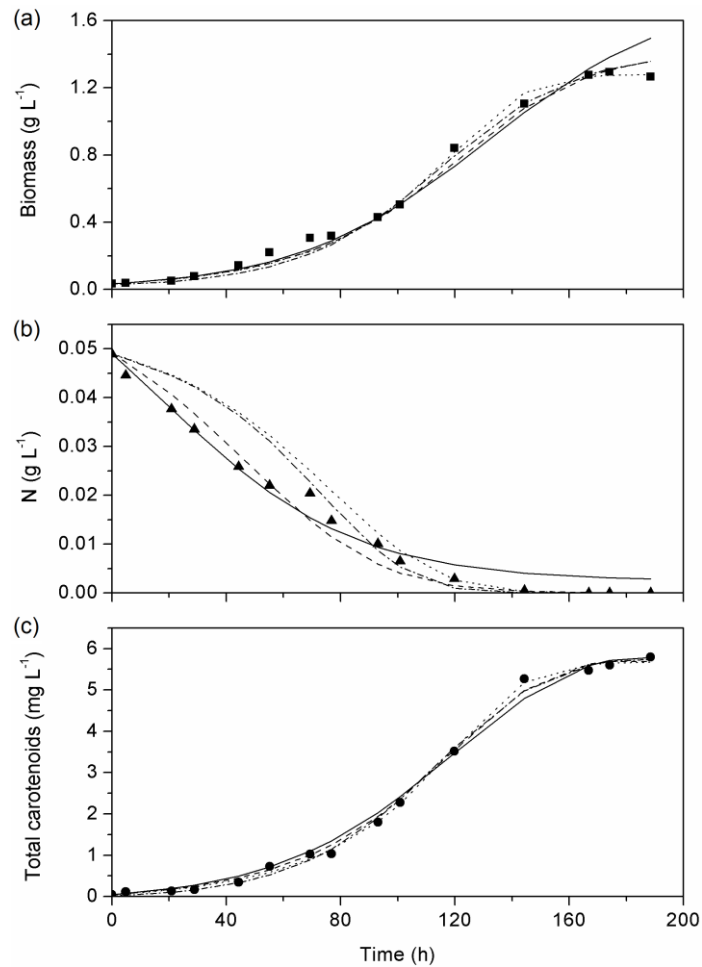
The results of the parameter estimation based on the experimental data, the objective functions and the determination coefficients are shown in Tab. 6.1. Fig. 6.1, 6.2, 6.3 and 6.4 show the experimental data and compare the predicted curves of the different models proposed in this work with the Droop model, which is widely used in the literature [2, 7].

**Table 6.1:** Results for the parameters estimation with experimental data from cultures with different  $\text{NaNO}_3$  initial concentrations and values of objective function (FObj), coefficient of determination ( $R^2$ ) and mean squared error (MSE).

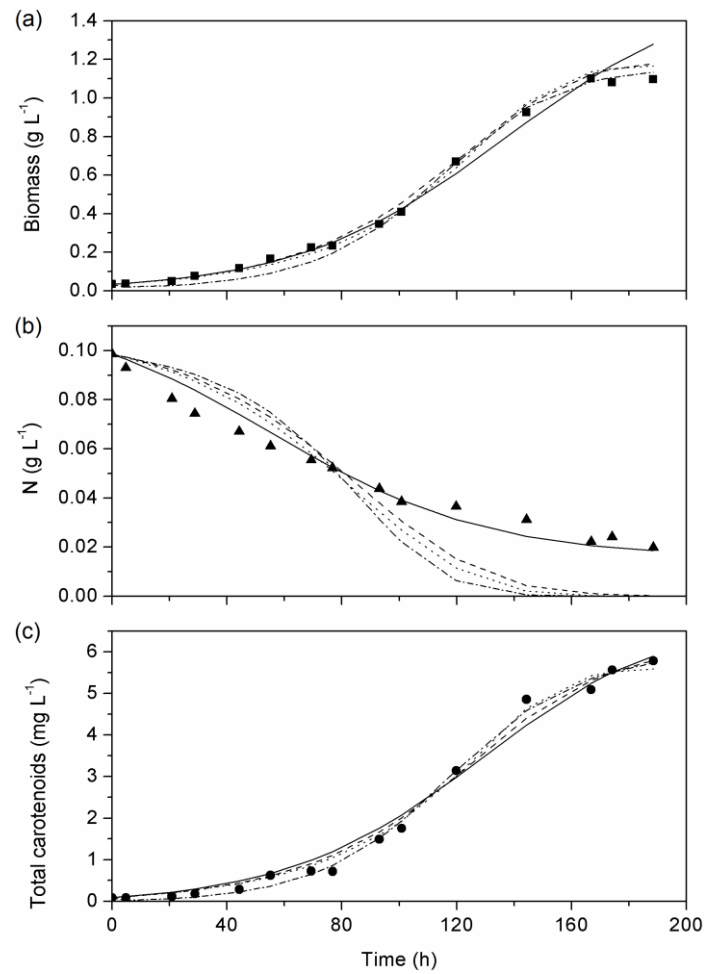
$\text{NaNO}_3$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	ModN				ModNXmax			ModNKx			Droop			
	75	300	600	900	300	600	900	300	600	900	75	300	600	900
$\mu_m$ ( $\text{h}^{-1}$ )											0.04669	0.04319	0.05289	0.04628
$k_q$ ( $\text{g g}^{-1}$ )											0.02634	0.03505	0.08543	0.1179
$\rho_{\max}$ ( $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$ )											2.834	0.09087	1.001	0.8077
$k_N$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	0.000090	0.000852	0.002374	0.003944				0.000505	0.005232	0.005851	4.524	0.6784	8.168	8.305
$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.02790	0.02804	0.02567	0.02617	0.03004	0.02784	0.02845	0.02858	0.02889	0.02870				
$Y_{XN}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	0.2005	1.204	1.316	1.256	0.004793	0.01309	0.004432	5.456	5.081	5.085				
$m_N$ ( $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	1.215	0.07039	0.05442	0.06714	0.001299	0.01195	0.004432	0.4705	0.07052	0.08006				
$n$	1.190	0.9922	0.9538	0.9974	1.989	2.231	2.822	1.287	1.032	1.054				
$X_{\max}$ ( $\text{g L}^{-1}$ )					1.763	1.583	1.434							
$k_X$ ( $\text{g L}^{-1}$ )								5.474	3.958	3.932				
$\alpha$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	3.897	4.507	4.801	5.531	6.232	5.635	6.199	5.489	4.104	4.841	3.958	5.004	4.626	6.251
$\beta$ ( $\text{mg g}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	0.000303	0.000092	0.000772	-0.00670	-0.03079	-0.01300	-0.01323	-0.01514	0.01053	0.001637	0.000399	-0.00851	0.006254	-0.01751
FObj	115	125	239	12	102	229	16	29	238	193	164	94	269	188
$R^2 X$	0.9910	0.9922	0.9957	0.9829	0.9702	0.9758	0.9676	0.9865	0.9961	0.9853	0.9933	0.9911	0.9946	0.9761
MSE $X$	0.000201	0.001314	0.001466	0.003381	0.009218	0.005502	0.004451	0.002588	0.001663	0.004092	0.000185	0.002706	0.001535	0.005693
$R^2 N$	0.9673	0.9611	0.8577	0.8446	0.9612	0.9770	0.9887	0.9605	0.8444	0.8217	0.9497	0.9644	0.8426	0.8350
MSE $N$	$5.25 \times 10^{-7}$	$2.94 \times 10^{-5}$	$2.72 \times 10^{-4}$	$6.34 \times 10^{-4}$	$6.31 \times 10^{-6}$	$2.37 \times 10^{-5}$	$2.33 \times 10^{-5}$	$6.64 \times 10^{-6}$	$2.50 \times 10^{-4}$	$6.17 \times 10^{-4}$	$7.91 \times 10^{-7}$	$2.35 \times 10^{-5}$	$3.36 \times 10^{-4}$	$7.19 \times 10^{-4}$
$R^2 C_{Ct}$	0.9923	0.9975	0.9912	0.9922	0.9902	0.9800	0.9749	0.9944	0.9862	0.9854	0.9947	0.9955	0.9938	0.9918
MSE $C_{Ct}$	0.02257	0.007990	0.03050	0.02537	0.03116	0.06670	0.09116	0.01548	0.03953	0.04325	0.000177	0.01459	0.01941	0.02638
$R^2 q$											0.8111	0.3312	0.4277	0.3284
MSE $q$											0.001648	0.002063	0.003701	0.009112



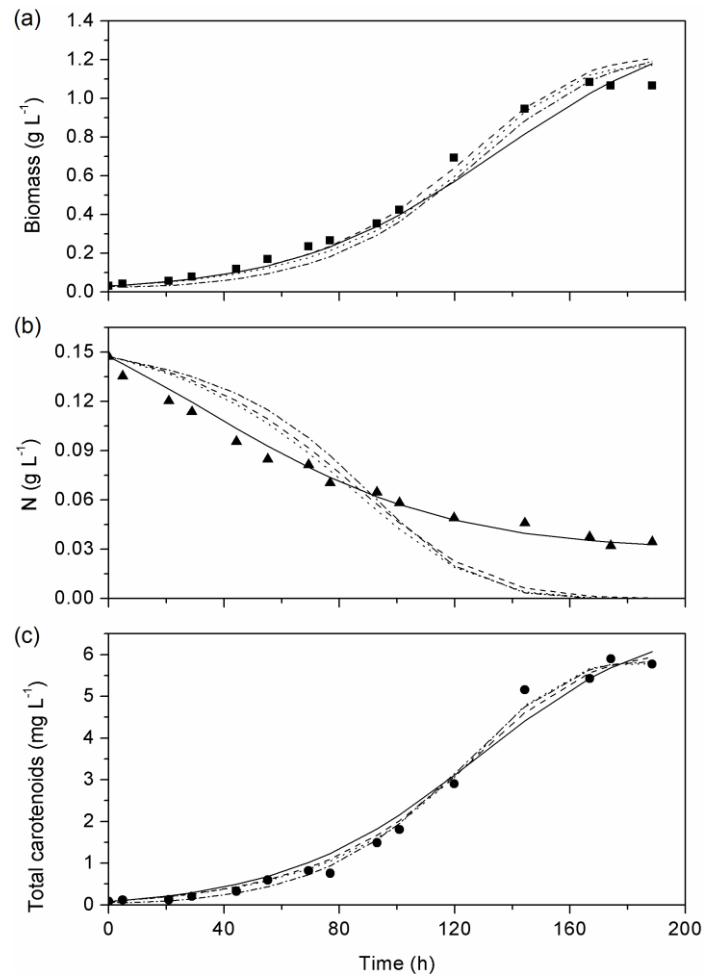
**Figure 6.1:** Experimental data and simulated curves of *D. tertiolecta* cultured in 75 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> initial concentration. Experimental data: (a) biomass (■), (b) nitrogen (▲), and (c) total carotenoids (●). Models: Droop (— · —), and ModN (·····).



**Figure 6.2:** Experimental data and simulated curves of *D. tertiolecta* cultured in 300 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> initial concentration. Experimental data: (a) biomass (■), (b) nitrogen (▲), and (c) total carotenoids (●). Models: Droop (— · —), ModN (·····), ModNKx (— — —), and ModNXmax (—).



**Figure 6.3:** Experimental data and simulated curves of *D. tertiolecta* cultured in 600 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> initial concentration. Experimental data: (a) biomass (■), (b) nitrogen (▲), and (c) total carotenoids (●). Models: Droop (— · —), ModN (·····), ModNKx (— — —), and ModNXmax (——).



**Figure 6.4:** Experimental data and simulated curves of *D. tertiolecta* cultured in  $900 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$  initial concentration. Experimental data: (a) biomass (■), (b) nitrogen (▲), and (c) total carotenoids (●). Models: Droop (— · —), ModN (·····), ModNKx (— — —), and ModNXmax (——).

Both the ModN and Droop models provided a good fit for the biomass concentration data in cultures with an initial  $\text{NaNO}_3$  concentration of  $75 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 6.1a). This culture was considered to be limited only by nitrogen; therefore, models ModNKx and ModNXmax were not tested. Regarding the nitrogen consumption data, the ModN model provided a slightly better fitting, a higher  $R^2$  value and lower MSE value, compared with the Droop model (Fig. 6.1b, Tab. 6.1). Additionally, the maximum specific growth rate estimated by the ModN model ( $\mu_{\max}$ ) is more closely aligned with the experimental average value observed in the culture ( $0.0275 \text{ h}^{-1}$ ) than the maximum specific growth rate estimated by the Droop model ( $\mu_m$ ) (Tab. 6.1).

The ModNKx model provided the general best fitting when the initial  $\text{NaNO}_3$  concentration was  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , as shown by its lowest value in the objective function among all the models (Tab. 6.1). The ModNKx, ModN and Droop models successfully predicted biomass data, with ModN showing slightly better fitting (Fig. 6.2a,  $R^2$  and MSE in Tab. 6.1).



However, ModNKx model provided the best fit for nitrogen consumption (Fig. 6.2b), while ModN and Droop models were not capable of predicting the experimental behavior of this variable.

ModNXmax was the only model capable of describing the behavior of nitrogen concentration with cultures starting at 600 mg L<sup>-1</sup> or 900 mg L<sup>-1</sup> of NaNO<sub>3</sub> (Fig. 6.3b and 6.4b); however, the model was not capable of predicting the cessation of biomass growth at the end of the cultures (Fig. 3a and 4a). The predicted value for the final total biomass by the ModNXmax model ( $X_{\max}$ ) was higher than the highest experimental biomass value of these cultures ( $1.08 \pm 0.02$  g L<sup>-1</sup>). In the culture starting with 600 mg L<sup>-1</sup> of NaNO<sub>3</sub>, the ModN, ModNKx and Droop models provided a good fitting to biomass curve; however, these models failed to predict nitrogen concentration. In the cultures with 900 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, no model showed a good fitting of biomass concentration, particularly at the end of the cultivation. The ModN, ModNKx and Droop models also failed to predict the nitrogen concentration of these cultures, since these models always tended to zero-out the nitrogen concentration to provide the cessation of biomass growth.

The Luedeking-Piret expression successfully described the behavior of the total carotenoid concentration, regardless of the initial NaNO<sub>3</sub> concentration (Fig. 6.1c, 6.2c, 6.3c and 6.4c). As this expression is dependent on the biomass concentration, the higher the fitting of the biomass, the better the fitting of the carotenoids; achieving determination coefficients of 0.99 for the ModN and Droop models for all initial NaNO<sub>3</sub> concentrations, and for the ModNXmax and ModNKx models at 300 mg L<sup>-1</sup> of NaNO<sub>3</sub> (Tab. 6.1).

The Droop model provided a good fit for biomass concentration in cultures with initial NaNO<sub>3</sub> concentrations of 75 mg L<sup>-1</sup>, 300 mg L<sup>-1</sup> and 600 mg L<sup>-1</sup> ( $R^2 > 0.99$ ) and provided a slightly less accurate fit for the culture with an initial NaNO<sub>3</sub> concentration of 900 mg L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0.9761$ ). However, the Droop model did not properly predict nitrogen consumption, primarily for cultures with high initial NaNO<sub>3</sub> concentrations (300 mg L<sup>-1</sup> to 900 mg L<sup>-1</sup>). However, even for the culture limited by nitrogen (75 mg L<sup>-1</sup>), the Droop model showed a lower  $R^2$  compared with the ModN model, with values of 0.9497 and 0.9673, respectively. The internal nitrogen cell quota  $q$ , an auxiliary variable used by the Droop model, also presented a low  $R^2$  value at 75 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> culture (0.8111) and very low  $R^2$  values for 300 mg L<sup>-1</sup> to 900 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> cultures ( $R^2 < 0.43$ ).

The maximum specific growth rate estimated by the Droop model for all initial NaNO<sub>3</sub> concentrations that were tested ( $\mu_m = 0.047 \pm 0.004$  h<sup>-1</sup>) was substantially larger than the highest experimental average value ( $0.0275 \pm 0.008$  h<sup>-1</sup>) observed at the 300 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> culture. However, the same parameter estimated by the models proposed in this work ( $\mu_{\max} = 0.028 \pm 0.001$  h<sup>-1</sup>) was very similar to the experimental observation. Furthermore, the estimated values of the other parameters of the Droop model showed significant variation among the different initial NaNO<sub>3</sub> concentrations, mainly  $\rho_{\max}$  and  $k_N$ . In a general way, the models proposed in this work (ModN, ModNXmax and ModNKx) showed less parameter variation within the different NaNO<sub>3</sub> initial concentrations.

The ModN model showed little variation in the parameter values estimated for initial  $\text{NaNO}_3$  concentrations of  $300 \text{ mg L}^{-1}$  or higher, with the exception of  $k_N$ , which increased with nitrogen concentration. The value of the growth yield ( $Y_{XN}$ ) in these cultures was  $1.26 \pm 0.06 \text{ g g}^{-1}$ , which was 6.3 times higher than the  $Y_{XN}$  estimated for the culture starting with  $\text{NaNO}_3$   $75 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0.2 \text{ g g}^{-1}$ ). The nitrogen non-growth associated term ( $m_N$ ) showed opposite behavior, being higher in the nitrogen-limited culture ( $1.2 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) than in the others ( $0.064 \pm 0.007 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), which indicated a higher amount of non-growth associated nitrogen utilization in low nitrogen media. The  $n$  coefficient was also higher for nitrogen limited cultures than for non-limited cultures: 1.19 and  $0.98 \pm 0.02$ , respectively. The nitrogen saturation coefficient ( $k_N$ ) increased linearly with initial  $\text{NaNO}_3$  concentration ( $k_X = 4.74 \times 10^{-6} C_{\text{NaNO}_3} - 4.07 \times 10^{-4}$ ;  $R^2 = 0.993$ ). A low  $k_N$  implied a high specific growth rate, even at low nitrogen concentrations.

The ModNKx model, which was estimated only for initial  $\text{NaNO}_3$  concentration of  $300 \text{ mg L}^{-1}$  or higher, showed a small variation in the parameters  $Y_{XN}$  ( $5.2 \pm 0.2 \text{ g g}^{-1}$ ) and  $n$  ( $1.1 \pm 0.1$ ). The saturation constant  $k_N$  also increased with initial  $\text{NaNO}_3$  concentration, and its values are of the same order of magnitude as the values estimated by the ModN model. The  $k_X$  values showed the same order of magnitude among the estimated values, with a similar value for cultures with initial  $\text{NaNO}_3$  concentrations of  $600 \text{ mg L}^{-1}$  and  $900 \text{ mg L}^{-1}$  ( $3.95 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ ).

The use of the term  $N_{dl}^n$  in the nitrogen uptake expression proved correct, since the models proposed in this study showed better fitting for nitrogen consumption curves than the Droop model for all initial  $\text{NaNO}_3$  concentration in the cultures. The best models to predict nitrogen consumption were: ModN for cultures for  $\text{NaNO}_3$   $75 \text{ mg L}^{-1}$ , ModNKx for  $300 \text{ mg L}^{-1}$  and ModNXmax for  $600 \text{ mg L}^{-1}$  and  $900 \text{ mg L}^{-1}$ . The low  $R^2$  for the internal nitrogen cell quota, even for the nitrogen-limited culture ( $75 \text{ mg L}^{-1}$ ), corroborates the lack of fit of the Droop model.

The biomass growth was successfully modeled by the ModN and ModNKx models for cultures starting with  $75 \text{ mg L}^{-1}$  and  $300 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{NaNO}_3$ , respectively. However, no model could predict the growth cessation in the cultures starting with higher  $\text{NaNO}_3$  concentrations, even the ModNXmax model, which successfully described nitrogen uptake and was used previously to model *H. pluvialis* growth [9].

Luedeking-Piret expression for carotenoids formation was applied with absolute success in all the models that were tested in this work at all initial  $\text{NaNO}_3$  concentrations. The growth associated parameter ( $\alpha$ ) was  $3.93 \pm 0.03 \text{ mg g}^{-1}$  for nitrogen-limited culture and  $5.3 \pm 0.7 \text{ mg g}^{-1}$  for non-limited cultures ( $300 \text{ mg L}^{-1}$  to  $900 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$ ). This result shows that carotenoid production by the cells is lower when the biomass growth is limited by the lack of nitrogen. Another study with the same microalga showed that carotenoid production is lower in  $\text{CO}_2$ -limited cultures ( $3.89 \pm 0.34 \text{ mg g}^{-1}$ ) compared with a culture with an adequate  $\text{CO}_2$  supply ( $5.3 \pm 0.7 \text{ mg g}^{-1}$ ) [14]. Additionally, the estimated value of  $\alpha$  increased with the initial  $\text{NaNO}_3$  concentrations in the ModN model. However, this trend was

not confirmed for the other models. The non-growth associated term ( $\beta$ ) assumed very low values for all estimations and alternated between positive and negative values.

The Luedeking-Piret expression was chosen due to its simplicity and because it has been widely used to model other biotechnological processes, such as the production of ethanol by *Kluyveromyces marxianus* [15], the production of 2-hydroxybiphenyl (2-HBP) using *Enterobacter* sp. [16], and the production of lactic acid by *Lactobacillus* sp. [17]. An extended Luedeking-Piret expression was previously used to describe lutein production by *Chlorella protothecoides* [18] and astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* [9], but to our knowledge, the simple original equation has been never used before to model carotenoid production by microalgae.

## 6.5 Conclusions

The models proposed successfully fit the nitrogen uptake by microalgae over a wide range of nitrogen concentrations. The results showed that nitrogen consumption can be approached by an  $n$ -order nitrogen catalyzed reaction, both in nitrogen-limited and in non-limited media. However, biomass growth models must be improved for cultures without nitrogen starvation. The simple Luedeking-Piret equation also successfully predicted carotenoid production by *D. tertiolecta*. These models represent an advance in microalgae modelling and can be used for control, simulation and optimization of photobioreactors.

## 6.6 Acknowledgements

The authors wish to thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Coal National Network (RNC, [http://www.ufrgs.br/rede\\_carvao](http://www.ufrgs.br/rede_carvao)) and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support.

## 6.7 Symbols used

$C_{Ct}$	[mg L <sup>-1</sup> ]	total carotenoids concentration
$k_N$	[g L <sup>-1</sup> ]	half saturation constant for nitrogen
$k_q$	[g g <sup>-1</sup> ]	minimum cell quota
$k_X$	[g L <sup>-1</sup> ]	half-saturation constant for biomass

---

$m_N$	$[\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}]$	nitrogen non-growth associated term
$n$	$[-]$	empirical constant
$N$	$[\text{g L}^{-1}]$	nitrogen concentration
$N_{\text{dl}}$	$[-]$	dimensionless nitrogen concentration
$N_{\text{in}}$	$[\text{g L}^{-1}]$	initial nitrogen concentration
$N_{\text{ref}}$	$[\text{g L}^{-1}]$	reference nitrogen concentration
$q$	$[\text{g g}^{-1}]$	internal nitrogen cell quota
$t$	$[\text{h}]$	time
$X$	$[\text{g L}^{-1}]$	biomass concentration
$X_{\text{max}}$	$[\text{g L}^{-1}]$	maximum biomass concentration
$Y_{XN}$	$[\text{g g}^{-1}]$	nitrogen growth associated term

#### Greek letters

$\alpha$	$[\text{mg g}^{-1}]$	carotenoids growth associated term
$\beta$	$[\text{mg g}^{-1}\text{h}^{-1}]$	carotenoids non-growth associated term
$\mu$	$[\text{h}^{-1}]$	specific growth rate
$\mu_m$	$[\text{h}^{-1}]$	maximum specific growth rate of Droop model
$\mu_{\text{max}}$	$[\text{h}^{-1}]$	maximum specific growth rate
$\rho$	$[\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}]$	nitrogen uptake rate
$\rho_{\text{max}}$	$[\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}]$	maximum nitrogen uptake rate

## Subscripts

Ct	carotenoids
dl	dimensionless
in	initial
m	maximum (Droop model)
max	maximum
ref	reference

## Abbreviations

FObj	Objective Function
MSE	Mean Squared Error

## 6.8 References

- [1] I. Vatcheva, H. de Jong, O. Bernard, N. J. I. Mars, *Artif. Intell.* **2006**, *170* (4–5), 472–506. DOI: 10.1016/j.artint.2005.11.001
- [2] M. R. Droop, *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **1968**, *48* (3), 689–733. DOI: 10.1017/S0025315400019238
- [3] J. Monod, *Annu. Rev. Microbiol.* **1949**, *3* (1), 371–394. DOI: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103
- [4] S. d. O. Lourenço, *Cultivo de microalgas marinhas princípios e aplicações*, RiMa, São Carlos **2006**.
- [5] L. H. Kochem, N. C. Da Fré, C. Redaelli, R. Rech, N. R. Marcílio, *Chem. Eng. Technol.* **2014**, *37* (1), 59–64. DOI: 10.1002/ceat.201300420
- [6] H. K. Lichtenthaler, C. Buschmann, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons, Inc., New Jersey **2001**, F4.3.1–F4.3.8.

- [7] G. Bougaran, O. Bernard, A. Sciandra, *J. Theor. Biol.* **2010**, 265 (3), 443–454. DOI: 10.1016/j.jtbi.2010.04.018
- [8] S. Yuan, X. Zhou, R. Chen, B. Song, *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2014**, 34, 525–535. DOI: 10.1016/j.rser.2014.03.032
- [9] X. W. Zhang, X. D. Gong, F. Chen, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 23 (1), 691–696. DOI: 10.1038/sj.jim.2900685
- [10] G. Birol, P. Doruker, B. Kirdar, Z. İ. Önsan, K. Ülgen, *Process. Biochem.* **1998**, 33 (7), 763–771. DOI: 10.1016/s0032-9592(98)00047-8
- [11] R. Luedeking, E. L. Piret, *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **1959**, 1 (4), 393–412. DOI: 10.1002/jbmt.390010406
- [12] R. P. Soares, A. R. Secchi, *Comput. Aided Chem. Eng.* **2003**, 14, 947–952. DOI: 10.1016/s1570-7946(03)80239-0
- [13] L. Sánchez-Estudillo, Y. Freile-Pelegrin, R. Rivera-Madrid, D. Robledo, J. A. Narváez-Zapata, *Biotechnol. Lett.* **2006**, 28 (11), 787–791. DOI: 10.1007/s10529-006-9001-2
- [14] A. L. Chagas, A. O. Rios, A. Jarenkow, N. R. Marcílio, M. A. Z. Ayub, R. Rech, *Process. Biochem.* **2015**, 50 (6), 981–988. DOI: 10.1016/j.procbio.2015.03.012
- [15] S. Gabardo, G. F. Pereira, R. Rech, M. A. Z. Ayub, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 42 (9), 1243–1253. DOI: 10.1007/s10295-015-1661-2
- [16] L. Liu, Z. Guo, J. Lu, X. Xu, *Biotechnol. Lett.* **2015**, 37 (2), 375–381. DOI: 10.1007/s10529-014-1694-z
- [17] S. Prasad, K. Srikanth, A. M. Limaye, S. Sivaprakasam, *Biotechnol. Lett.* **2014**, 36 (6), 1303–1307. DOI: 10.1007/s10529-014-1482-9
- [18] X. W. Zhang, X. M. Shi, F. Chen, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 23 (6), 503–507. DOI: 10.1038/sj.jim.2900760

# Capítulo 7

## Considerações Finais

### 7.1 Discussão geral dos principais resultados

Trabalhou-se com o cultivo da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* BE 003 em fotobiorreatores de placa do tipo *airlift* e posterior obtenção de bioprodutos a partir da sua biomassa. O estudo deste microrganismo consistiu na otimização de parâmetros físico-químicos fundamentais para o crescimento desta microalga salina. Inicialmente, foram estudadas as condições de temperatura e salinidade do meio de cultivo, mantendo-se constantes as concentrações dos nutrientes de acordo com o meio de cultura f/2 (Guillard, 1975), muito utilizado no cultivo de microalgas de ambiente salino. Posteriormente, estudou-se a influência da fonte e quantidade de nitrogênio, através da avaliação de diferentes sais de nitrato em diferentes concentrações concomitantemente com adição de dióxido de carbono ao meio tendo como principal objetivo o aumento da produção de biomassa. Nessa etapa também foram realizados cultivos variando-se a intensidade luminosa e concentração salina no final da fase de crescimento logaritmo das células, visando o aumento da produção de carotenoides e lipídios após o crescimento máximo das células.

Com os resultados apresentados no Artigo 1 (Capítulo 4), verificou-se que as variáveis físico-químicas temperatura e salinidade do meio de cultivo afetaram fortemente e de forma diferente a composição da biomassa durante o crescimento da *D. tertiolecta*. A temperatura teve um forte efeito no conteúdo lipídico, enquanto que a salinidade do meio de cultivo teve um efeito mais fraco na obtenção deste produto. No entanto, a salinidade do meio afetou a concentração dos principais carotenoides obtidos a partir da biomassa de *D. tertiolecta* (luteína e  $\beta$ -caroteno). Em relação à composição elementar, nem a temperatura nem a salinidade mostraram efeito significativo na composição elementar da *D. tertiolecta*. Estes resultados demonstram a importância de estudos sistemáticos sobre os efeitos de parâmetros ambientais no crescimento e composição da biomassa das microalgas. A partir da combinação dos resultados obtidos, foram determinadas as condições apropriadas de temperatura e

salinidade do meio de cultivo para a produção de carotenoides e lipídios pela microalga *D. tertiolecta* BE 003: 28 °C e 0,715 M de NaCl. Esses parâmetros foram mantidos constantes na avaliação das demais condições de cultivo propostas neste trabalho.

Outro importante resultado que deve ser discutido mais profundamente é a obtenção de grande quantidade de luteína no extrato seco da biomassa de *D. tertiolecta*, sendo a quantidade de luteína ( $1315 \pm 36 \mu\text{g g}^{-1}$ ) produzida aproximadamente o dobro da quantidade de  $\beta$ -caroteno ( $732 \pm 51 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Esse resultado está de acordo com o obtido por Barbosa *et al.* (2005), que realizaram estudos sobre *D. tertiolecta* CCAP 19 / 6B e também obtiveram um conteúdo de luteína na biomassa cerca de duas vezes o conteúdo  $\beta$ -caroteno.

A grande maioria dos estudos realizados com a espécie *Dunaliella* tem como principal objetivo a maior obtenção de  $\beta$ -caroteno, importante carotenoide comercial com propriedades amplamente conhecidas. Muitos estudos são publicados sobre a *D. salina*, membro muito estudado desta espécie, normalmente com abundante quantidade de  $\beta$ -caroteno (Raja *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008). Todavia, o maior acúmulo de luteína pela *D. tertiolecta*, entre os carotenoides quantificados neste trabalho, além do  $\beta$ -caroteno, é um resultado bastante relevante, pois este carotenoide é comercialmente utilizado como corante nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de cosméticos. Além disso, é eficaz na redução do risco de doenças crônicas relacionadas com a idade, como a degeneração macular, catarata, progressão da aterosclerose precoce e câncer (Del Campo *et al.*, 2000; Baker e Günther, 2004; Tafreshi e Shariati, 2009).

O Artigo 2 (Capítulo 5) traz a análise da influência da disponibilidade de luz na produção de carotenoides e lipídios totais. Os experimentos realizados com as mais altas intensidades de luz (17,5 e 24,0 klx) apresentaram maiores concentrações e produtividades de biomassa, bem como maiores velocidades específicas de crescimento. A intensidade luminosa de 2,5 klx limitou o crescimento das microalgas, e conseqüentemente as produtividades de biomassa e produtos, porém a biomassa cultivada com esta intensidade de luz apresentou o maior teor de carotenoides ( $4,35 \pm 0,10 \text{ mg g}^{-1}$ ), aproximadamente 65 % superior ao teor de carotenoides obtido da biomassa cultivada nas intensidades luminosas mais altas. A baixa intensidade de luz parece estimular a síntese de carotenoides por *D. tertiolecta* para aumentar a absorção de luz pelas células. Esta suposição também pode ser comprovada pela redução gradativa do teor de carotenoides na biomassa quando a intensidade luminosa aumentou de 2,5 a 17,5 klx.

A variação da concentração de nitrato de sódio afetou parâmetros de crescimento e composição da biomassa de *D. tertiolecta*. O crescimento das células cessou após cerca de 100 h nos cultivos com  $75 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ , enquanto que a biomassa continuou a aumentar até cerca de 140 h nos cultivos com concentrações mais elevadas  $\text{NaNO}_3$ . A biomassa aumentou quase três vezes nas culturas realizadas com  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrato de sódio ( $1,27 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ ), em comparação com as culturas realizadas com a concentração padrão de  $\text{NaNO}_3$  do meio de cultura Guillard f/2 ( $0,45 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ ). Nestas condições de cultivo, o teor de carotenoides totais na biomassa também aumentou de  $3,95 \pm 0,06 \text{ mg g}^{-1}$  ( $75 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ ) para  $5,1 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1}$  ( $300 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ ). No entanto, os aumentos na



concentração de  $\text{NaNO}_3$  acima de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  não resultaram em concentrações de biomassa e teores de carotenoides mais elevados. Em outro estudo, *Dunaliella salina* também mostrou um aumento de 2,5 vezes na biomassa em culturas não limitadas por nitrogênio. No entanto, diferentemente dos nossos resultados, o crescimento em meios limitados por nitrogênio resultou num aumento do teor de carotenoides totais (Sánchez-Estudillo *et al.*, 2006). Nossos resultados também estão de acordo com aqueles obtidos por Kim *et al.* (2012) que alcançaram máximas concentrações de biomassa de *Dunaliella sp.* e *D. Salina* em meios de cultivo com 3 mM de  $\text{KNO}_3$  ( $303 \text{ mg L}^{-1}$ ). A concentração de 1 mM foi insuficiente para o crescimento celular, mas concentrações mais elevadas do que 3 mM de  $\text{KNO}_3$  não aumentaram a produção de biomassa.

As culturas com concentração inicial de  $\text{NaNO}_3$  de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  apresentaram valores mais elevados de velocidade específica de crescimento, biomassa e conteúdos lipídico e de carotenoides, bem como produtividades mais elevadas de biomassa, carotenoides e de lipídios. Esta concentração de  $\text{NaNO}_3$  foi considerada adequada para o crescimento celular e a produção concomitante de carotenoides e lipídios, pois a concentração inicial elevada de  $\text{NaNO}_3$  proporcionou o aumento da biomassa e do conteúdo de carotenoides, e a falta de nitrogênio após 140 h de cultivo promoveu maior conteúdo lipídico.

As condições de estresse aplicadas no final da fase exponencial de crescimento das microalgas não afetaram a biomassa e teor de carotenoides; no entanto, o teor de lipídios da biomassa foi afetado tanto pela salinidade quanto pela intensidade da luz. Elas não só não aumentaram o teor de carotenoides, mas também reduziram significativamente o teor de lipídios. O conteúdo lipídico diminuiu a baixas intensidades de luz e salinidades elevadas ( $R^2 = 0,989$ ).

Nossos resultados são diferentes dos relatados por alguns autores que obtiveram maior conteúdo de carotenoides totais em meios de cultivo com salinidades mais elevadas do que as utilizadas para o crescimento das células. Fazeli *et al.* (2006) estudaram o efeito de diferentes concentrações de sal (0,05 M a 3,0 M de  $\text{NaCl}$ ) no conteúdo de carotenoides totais acumulados em *Dunaliella tertiolecta*, sendo o máximo valor obtido nas culturas realizadas com salinidade de 3,0 M. No entanto, neste mesmo trabalho, a maior quantidade de carotenoides totais obtida foi de  $2,81 \text{ mg L}^{-1}$ , menos da metade da quantidade alcançada nos nossos experimentos ( $5,80 \pm 0,30 \text{ mg L}^{-1}$ ), usando condições otimizadas de crescimento ( $300 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ , 0,715 M de  $\text{NaCl}$  e 17,5 klx).

No Artigo 3 (Capítulo 6), quatro modelos matemáticos foram apresentados para descrever a relação entre o consumo de nitrogênio, crescimento de biomassa e produção de carotenoides totais pela microalga *Dunaliella tertiolecta* BE 003 cultivada em condições de deficiência de nitrogênio e em meios de cultivo não limitados. Um deles é o bem estabelecido modelo de Droop (1968), tradicionalmente usado para prever o crescimento de algas em resposta à concentração de substrato. Três novos modelos foram propostos neste trabalho (ModN, ModNKx e ModNXmax) e utilizaram a formulação básica do modelo de Monod (1949) com nitrogênio como o substrato limitante. O consumo de nitrogênio foi modelado por uma reação catalisada por nitrogênio de ordem  $n$ . Três expressões diferentes foram propostas

para a velocidade específica de crescimento da biomassa. A produção de carotenoides totais foi modelada utilizando a equação de Luedeking-Piret (1959). Os parâmetros do modelo da literatura e dos modelos propostos foram estimados utilizando parte dos dados experimentais apresentados no Capítulo 5, item 5.3.2.

Os modelos ModN e Droop foram avaliados para todas as concentrações iniciais de  $\text{NaNO}_3$ . Os modelos ModNKx e ModNXmax foram avaliados para as concentrações iniciais de  $300 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $600 \text{ mg L}^{-1}$  e  $900 \text{ mg L}^{-1}$ , pois o crescimento poderia ser limitado por falta de nitrogênio e por aumento da concentração de biomassa. Os modelos ModN e Droop proporcionaram bons ajustes para os dados de concentração de biomassa em culturas com concentração inicial de  $\text{NaNO}_3$  de  $75 \text{ mg L}^{-1}$ . Para esta cultura, considerou-se apenas a limitação por nitrogênio; portanto, os modelos ModNKx e ModNXmax não foram testados.

Os melhores modelos para prever o consumo de nitrogênio foram: ModN para culturas com concentração inicial de  $\text{NaNO}_3$  de  $75 \text{ mg L}^{-1}$ , ModNKx para  $300 \text{ mg L}^{-1}$  e ModNXmax para  $600 \text{ mg L}^{-1}$  e  $900 \text{ mg L}^{-1}$ .

Nos cultivos com concentração inicial de  $\text{NaNO}_3$  de  $75 \text{ mg L}^{-1}$ , em relação aos dados de consumo de nitrogênio, o modelo ModN forneceu um ajuste um pouco melhor, maior valor de  $R^2$  e menor valor de MSE, em comparação com o modelo Droop. Além disso, o valor da velocidade de crescimento específico máxima estimada pelo modelo ModN ( $\mu_{max}$ ) foi mais próximo do maior valor experimental das culturas ( $0,0275 \text{ h}^{-1}$  em  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ ) do que o valor da velocidade de crescimento específico máxima estimada pelo modelo Droop ( $\mu_m$ ).

O modelo ModNKx forneceu um ajuste melhor quando a concentração inicial de  $\text{NaNO}_3$  foi de  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , pois os valores das suas funções objetivo foram os mais baixos entre todos os modelos. Para esta concentração de  $\text{NaNO}_3$ , os modelos ModN e Droop não foram capazes de prever o comportamento experimental do consumo de nitrogênio. O modelo ModNXmax foi o único capaz de descrever o comportamento da concentração de nitrogênio nas culturas começando com  $600 \text{ mg L}^{-1}$  ou  $900 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ ; no entanto, o modelo não foi capaz de prever a interrupção do crescimento da biomassa no final dos cultivos. O valor previsto da biomassa final pelo modelo ModNXmax ( $X_{max}$ ) foi maior do que o valor experimental mais elevado de biomassa destas culturas ( $1,08 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ ). Na cultura começando com  $600 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ , os modelos ModN, ModNKx e Droop forneceram um bom ajuste para a curva de biomassa; no entanto, estes modelos não foram capazes de prever a concentração de nitrogênio. Nas culturas com  $900 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ , os modelos não forneceram um bom ajuste da concentração de biomassa, em particular, no final do cultivo. Os modelos ModN, ModNKx e Droop, também não conseguiram prever a concentração de nitrogênio dessas culturas, pois estes modelos sempre tenderam a zero a concentração de nitrogênio para promover a interrupção do crescimento da biomassa.

A expressão de Luedeking-Piret (1959) para a formação de carotenoides totais foi aplicada com sucesso absoluto em todos os modelos que foram testados neste trabalho em todas as concentrações iniciais de  $\text{NaNO}_3$ . Uma vez que esta expressão é dependente da

concentração de biomassa, quanto melhor foi o ajuste da biomassa, melhor ajuste para os carotenoides foi obtido; atingindo coeficientes de determinação de 0,99 para os modelos ModN e Droop para todas as concentrações iniciais de  $\text{NaNO}_3$ , e para os modelos ModNXmax e ModNKx para a concentração inicial de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ .

Portanto, os modelos propostos (ModN, ModNKx e ModNXmax) ajustaram com sucesso o consumo de nitrogênio por microalgas numa ampla faixa de concentrações deste substrato. Os resultados demonstraram que o consumo de nitrogênio pode ser descrito adequadamente por uma reação catalisada por nitrogênio de ordem  $n$ , tanto em meios limitados e não limitados por nitrogênio. No entanto, os modelos de crescimento de biomassa devem ser melhorados para descrever a interrupção do crescimento da biomassa quando nitrogênio ainda está disponível nas culturas sem limitação de nitrogênio. A simples equação de Luedeking-Piret também modelou com sucesso a produção de carotenoides, independentemente das expressões de consumo de nitrogênio e velocidade de crescimento específico.

## 7.2 Perspectivas

O presente trabalho demonstrou o potencial de produção de carotenoides e lipídios pela microalga *Dunaliella tertiolecta* BE 003. Ajustes podem ser feitos nas condições ambientais de cultivo objetivando maiores velocidades específicas de crescimento e produtividades de biomassa e produtos. Assim, a continuação dos estudos sobre esta microalga pode ser realizada a partir das seguintes sugestões:

Ajustar a concentração de nitrato de sódio no meio de cultivo, reduzindo a faixa de estudo, testando concentrações maiores que  $75 \text{ mg L}^{-1}$  e inferiores a  $600 \text{ mg L}^{-1}$ . Avaliar a concentração de lipídios totais ao longo do tempo, assim como foi realizado para os carotenoides totais. Além disso, a formação de outros produtos ao longo do tempo pode ser pesquisada, como proteínas e carboidratos, complementando o estudo sobre a composição desta microalga em condições otimizadas de crescimento e obtenção de produtos.

Os modelos para crescimento da biomassa precisam ser melhorados, especialmente aqueles para concentrações maiores que  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrato de sódio. Um ou mais parâmetros de ajuste deve(m) ser incluído(s) a fim de estabilizar o crescimento da biomassa mesmo quando ainda há nitrogênio disponível no meio de cultivo.

Uma vez obtidos os conteúdos de outros produtos a partir da biomassa ao longo do tempo, como lipídios, proteínas e carboidratos, a equação de Luedeking-Piret (1959) pode ser aplicada objetivando prever a formação destes produtos. Novos parâmetros podem ser incluídos nesta equação ou outras expressões podem ser testadas.

Partindo-se do modelo ModNKx, melhor modelo obtido nas condições otimizadas de cultivo, realizar a modelagem para estabelecer o volume de corte e tempo de reposição de

meio de cultivo para operação em batelada alimentada. Aplicar o resultado da modelagem em experimentos visando aumentos da produtividade de biomassa e produtos.

### 7.3 Referências Bibliográficas

BAKER, R.; GÜNTHER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, n. 10, p. 484-488, 2004.

BARBOSA, M. J.; ZIJFFERS, J. W.; NISWORO, A.; VAES, W.; VAN SCHOONHOVEN, J.; WIJFFELS, R. H. Optimization of biomass, vitamins, and carotenoid yield on light energy in a flat-panel reactor using the A-stat technique. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 89, n. 2, p. 233-242, 2005.

DEL CAMPO, J. A.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, H.; ANGELES VARGAS, M.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, v. 76, n. 1, p. 51-59, 2000.

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. 3, p. 689-733, 1968.

FAZELI, M. R.; TOFIGHI, H.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H. Effects of salinity on  $\beta$ -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 18, p. 2453-2456, 2006.

GUILLARD, R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: SMITH, W. e CHANLEY, M. (Ed.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*: Springer US, 1975. chap. 3, p. 29-60.

HU, C.; LIN, J.; LU, F.; CHOU, F.; YANG, D. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, v. 109, n. 2, p. 439-446, 2008.

KIM, W.; PARK, J. M.; GIM, G. H.; JEONG, S. -H.; KANG, C. M.; KIM, D. -J.; KIM, S. W. Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35, n. 1-2, p. 19-27, 2012.

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, v. 1, n. 4, p. 393-412, 1959.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 371-394, 1949.

---

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S.; RENGASAMY, R. Exploitation of *Dunaliella* for  $\beta$ -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, n. 3, p. 517-523, 2007.

SÁNCHEZ-ESTUDILLO, L.; FREILE-PELEGRIN, Y.; RIVERA-MADRID, R.; ROBLEDO, D.; NARVÁEZ-ZAPATA, J. A. Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga, *Dunaliella salina*. *Biotechnology Letters*, v. 28, n. 11, p. 787-791, 2006.

TAFRESHI, A. H.; SHARIATI, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, n. 1, p. 14-35, 2009.



## Referências Bibliográficas

ABALDE, J.; FABREGAS, J.; HERRERO, C.  $\beta$ -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. *Bioresource Technology*, v. 38, n. 2-3, p. 121-125, 1991.

ANDREASSON, K. I. M.; WÄNGBERG, S. -A. Reduction in growth rate in *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) and *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) induced by UV-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 86, n. 3, p. 227-233, 2007.

BAKER, R.; GÜNTHER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, n. 10, p. 484-488, 2004.

BARBOSA, M. J.; ZIJFFERS, J. W.; NISWORO, A.; VAES, W.; VAN SCHOONHOVEN, J.; WIJFFELS, R. H. Optimization of biomass, vitamins, and carotenoid yield on light energy in a flat-panel reactor using the A-stat technique. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 89, n. 2, p. 233-242, 2005.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007.

BEN-AMOTZ, A.; FISHIER, R. Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis- $\beta$ -carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel. *Food Chemistry*, v. 62, n. 4, p. 515-520, 1998.

BIROL, G.; DORUKER, P.; KIRDAR, B.; ÖNSAN, Z. I.; ÜLGEN, K. Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 7, p. 763-771, 1998.

BITOG, J. P.; LEE I. -B.; LEE C. -G.; KIM K. -S.; HWANG H. -S.; HONG S. -W.; SEO I. -H.; KWON K.-S.; MOSTAFA E. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. *Computers and Electronics in Agriculture*, v. 76, p. 131-147, 2011.

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

BOSMA, R.; VAN ZESSEN, E.; REITH, J. H.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Prediction of volumetric productivity of an outdoor photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, n. 5, p. 1108-1120, 2007.

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.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 145, n. 1, p. 79-99, 1991.

CARBALLO-CÁRDENAS, E. C.; TUAN, P. M.; JANSSEN, M.; WIJFFELS, R. H. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*, v. 20, n. 4-6, p. 139-147, 2003.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 87, n. 1, p. 1-14, 1999.

CHAGAS, A. L.; RIOS, A. O.; JARENKOW, A.; MARCÍLIO, N. R.; AYUB, M. A. Z.; RECH, R. Production of carotenoids and lipids by *Dunaliella tertiolecta* using CO<sub>2</sub> from beer fermentation. *Process Biochemistry*, v. 50, n. 6, p. 981-988, 2015.

CHELF, P.; BROWN, L. M.; WYMAN, C. E. Aquatic biomass resources and carbon dioxide trapping. *Biomass and Bioenergy*, v. 4, n. 3, p. 175-183, 1993.

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; NG, K. Y. S.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 1649-1655, 2011.

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

\_\_\_\_\_. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.

CHIU, S.; KAO, C.; TSAI, M.; ONG, S.; CHEN, C.; LIN, C. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 2, p. 833-838, 2009.

CHOI, W. Y.; KIM, G. -V.; LEE, S. -Y.; LEE, H. -Y. Biodiesel production from *Scenedesmus* sp. through optimized in situ acidic transesterification process. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 28, n. 3, p. 367-374, 2014.

DA FRÉ, N. C.; KOCHEM, L. H.; DIERINGS, T.; ROMAN, G. M.; RECH, R.; MARCÍLIO, N. R. Influence of temperature and salinity on the production of carotenoids by the microalgae *Dunaliella tertiolecta*, 16<sup>o</sup> World Conference of Food Science and Technology, 2012, Foz do Iguaçu, Brazil.

DA FRÉ, N. C.; KOCHEM, L. H.; DIERINGS, T.; ROMAN, G. M.; RECH, R.; MARCÍLIO, N. R. Influence of temperature and salinity on the cultivation of microalgae *Dunaliella tertiolecta* in airlift photobioreactor, Brazilian Coal Congress, 2011, Gramado, Brazil.



DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Conversion and Management*, v. 48, n. 7, p. 2169-2173, 2007.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 9135-9141, 2007.

DEL CAMPO, J. A.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, H.; ANGELES VARGAS, M.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, v. 76, n. 1, p. 51-59, 2000.

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

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. 3, p. 689-733, 1968.

ELENKOV, I.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; POPOV, S. Effect of salinity on lipid composition of *Cladophora vagabunda*. *Phytochemistry*, v. 42, n. 1, p. 39-44, 1996.

ERIKSEN, N. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, v. 30, n. 9, p. 1525-1536, 2008.

EVANS, R. W.; KATES, M.; GINZBURG, M.; GINZBURG, B. Z. Lipid composition of halotolerant algae, *Dunaliella parva* lerche and *Dunaliella tertiolecta*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, v. 712, n. 1, p. 186-195, 1982.

FABREGAS, J.; ABALDE, J.; HERRERO, C. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*, v. 83, n. 3-4, p. 289-304, 1989.

FARHAT, N.; RABHI, M.; FALLEH, H.; JOUINI, J.; ABDELLY, C.; SMAOUI, A. Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella salina* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, v. 47, n. 5, p. 1072-1077, 2011.

FAZELI, M. R.; TOFIGHI, H.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H. Effects of salinity on  $\beta$ -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 18, p. 2453-2456, 2006.

FRANCAVILLA, M.; TROTTA, P.; LUQUE, R. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 11, p. 4144-4150, 2010.

- FRANCISCO, É. C.; NEVES, D. B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 85, n. 3, p. 395-403, 2010.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, v. 43, n. 3, p. 228-265, 2004.
- GABARDO, S.; PEREIRA, G. F.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. The modeling of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* using whey as substrate in continuous A-Stat bioreactors. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 42, n. 9, p. 1243-1253, 2015.
- GAUTHIER, D. A.; TURPIN, D. H. Interactions between inorganic phosphate (Pi) assimilation, photosynthesis and respiration in the Pi-limited green alga *Selenastrum minutum*. *Plant, Cell & Environment*, v. 20, n. 1, p. 12-24, 1997.
- GAVRILESCU, M.; TUDOSE, R. Z. Concentric-tube airlift bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 19, n. 1, p. 37-44, 1998.
- GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 10, p. 401-409, 1997.
- GÓMEZ, P. I.; BARRIGA, A.; CIFUENTES, A. S.; GONZÁLEZ, M. A. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) chlorophyta. *Biological Research*, v. 36, n. 2, p. 185-192, 2003.
- GOUVEIA, E. R.; HOKKA, C. O.; BADINO-JR, A. C. The effects of geometry and operational conditions on gas holdup, liquid circulation and mass transfer in an airlift reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 20, p. 363-374, 2003.
- GROBBELAAR, J. U. Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, n. 3, p. 201-206, 2000.
- GUILLARD, R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. e CHANLEY, M. (Ed.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*: Springer US, 1975, chap. 3, p. 29-60.
- GUPTA, H.; FAN, L. Carbonation–Calcination Cycle Using High Reactivity Calcium Oxide for Carbon Dioxide Separation from Flue Gas. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 41, n. 16, p. 4035-4042, 2002.
- GUTIÉRREZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, R.; NAFIDI, A. Trend analysis using nonhomogeneous stochastic diffusion processes. Emission of CO<sub>2</sub>; Kyoto protocol in Spain. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*, v. 22, n. 1, p. 57-66, 2008.
- HALL, D. O.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; GUERRERO, E. C.; RAO, K. K.; GRIMA, E. M. Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: Modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 82, n. 1, p. 62-73, 2003.

HU, C.; LIN, J.; LU, F.; CHOU, F.; YANG, D. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, v. 109, n. 2, p. 439-446, 2008.

HU, Q.; KURANO, N.; KAWACHI, M.; IWASAKI, I.; MIYACHI, S. Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, n. 6, p. 655-662, 1998.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 8, p. 631-635, 2000.

INBARAJ, B. S.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Chromatography A*, v. 1102, n. 1-2, p. 193-199, 2006.

IWASAKI, I.; HU, Q.; KURANO, N.; MIYACHI, S. Effect of extremely high-CO<sub>2</sub> stress on energy distribution between photosystem I and photosystem II in a 'high-CO<sub>2</sub>' tolerant green alga, *Chlorococcum littorale* and the intolerant green alga *Stichococcus bacillaris*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 44, n. 3, p. 184-190, 1998.

JAHNKE, L. S.; WHITE, A. L. Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Plant Physiology*, v. 160, n. 10, p. 1193-1202, 2003.

JANSSEN, M.; SLENDERS, P.; TRAMPER, J.; MUR, L. R.; WIJFFELS, R. H. Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, n. 4-5, p. 298-305, 2001.

\_\_\_\_\_. Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 81, n. 2, p. 193-210, 2003.

JIANG, Y.; CHEN, F.; LIANG, S. Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Process Biochemistry*, v. 34, n. 6-7, p. 633-637, 1999.

JIANG, Y.; YOSHIDA, T.; QUIGG, A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 54, p. 70-77, 2012.

JIMÉNEZ, C.; COSSÍO, B. R.; NIELL, F. X. Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. *Aquaculture*, v. 221, n. 1-4, p. 331-345, 2003.

JIMÉNEZ, C.; NIELL, F. X. Influence of temperature and salinity on carbon and nitrogen content in *Dunaliella viridis* teodoresco under nitrogen sufficiency. *Bioresource Technology*, v. 38, n. 2-3, p. 91-94, 1991.

- JIN, E.; FETH, B.; MELIS, A. A mutant of the green alga *Dunaliella salina* constitutively accumulates zeaxanthin under all growth conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 81, n. 1, p. 115-124, 2003.
- JOHNSON, K. R.; ADMASSU, W. Mixed algae cultures for low cost environmental compensation in cultures grown for lipid production and wastewater remediation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 88, n. 6, p. 992-998, 2013.
- JORQUERA, O.; KIPERSTOK, A.; SALES, E. A.; EMBIRUÇU, M.; GHIRARDI, M. L. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 4, p. 1406-1413, 2010.
- KAERPINTONG, K.; SHOTIPRUK, A.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 2, p. 288-295, 2007.
- KIM, W.; PARK, J. M.; GIM, G. H.; JEONG, S. -H.; KANG, C. M.; KIM, D. -J.; KIM, S. W. Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35, n. 1-2, p. 19-27, 2012.
- KISHIMOTO, M.; OKAKURA, T.; NAGASHIMA, H.; MINOWA, T.; YOKOYAMA, S.; YAMABERI, K. CO<sub>2</sub> fixation and oil production using micro-algae. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 78, n. 6, p. 479-482, 1994.
- KOCHEM, L. H. Caracterização de fotobiorreator *airlift* para cultivo de microalgas. Trabalho de conclusão do curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2010.
- KOCHEM, L. H.; DA FRÉ, N. C., REDAELLI, C., RECH, R.; MARCÍLIO, N. R. Characterization of a novel flat-panel airlift photobioreactor with an internal heat exchanger. *Chemical Engineering & Technology*, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014.
- LAMERS, P. P.; JANSSEN, M.; DE VOS, R. C. H.; BINO, R. J.; WIJFFELS, R. H. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology*, v. 162, n. 1, p. 21-27, 2012.
- LEE, Y. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *Journal of Applied Phycology*, v. 9, n. 5, p. 403-411, 1997.
- LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from Microalgae. *Biotechnology Progress*, v. 24, n. 4, p. 815-820, 2008.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2001a, p. F4.3.1-F4.3.8.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids. In: (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2001b, p. F4.2.1-F4.2.6.

LIU, L.; GUO, Z.; LU, J.; XU, X. Kinetic model for microbial growth and desulphurisation with *Enterobacter* sp. *Biotechnology Letters*, v. 37, n. 2, p. 375–381, 2015.

LONG, S. P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P. G. Photoinhibition of Photosynthesis in Nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 45, p. 633-662, 1994.

LOUBIÈRE, K.; OLIVO, E.; BOUGARAN, G.; PRUVOST, J.; ROBERT, R.; LEGRAND, J. A new photobioreactor for continuous microalgal production in hatcheries based on external-loop airlift and swirling flow. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 1, p. 132-147, 2009.

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

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, v. 1, n. 4, p. 393-412, 1959.

MARTÍNEZ, M. E.; JIMÉNEZ, J. M.; EL YOUSFI, F. Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, v. 67, n. 3, p. 233-240, 1999.

MARXEN, K.; VANSELOW, K.; LIPPEMEIER, S.; HINTZE, R.; RUSER, A.; HANSEN, U. A photobioreactor system for computer controlled cultivation of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, v. 17, n. 6, p. 535-549, 2005.

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

MEDINA, A. R.; GRIMA, E. M.; GIMÉNEZ, A. G.; GONZÁLEZ, M. J. I. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, v. 16, n. 3, p. 517-580, 1998.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Effects of Ripening, Cultivar Differences, and Processing on the Carotenoid Composition of Mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 1, p. 128-130, 1998.

MERCHUK, J. C.; RONEN, M.; GIRIS, S.; ARAD, S. Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium* sp. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59, n. 6, p. 705-713, 1998.

MINOWA, T.; YOKOYAMA, S.; KISHIMOTO, M.; OKAKURA, T. Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *Fuel*, v. 74, n. 12, p. 1735-1738, 1995.

MOGEDAS, B.; CASAL, C.; FORJÁN, E.; VÍLCHEZ, C.  $\beta$ -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 108, n. 1, p. 47-51, 2009.

- MOLINA, E.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; GARCÍA CAMACHO, F.; CAMACHO RUBIO, F.; CHISTI, Y. Scale-up of tubular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, n. 3, p. 355-368, 2000.
- \_\_\_\_\_. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, v. 92, n. 2, p. 113-131, 2001.
- MOLINA GRIMA, E.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GARCÍA CAMACHO, F.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, v. 70, n. 1-3, p. 231-247, 1999.
- MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 371-394, 1949.
- MURAKAMI, M.; IKENOUCHI, M. The biological CO<sub>2</sub> fixation and utilization project by rite (2) - Screening and breeding of microalgae with high capability in fixing CO<sub>2</sub>. *Energy Conversion and Management*, v. 38, Supplement, n. 0, p. S493-S497, 1997.
- NELDER, J. A.; MEAD, R. A simplex method for function minimization. *The Computer Journal*, v. 7, n. 4, p. 308-313, 1965.
- OLLIVIER, B.; CAUMETTE, P.; GARCIA, J.; MAH, R. A. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiological Reviews*, v. 58, n. 1, p. 27-38, 1994.
- OROSA, M.; TORRES, E.; FIDALGO, P.; ABALDE, J. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, n. 3, p. 553-556, 2000.
- PRASAD, S.; SRIKANTH, K.; LIMAYE, A. M.; SIVAPRAKASAM, S. Homo-fermentative production of D-lactic acid by *Lactobacillus* sp. employing casein whey permeate as a raw feed-stock. *Biotechnology Letters*, v. 36, n. 6, p. 1303-1307, 2014.
- PULZ, O.; GERBSCH, N.; BUCHHOLZ, R. Light energy supply in plate-type and light diffusing optical fiber bioreactors. *Journal of Applied Phycology*, v. 7, n. 2, p. 145-149, 1995.
- RADWAN, S. S. Sources of C<sub>20</sub>-polyunsaturated fatty acids for biotechnological use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 4, p. 421-430, 1991.
- RAJA, R.; HEMAISWARYA, S.; RENGASAMY, R. Exploitation of *Dunaliella* for β-carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, n. 3, p. 517-523, 2007.
- RAVEN, J. A.; EVANS, M. C. W.; KORB, R. E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms. *Photosynthesis Research*, v. 60, n. 2, p. 111-150, 1999.
- REBOLLOSO-FUENTES, M. M.; NAVARRO-PÉREZ, A.; GARCÍA-CAMACHO, F.; RAMOS-MIRAS, J. J.; GUIL-GUERRERO, J. L. Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 6, p. 2966-2972, 2001.

RODEN, E. E.; ZACHARA, J. M. Microbial reduction of crystalline iron (III) oxides: influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environmental Science & Technology*, v. 30, p. 1618-1628, 1996.

ROLEDA, M. Y.; SLOCOMBE, S. P.; LEAKEY, R. J. G.; DAY, J. G.; BELL, E. M.; STANLEY, M. S. 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. 439-449, 2013.

SÁNCHEZ-ESTUDILLO, L.; FREILE-PELEGRIN, Y.; RIVERA-MADRID, R.; ROBLEDO, D.; NARVÁEZ-ZAPATA, J. A. Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga, *Dunaliella salina*. *Biotechnology Letters*, v. 28, n. 11, p. 787-791, 2006.

SÁNCHEZ MIRÓN, A.; CONTRERAS GÓMEZ, A.; GARCÍA CAMACHO, F.; MOLINA GRIMA, E.; CHISTI, Y. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology*, v. 70, n. 1-3, p. 249-270, 1999.

SCRAGG, A. H.; ILLMAN, A. M.; CARDEN, A.; SHALES, S. W. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, v. 23, n. 1, p. 67-73, 2002.

SHUPING, Z.; YULONG, W.; MINGDE, Y.; KALEEM, I.; CHUN, L.; TONG, J. Production and characterization of bio-oil from hydrothermal liquefaction of microalgae *Dunaliella tertiolecta* cake. *Energy*, v. 35, n. 12, p. 5406-5411, 2010.

SIERRA, E.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; GARCÍA, J. L.; GONZÁLEZ, C.; MOLINA, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*, v. 138, n. 1-3, p. 136-147, 2008.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

SOARES, R. D. P.; SECCHI, A. R. EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimisation. *Computer Aided Chemical Engineering*, v. 14, p. 947-952, 2003.

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

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; DE CARVALHO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 15, p. 5892-5896, 2010.

TAFRESHI, A. H.; SHARIATI, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, n. 1, p. 14-35, 2009.

TAKAGI, M.; KARSENO; YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, n. 3, p. 223-226, 2006.

- TANG, H.; ABUNASSER, N.; GARCIA, M. E. D.; CHEN, M.; SIMON NG, K. Y.; SALLEY, S. O. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3324-3330, 2010.
- TORNABENE, T. G.; HOLZER, G.; LIEN, S.; BURRIS, N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 5, n. 6, p. 435-440, 1983.
- USUI, N.; IKENOUCI, M. The biological CO<sub>2</sub> fixation and utilization project by RITE(1) - Highly-effective photobioreactor system. *Energy Conversion and Management*, v. 38, Supplement, n. 0, p. S487-S492, 1997.
- VATCHEVA, I.; JONG, H.; BERNARD, O.; MARS, N. J. I. Experiment selection for the discrimination of semi-quantitative models of dynamical systems. *Artificial Intelligence*, v. 170, n. 4-5, p. 472-506, 2006.
- VOLKMAN, J. K.; JEFFREY, S. W.; NICHOLS, P. D.; ROGERS, G. I.; GARLAND, C. D. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 128, n. 3, p. 219-240, 1989.
- WALKER, T.; PURTON, S.; BECKER, D.; COLLET, C. Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Reports*, v. 24, n. 11, p. 629-641, 2005.
- WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008.
- WANG, X. D.; KRINSKY, N. I.; BENOTTI, P. N.; RUSSELL, R. M. Biosynthesis of 9-cis-Retinoic Acid from 9-cis- $\beta$ -Carotene in Human Intestinal Mucosa in Vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 313, n. 1, p. 150-155, 1994.
- WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 4, n. 3, p. 287-295, 2010.
- XU, L.; WEATHERS, P. J.; XIONG, X.; LIU, C. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Engineering in Life Sciences*, v. 9, n. 3, p. 178-189, 2009.
- YAMABERI, K.; TAKAGI, M.; YOSHIDA, T. Nitrogen depletion for intracellular triglyceride accumulation to enhance liquefaction yield of marine microalgal cells into a fuel oil. *Journal of Marine Biotechnology*, v. 6, n. 1, p. 44-48, 1998.
- YE, Z. -W.; JIANG, J. -G.; WU, G. -H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnology Advances*, v. 26, n. 4, p. 352-360, 2008.
- YEH, T. M.; DICKINSON, J. G.; FRANCK, A.; LINIC, S.; THOMPSON, L. T.; SAVAGE, P. E. Hydrothermal catalytic production of fuels and chemicals from aquatic biomass. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 88, n. 1, p. 13-24, 2013.
- YONGMANITICHAI, W.; WARD, O. P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry*, v. 30, n. 9, p. 2963-2967, 1991.



YUAN, S.; ZHOU, X.; CHEN, R.; SONG, B. 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.; LEE, S. B.; PARK, J. M.; LEE, C.; YANG, J. Carbon Dioxide Fixation by Algal Cultivation Using Wastewater Nutrients. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 69, n. 4, p. 451-455, 1997.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007.

ZHANG, X. W.; GONG, X. D.; CHEN, F. Kinetic models for astaxanthin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 23, n. 1, p. 691-696, 1999a.

ZHANG, X. W.; SHI, X. M.; CHEN, F. A kinetic model for lutein production by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 6, p. 503-507, 1999b.

ZHUKOVA, N. V.; AIZDAICHER, N. A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, v. 39, n. 2, p. 351-356, 1995.



## **Apêndice A**

### **Influence of temperature and salinity over CO<sub>2</sub> biofixation by the microalga *Dunaliella tertiolecta***

Este trabalho foi apresentado e publicado nos Anais da *International Conference on Coal Science and Technology*, realizada em outubro de 2011 em Oviedo, Espanha.

## Influence of temperature and salinity over CO<sub>2</sub> biofixation by the microalga *Dunaliella tertiolecta*

Nicéia Chies Da Fré<sup>1</sup>, Rosane Rech<sup>2\*</sup>, Nilson Romeu Marcílio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

### Abstract

Microalgae *Dunaliella tertiolecta* is a unicellular photosynthetic microorganism that can fix CO<sub>2</sub> efficiently from the atmosphere and from industrial exhaust gases. In the present work, the effects of medium salinity and temperature over the growth of the marine microalgae *D. tertiolecta* in airlift photobioreactor were studied. The experiments were performed according to a central composite design. Growth curves, CO<sub>2</sub> biofixation rates and lipid content of the resulted biomass were determined for each experiment. The best growth conditions were 0.715 M NaCl and 28 °C. Under these conditions,  $0.39 \pm 0.03$  g/L of biomass were obtained in 93 hours of culture and the lipid content of biomass was  $11.75 \pm 1.8$  %. The greatest values of CO<sub>2</sub> biofixation rate ( $11.34 \pm 1.6$  g CO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>.h) occurred at 28 °C, independent of the medium salinity.

**Keywords:** microalgae, *Dunaliella tertiolecta*, lipid, airlift photobioreactor.

\*Correspondence to: Rosane Rech, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, PO Box 15090 – ZC 91501-970, Bento Gonçalves Avenue, 9,500, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 6683; Fax: +55 51 3308 7048; E-mail: rrech@ufrgs.br

## 1 Introduction

Microalgae can fix carbon dioxide from different sources including CO<sub>2</sub> from the atmosphere, from industrial exhaust gases and in form of soluble carbonates. The cultivation of microalgae under controlled conditions promotes carbon dioxide biofixation and yields products of commercial interest as pigments, lipids, proteins, sugars, among others (Sydney *et al.*, 2010). Additionally, it has been estimated that biomass production per hectare may be 10 or more times higher for microalgae than for conventional crops (Chisti, 2007; Chisti, 2008).

*Dunaliella tertiolecta* is a marine microalgae that is simple to cultivate, does not clump on surfaces and is highly salt tolerant, which might be useful in large-scale outdoor cultivation (Elenkov *et al.*, 1996).

Salt tolerance of *D. tertiolecta* has been reported to be in the range of 0.17–1.5 M of NaCl (Olliver *et al.*, 1994). However other investigators working on *D. tertiolecta* have gone far beyond these limits by quoting NaCl tolerance range of 0.05–3.00 M (Jahnke and White, 2003).

In this study, the effects of the medium salinity (0.430 to 1.0 M NaCl) and temperature (21 to 35 °C) over the growth of *D. tertiolecta* in airlift photobioreactor was evaluated. The CO<sub>2</sub> biofixation rates and the lipid and pigment content of the resulted biomass were also measured.

## 2 Methods

The experiments were performed with the unicellular green marine microalgae *Dunaliella tertiolecta*. The cells were maintained in 250 mL Erlenmeyer flasks with 50 mL of culture medium f/2 (Guillard, 1975) in camera germination under controlled temperature (20 °C) with a photoperiod of 12/12 hours (light/dark) provided by fluorescent lamp light.

In order to obtain an adequate volume of culture for inoculation of photobioreactors, pre-cultures were done in rotatory shaker. Homogeneous aliquots of 10 ml of culture held in camera germination were inoculated in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of culture medium f/2 plus 22 g/L (0.43 M NaCl). The flasks were kept in rotatory shaker at 28 °C with continuous light for 12 days.

The experiments were performed in flat-panel-airlift photobioreactors with an internal heat-exchanger (FPA-IHE) (Kochem, 2010). The pre-cultures were inoculated in sterile photobioreactors containing 2,000 mL of culture medium f/2 plus NaCl (0.430 M, 0.513 M, 0.715 M, 0.917 M or 1.0 M) according to the experimental design. The photobioreactors were continuously illuminated at 18,000 lux by a panel of electronic lamps (24 × 13 W cool light, Tashibra). The temperature was kept constant (21, 23, 28, 33 or 35 °C) by passing water from

a thermostatic bath through the heat exchanger of the photobioreactor. The cultures were performed in triplicate according to the central composite design (CCD) showed in Table 1.

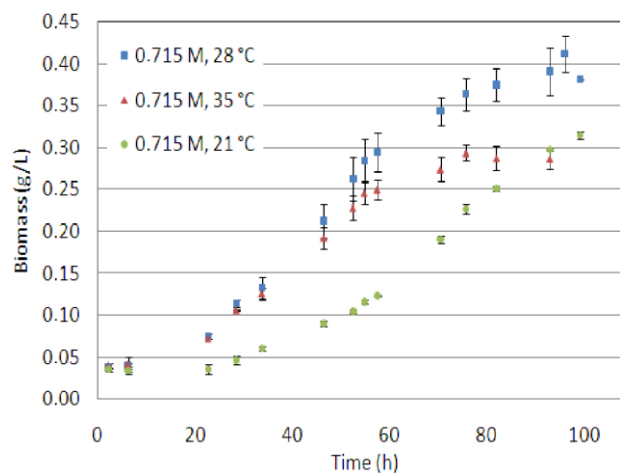
**Table A.1:** Central composite design of experiments.

Number of experiment	Coded variables		Real variables	
	$x_1$	$x_2$	Temperature (°C)	Salinity (M NaCl)
1	-1	-1	23	0.513
2	1	-1	33	0.513
3	-1	1	23	0.917
4	1	1	33	0.917
5	-1.41	0	21	0.715
6	1.41	0	35	0.715
7	0	-1.41	28	0.430
8	0	1.41	28	1.000
9	0	0	28	0.715

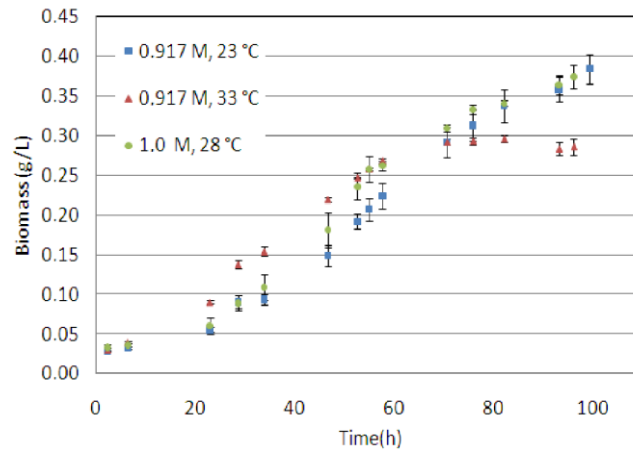
The growth was followed by measures of the optical density at 570 nm three times a day and correlated with cell dry weight (CDW). After 96 hours of culture, the biomass from the photobioreactors was separated from medium by centrifugation, washed with distilled water and lyophilized. The total lipid content of the lyophilized biomass was determined by Soxhlet.

### 3 Results and Discussion

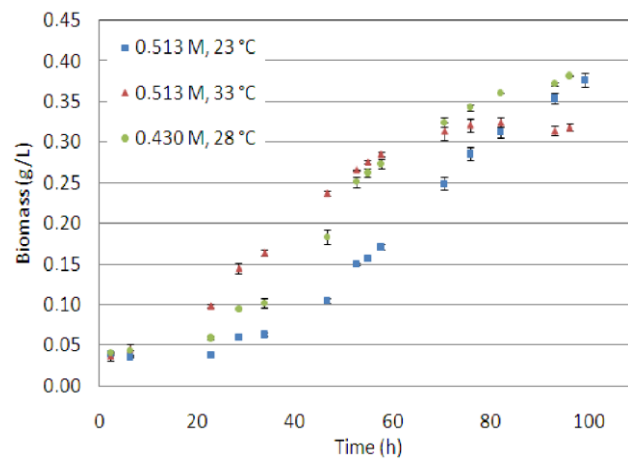
The growth curves of *D. tertiolecta* in FPA-IHE photobioreactors are shown in Figures 1, 2 and 3. The highest biomass concentration was achieved at 0.715 M NaCl and 28 °C. The experiments performed at 33 °C and 35 °C reached the decline phase around 70 hours, what did not occur at other temperatures.



**Figure A.1:** Growth of *Dunaliella tertiolecta* at salinity of 0.715 M and different temperatures.



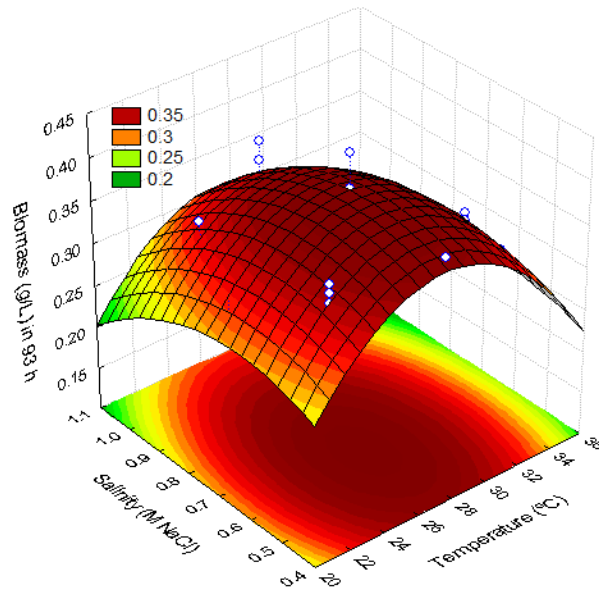
**Figure A.2:** Growth of *Dunaliella tertiolecta* at salinity the higher salinities of CCD.



**Figure A.3:** Growth of *Dunaliella tertiolecta* at salinity the lower salinities of CCD.

The response surface for biomass values at 93 hours of culture as function of temperature and salinity is shown in Figure 4.

Analyzing the response surface, it is possible to conclude that the best conditions for growth of *D. tertiolecta* are temperature of 28 °C and salinity of 0.715 M NaCl. Under these conditions,  $0.39 \pm 0.03$  g/L of biomass were achieved at 93 hours of culture.

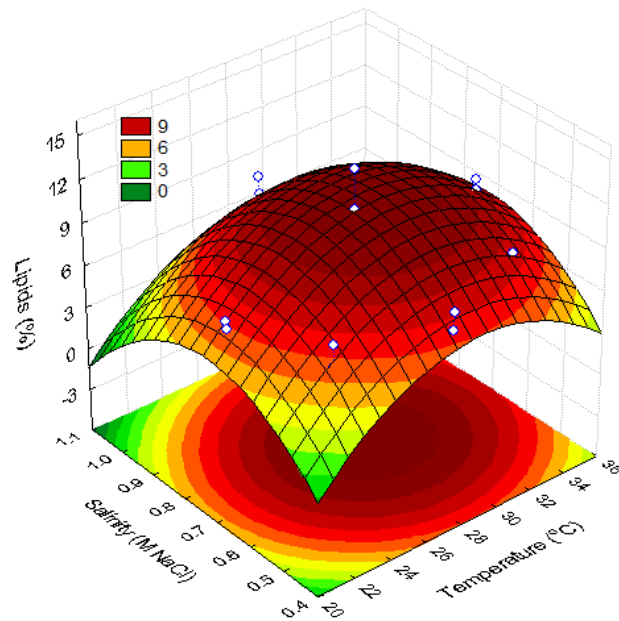


**Figure A.4:** Response surface for biomass values (g/L) in 93 hours of culture as a function of temperature and salinity.

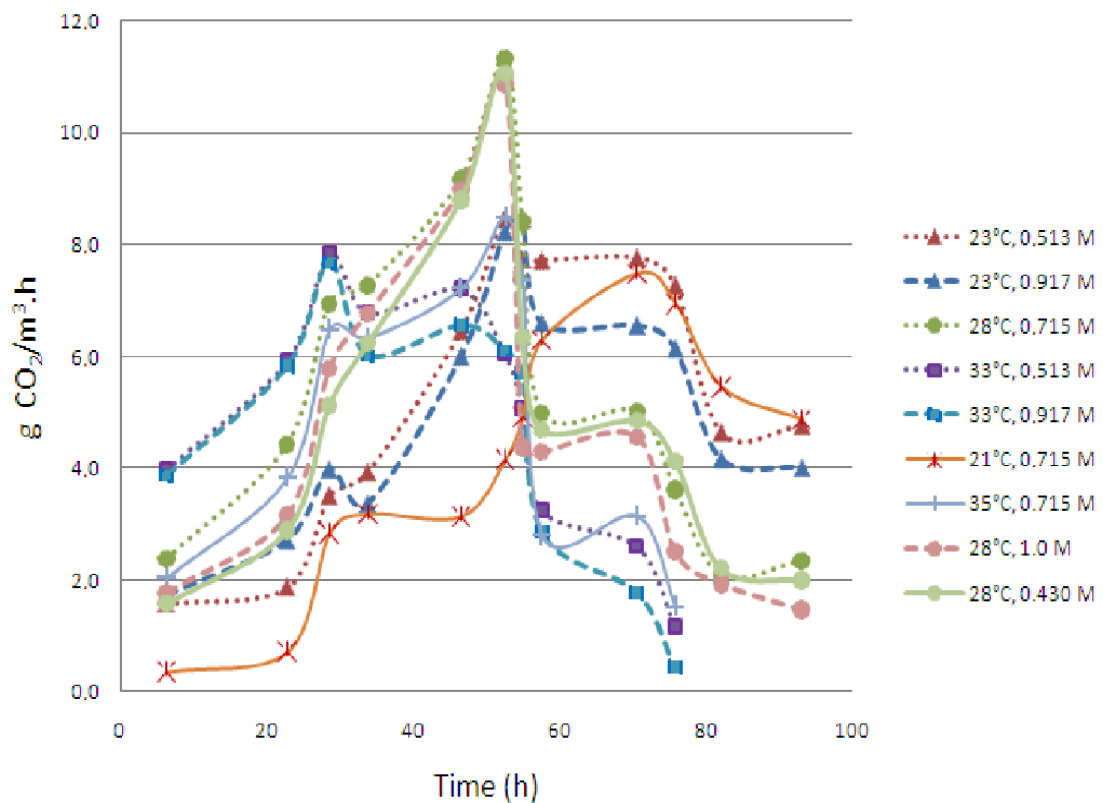
Figure 5 shows the response surface for total lipid content of cells with temperature and salinity. The highest lipid content occurred at 28 °C and 0.715 M NaCl, the same condition of the highest biomass concentration. Under these conditions, a total lipid content of  $11.75 \pm 1.8\%$  was achieved. This value is very similar to that obtained by Sydney *et al.* (2010), which was  $11.44 \pm 1.8\%$ , but at different growth conditions from those used in this work.

The CO<sub>2</sub> biofixation rates are shown in Figure 6. The highest biofixation rates ( $11.34 \pm 1.6$  g CO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>.h) were achieved at 28 °C, being independent of medium salinity.





**Figure A.5:** Response surface for total lipid content (%) as a function of temperature and salinity.



**Figure A.6:** Average rates of CO<sub>2</sub> fixation in microalgae *Dunaliella tertiolecta* grown over 100 h for the experiments.

## 4 Conclusions

In this work, the biomass production, total lipid content and CO<sub>2</sub> biofixation rate by *D. tertiolecta* were optimized by central composite design with temperature and medium salinity. At temperature of 28 °C and salinity of 0.715 M NaCl the highest values of biomass and lipid content were achieved.

The highest CO<sub>2</sub> biofixation rates occurred at 28 °C, independent of the medium salinity.

## 5 References

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

\_\_\_\_\_. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.

ELENKOV, I.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; POPOV, S. Effect of salinity on lipid composition of *Cladophora vagabunda*. *Phytochemistry*, v. 42, n. 1, p. 39-44, 1996.

GUILLARD, R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. e CHANLEY, M. (Ed.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*: Springer US, 1975. chap. 3, p. 29-60.

JAHNKE, L. S.; WHITE, A. L. Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Plant Physiology*, v. 160, n. 10, p. 1193-1202, 2003.

KOCHEM, L. H. Caracterização de fotobiorreator *airlift* para cultivo de microalgas. Trabalho de conclusão do curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2010.

OLLIVIER, B.; CAUMETTE, P.; GARCIA, J.; MAH, R. A. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiological Reviews*, v. 58, n. 1, p. 27-38, 1994.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; DE CARVALHO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 15, p. 5892-5896, 2010.

## **Apêndice B**

### **Influência das fontes e concentrações de nitrogênio no crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator *airlift***

Este trabalho foi apresentado e publicado nos Anais do IV Congresso Brasileiro de Carvão Mineral, realizado em agosto de 2013 em Gramado, RS.

## Influência das fontes e concentrações de nitrogênio no crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator *airlift*

Nicéia Chies Da Fré<sup>1\*</sup>, Géssica M. Roman<sup>2</sup>, Tobias Dierings<sup>1</sup>, Rosane Rech<sup>2</sup> e Nilson Romeu Marcílio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia Química, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, RS, Brasil

### Resumo

A emissão de dióxido de carbono é considerada uma das principais responsáveis pelo aquecimento global. Microalgas são microrganismos fotossintéticos capazes de utilizar CO<sub>2</sub>, inclusive em usinas termoelétricas, produzindo matéria orgânica. Dentro deste contexto, neste trabalho foi investigado o efeito da adição de nitrogênio na forma de sais sobre a quantidade de biomassa nos cultivos da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator *airlift* e, conseqüentemente, a biofixação de CO<sub>2</sub>. Foram testados três tipos de sais: NaNO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> na concentração de 0,050 M e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> na concentração de 0,025 M. Os melhores resultados foram obtidos com o NaNO<sub>3</sub>. Posteriormente foram testadas três diferentes concentrações de NaNO<sub>3</sub> (300 mg/L, 600 mg/L e 900 mg/L). Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 300 mg/L, obtendo-se  $1,29 \pm 0,02$  g/L de biomassa em 188 h de cultivo e a taxa de biofixação de CO<sub>2</sub> de  $16,9 \pm 0,8$  g CO<sub>2</sub>/(m<sup>3</sup> h). As concentrações maiores de NaNO<sub>3</sub> inibiram o crescimento das microalgas.

**Palavras-chave:** microalga, *Dunaliella tertiolecta*, fotobiorreator, nitrogênio.

\* Autor para correspondência: Nicéia Chies Da Fré, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Engenheiro Luiz Englert, s/nº, 90040-040 Porto Alegre, RS, Brasil.

Tel.: +55 51 33083444; E-mail: niceia@enq.ufrgs.br

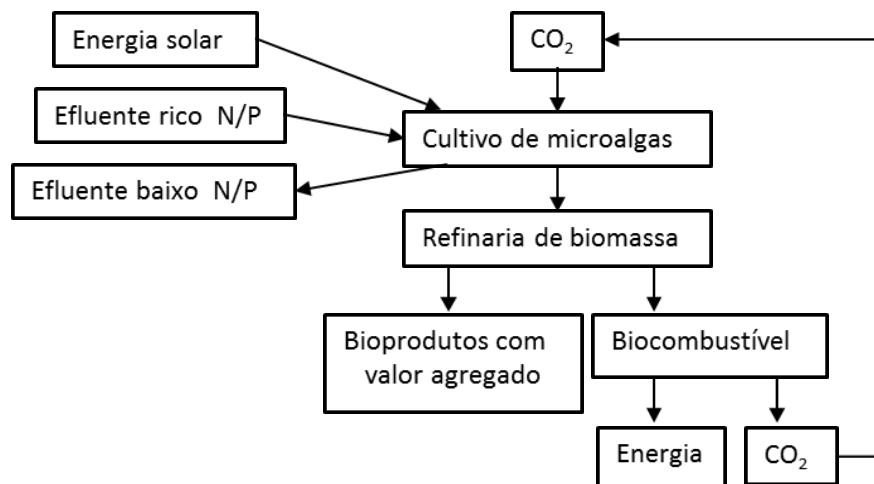
## 1 Introdução

A produção de microalgas pode ser justificada por apresentar diversas vantagens, dentre as quais podem ser destacadas: a remoção de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) de gases de combustão industrial por biofixação de algas, reduzindo as emissões de gases de efeito estufa de uma empresa ou de um processo; após a extração do óleo, por exemplo, o restante da biomassa de algas pode ser processado para obtenção de etanol, metano, ração animal, adubo orgânico devido à sua alta razão N/P, ou simplesmente queimada para cogeração de energia (Mata *et al.*, 2010).

Além das citadas acima, o cultivo de microalgas oferece outras vantagens, entre elas: o cultivo de microalgas é um sistema biológico eficiente na utilização da energia solar para a produção de matéria orgânica, sendo que, muitas espécies crescem mais rapidamente do que as plantas terrestres, fato que possibilita maiores rendimentos anuais de biomassa (maior produtividade); sua natureza unicelular assegura uma biomassa com mesma composição bioquímica, o que não ocorre com as plantas terrestres que apresentam compostos localizados em partes específicas: nos frutos, folhas, sementes ou raízes; por manipulação das condições ambientais de cultivo (luz, temperatura e nutrientes, por exemplo) muitas espécies podem ser induzidas a sintetizar e acumular altas concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios etc. Tais compostos apresentam um elevado valor comercial, principalmente por serem produtos naturais; podem crescer bem em regiões com condições climáticas extremas. Os cultivos podem ser desenvolvidos com água marinha ou de estuários, a qual não pode ser convencionalmente empregada no cultivo de plantas com valor para a agricultura, ou com água proveniente de diversos outros processos de produção (agropecuária, indústrias, dejetos domésticos etc.); o ciclo de vida da maioria das microalgas se completa em poucas horas, o que favorece a seleção de cepas e o melhoramento genético das espécies (Derner *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, as microalgas são criadas em sistemas fechados (fotobiorreatores) ou lagoas abertas que são aeradas ou expostas ao ar para permitir a captura de  $\text{CO}_2$  do ambiente. A atmosfera contém apenas 0,03 % a 0,06 % de  $\text{CO}_2$ , e esta baixa concentração pode tornar o crescimento celular lento. Por outro lado, os gases de exaustão industriais, tais como gases de combustão contêm até 15 % de  $\text{CO}_2$ , fornecendo uma fonte rica em  $\text{CO}_2$  para o cultivo de microalgas e potencialmente uma rota mais eficiente para a biofixação de  $\text{CO}_2$  (Wang *et al.*, 2008).

A utilização de microalgas para mitigação de  $\text{CO}_2$  oferece inúmeras vantagens, entre elas, a possível reciclagem completa de  $\text{CO}_2$  (Figura 1), porque o dióxido de carbono é convertido em energia química através da fotossíntese, que pode ser convertido em combustíveis usando tecnologias existentes.



**Figura B.1:** Fluxograma conceitual de processos combinados utilizando microalgas para produção de biocombustíveis, biomitigação de CO<sub>2</sub> e remoção de N/P de efluentes. Entradas: fonte de carbono, CO<sub>2</sub>; fontes de nitrogênio e fósforo, efluentes ricos em N/P; fonte de energia, energia solar. Saídas: efluentes com baixo N/P, bioprodutos com valor agregado e biocombustíveis (Wang *et al.*, 2008).

O meio de cultivo deve fornecer os nutrientes necessários para o crescimento das microalgas. Segundo Reboloso-Fuentes *et al.* (2001) os elementos mais importantes que constituem as células das algas são carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. Outros elementos essenciais incluem ferro, magnésio, elementos traços e, em alguns casos, silício.

Normalmente, a única fonte de carbono utilizada no cultivo de microalgas é o CO<sub>2</sub>. Já as fontes mais comuns de nitrogênio são nitrato, amônia e ureia (ou combinações desses). Vale a pena mencionar que o amônio é a forma química do nitrogênio mais facilmente assimilada pelo fitoplâncton. Ao contrário do nitrato, não requer redução, sendo assimilado como aminoácidos. Entretanto, o estudo desenvolvido por Wang *et al.* (2008) indicou que amônio em alta concentração tem efeitos tóxicos sobre o crescimento das microalgas. Além disso, a amônia pode ir para a atmosfera, causando problemas ambientais e econômicos. Portanto, a seleção de fontes de nitrogênio para o cultivo de microalgas deve ser baseada em dados experimentais.

Segundo Wang *et al.* (2008), águas residuais ou águas residuais secundárias são fontes baratas de nitrogênio e contêm grandes quantidades de diferentes formas de nitrogênio. No entanto, o uso de águas residuais para o cultivo de microalgas pode causar problemas de contaminação e, portanto, deve ser utilizada com precaução.

## 2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados com a espécie de microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator *airlift* de 2,2 litros (Kochem, 2010).

A manutenção das células foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com 50 mL de meio de cultura f/2 (Guillard, 1975), mantidos em câmara de germinação sob condições controladas de temperatura (20 °C), com fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro, proporcionado por lâmpada fluorescente tipo luz do dia.

A fim de obter um volume adequado de cultura para inocular os fotobiorreatores, foi realizado um cultivo inicial em estufa incubadora rotatória. Foram retiradas alíquotas homogêneas de 10 mL do cultivo mantido na câmara de germinação, as quais foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio f/2 acrescido de 22 g/L (0,43 M NaCl). Os frascos foram mantidos em estufa incubadora rotatória a temperatura de 28 °C com luz contínua durante 12 dias.

Estes cultivos iniciais foram inoculados em fotobiorreatores estéreis contendo 2,0 L de meio f/2 acrescido de NaCl 0,715 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,005 M e  $\text{NaNO}_3$  0,050 M,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,025 M ou  $\text{KNO}_3$  0,050 M, como fonte de nitrogênio. Os fotobiorreatores foram iluminados continuamente a 17,5 klx por um painel de lâmpadas eletrônicas (24 × 13 W, luz branca, Tashibra). A temperatura foi mantida constante em 28 °C através da passagem de água de um banho termostático pelo trocador de calor do fotobiorreator. Foi adicionado  $\text{CO}_2$  aos cultivos a fim de manter o pH entre 7,5 e 8,5.

Após a escolha do sal, fonte de nitrogênio, foram realizados novos cultivos variando-se a concentração do sal  $\text{NaNO}_3$ . As culturas foram inoculadas em fotobiorreatores estéreis contendo 2,0 L de meio f/2 acrescido de NaCl 0,715 M, e  $\text{NaNO}_3$  na concentração de 75 mg/L (concentração padrão do meio f/2), 300 mg/L, 600 mg/L ou 900 mg/L. As condições de cultivo foram as mesmas utilizadas nos cultivos anteriores para a escolha do sal.

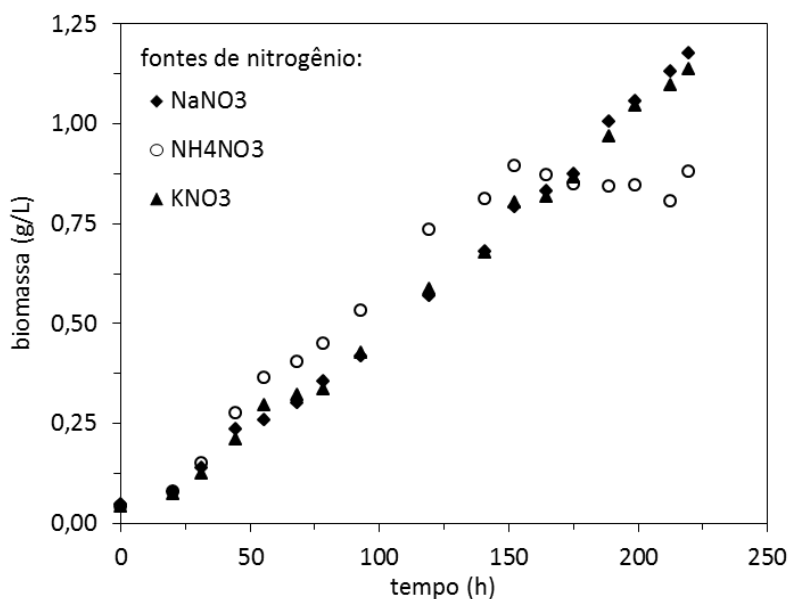
O crescimento das culturas foi acompanhado através de medidas de densidade ótica a 750 nm em espectrofotômetro realizadas duas vezes ao dia com intervalos aproximados de doze horas e correlacionados com peso-seco.

A duração média de cada cultivo foi 188 h, tempo necessário para atingir a fase de estabilização ou de início de declínio da cultura. Ao final do cultivo, as células de cada fotobiorreator foram separadas do meio por centrifugação, lavadas com água e novamente centrifugadas. Posteriormente, a remoção completa de água do material centrifugado de cada tratamento foi obtida através do processo de liofilização. Posteriormente serão avaliados os teores de carotenoides e lipídios das células de cada cultivo.

As taxas de biofixação de  $\text{CO}_2$  foram calculadas a partir das derivadas das curvas de biomassa para cada concentração de  $\text{NaNO}_3$ .

### 3 Resultados e Discussões

A microalga *D. tertiolecta* foi capaz de utilizar  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  como fonte de nitrogênio para o crescimento. Até aproximadamente 150 h de cultivo, as maiores quantidades de biomassa foram obtidas com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , porém a fase de estabilização foi atingida antes do que nos cultivos realizados com  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ . Os resultados obtidos com estes dois sais foram muito semelhantes, com quantidades de biomassa levemente superiores quando utilizado o  $\text{NaNO}_3$  (Figura 2).



**Figura B.2:** Valores médios de biomassa (g/L) da microalga *Dunaliella tertiolecta* cultivadas com diferentes sais fontes de nitrogênio.

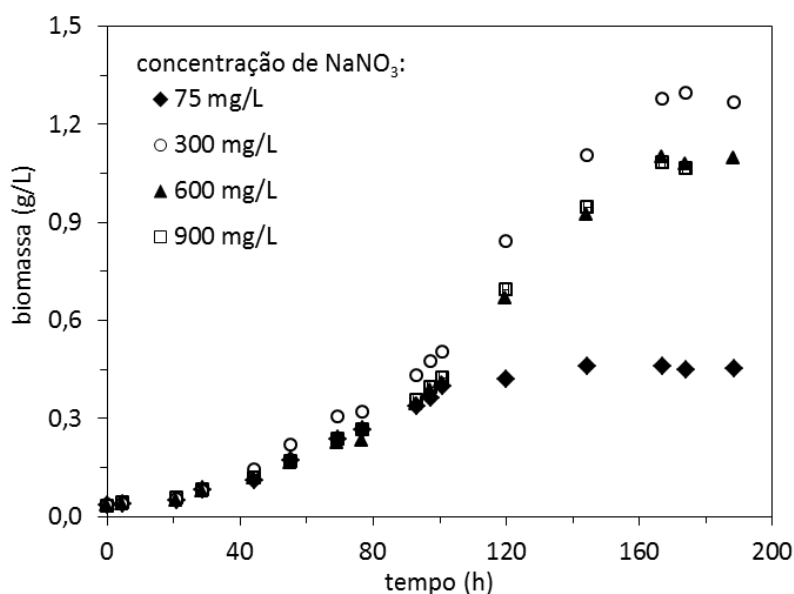
Chen *et al.* (2011) utilizaram o meio de cultura Erdschreiber modificado com várias concentrações de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) a fim de determinar a melhor fonte de nitrogênio para o crescimento microalga *D. tertiolecta*. Esse organismo foi capaz de usar tanto o nitrato quanto amônio como fonte de nitrogênio. Porém, a maior produção de biomassa foi obtida utilizando nitrogênio inorgânico na forma de nitrato e não na forma de amônio, confirmando os resultados obtidos nesse trabalho.

Na Figura 3 são apresentadas as curvas de crescimento da microalga *D. tertiolecta* com diferentes concentrações de  $\text{NaNO}_3$ . Observa-se que o meio de cultivo f/2 apresentou produção de biomassa muito menor comparada aos meios suplementados com maiores concentrações de  $\text{NaNO}_3$ . A maior quantidade de biomassa foi obtida nos cultivos com 300 mg/L de  $\text{NaNO}_3$ , sendo que os cultivos com 600 mg/L e 900 mg/L de  $\text{NaNO}_3$  resultaram em quantidades de biomassa levemente menores. Portanto, pode-se concluir que a adição de  $\text{NaNO}_3$  aos cultivos como fonte de nitrogênio é imprescindível, porém quantidades elevadas deste sal inibiram o crescimento das microalgas. A maior quantidade de biomassa foi obtida nos cultivos com 300 mg/L de  $\text{NaNO}_3$  ao final de 188 h, sendo este valor aproximadamente três vezes maior que a biomassa obtida no meio de cultivo padrão f/2.

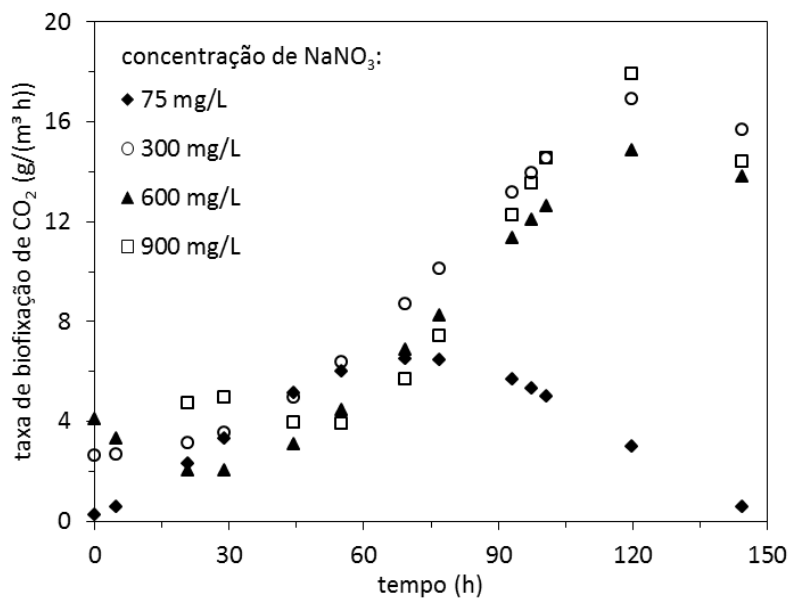


Chen *et al.* (2011) utilizando o meio de cultivo com 23 mM de  $\text{NaNO}_3$  obtiveram a maior densidade ótica, 2,8 ( $\text{OD}_{405}$ ), em comparação com uma densidade de 1,8 no meio com 2,3 mM de  $\text{NaNO}_3$ . No entanto, um aumento adicional na concentração de  $\text{NaNO}_3$  para 46 mM não provocou um aumento adicional na densidade ótica máxima obtida. O crescimento do número de células com 1,0 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  foi comparável ao crescimento com 2,3 mM de  $\text{NaNO}_3$ . No entanto, o crescimento com concentrações maiores de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM e 50 mM) foi menor do que com 1,0 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . O crescimento no meio com 20 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 46 mM de  $\text{NaNO}_3$  também foi menor quando comparado ao meio somente com 46 mM de  $\text{NaNO}_3$ . Estes resultados indicam que elevadas quantidades de amônio no meio de cultivo inibem o crescimento celular.

Na Figura 4 são apresentadas as taxas de biofixação de  $\text{CO}_2$  ao longo do tempo de cultivo. Observa-se que as curvas obtidas para os cultivos com 300 mg/L, 600 mg/L e 900 mg/L de  $\text{NaNO}_3$  foram semelhantes, porém os cultivos com 300 mg/L de  $\text{NaNO}_3$  forneceram taxas de biofixação levemente superiores. Os cultivos com concentração padrão de  $\text{NaNO}_3$  do meio f/2 (75 mg/L) forneceram taxas de biofixação muito inferiores em relação aos cultivos realizados com concentrações maiores de  $\text{NaNO}_3$ . A taxa de biofixação máxima foi de  $16,9 \pm 0,8 \text{ g CO}_2/(\text{m}^3 \text{ h})$  obtida nos cultivos com 300 mg/L de  $\text{NaNO}_3$  em aproximadamente 120 h de cultivo. Nos cultivos com 900 mg/L de  $\text{NaNO}_3$  obteve-se uma taxa de biofixação máxima de  $17,9 \pm 3,1 \text{ g CO}_2/(\text{m}^3 \text{ h})$ . Porém durante todo o cultivo, os resultados fornecidos foram inferiores aos observados nos cultivos com 300 mg/L, com exceção deste ponto com aproximadamente 120 h de cultivo.



**Figura B.3:** Valores médios de biomassa (g/L) da microalga *Dunaliella tertiolecta* cultivada ao longo de 188 h com diferentes concentrações de  $\text{NaNO}_3$ .



**Figura B.4:** Taxas médias de biofixação de CO<sub>2</sub> da microalga *Dunaliella tertiolecta* cultivada ao longo de 188 h para os experimentos realizados.

## 4 Conclusões

As microalgas *Dunaliella tertiolecta* foram capazes de utilizar NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio para o crescimento, porém as maiores quantidades de biomassa foram obtidas com NaNO<sub>3</sub>.

Entre as concentrações de NaNO<sub>3</sub> avaliadas, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 300 mg/L de NaNO<sub>3</sub>, obtendo-se  $1,29 \pm 0,02$  g/L de biomassa em 188 h de cultivo e a taxa de biofixação máxima foi de  $16,9 \pm 0,8$  g CO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> h.

A adição de NaNO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio nos cultivos é imprescindível para a obtenção de elevadas quantidades de biomassa e taxas de biofixação de CO<sub>2</sub>, porém concentrações elevadas de NaNO<sub>3</sub> inibem o crescimento das microalgas.

## 5 Referências

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; SIMON NG, K. Y.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 1649-1655, 2011.

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

- 
- GUILLARD, R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. e CHANLEY, M. (Ed.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*: Springer US, 1975. chap. 3, p. 29-60.
- KOCHEM, L. H. Caracterização de fotobiorreator *airlift* para cultivo de microalgas. Trabalho de conclusão do curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2010.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.
- REBOLLOSO-FUENTES M. M.; NAVARRO-PÉREZ, A.; GARCÍA-CAMACHO, F.; RAMOS-MIRAS, J. J.; GUIL-GUERRERO, J. L. Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 6, p. 2966-2972, 2001.
- WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008.



## **Apêndice C**

### **Influência da luminosidade e concentração salina na produção de lipídios e carotenoides pela microalga *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator *airlift***

Este trabalho foi apresentado e publicado nos Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, realizado em outubro de 2014 em Florianópolis, SC.

## Influência da luminosidade e concentração salina na produção de lipídios e carotenoides pela microalga *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator *airlift*

Nicéia Chies Da Fré<sup>1,3\*</sup>, Rosane Rech<sup>2</sup> e Nilson Romeu Marcílio<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Unidade de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, RS, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia Química, Porto Alegre, RS, Brasil

### Resumo

A microalga *Dunaliella tertiolecta* é dos poucos microrganismos fotossintéticos capaz de produzir simultaneamente grandes quantidades de carotenoides e lipídios em determinadas condições de estresse ambientais, como luminosidade e concentração salina do meio de cultivo. Porém estas condições normalmente diminuem a velocidade de crescimento das microalgas. Neste trabalho foi investigado o efeito do aumento da luminosidade e da concentração salina durante os cultivos a fim de promover a maior síntese destes bioprodutos. Para isso, os cultivos foram realizados em duas fases: (1) produção de grande número de células nas condições ideais de crescimento e, posteriormente, (2) aplicação de condições de estresse salino e luminoso. Os melhores resultados foram a 30 klx, obtendo-se  $1,24 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa,  $5,08 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$  de carotenoides no meio de cultivo, correspondendo a uma concentração  $4,34 \pm 0,38 \text{ mg g}^{-1}$  de biomassa seca, e  $10,21 \pm 0,03 \%$  de lipídios na biomassa, em 210 h de cultivo.

**Palavras-chave:** microalga, *Dunaliella tertiolecta*, fotobiorreator, lipídios, carotenoides.

\* Autor para correspondência: Nicéia Chies Da Fré, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Unidade de Bento Gonçalves, Rua Benjamin Constant, 229, 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil.

Tel.: +55 54 3452 0389; E-mail: niceia-chies@uergs.edu.br

## 1 Introdução

As microalgas são fontes naturais de ácidos graxos insaturados, carotenoides, xantofilas, vitaminas, proteínas, minerais e enzimas. O potencial comercial das microalgas para a produção industrial de alimentos funcionais a partir destes metabólitos é amplamente reconhecido. Consequentemente, o cultivo em massa de microalgas, visando o aumento da produção desses compostos bioquímicos, essenciais para a saúde humana, é de grande interesse prático (Inbaraj *et al.*, 2006; Raja *et al.*, 2007).

Os carotenoides provenientes de microalgas têm sido utilizados como aditivos alimentares na forma de corantes, antioxidantes e vitaminas e, também, nas indústrias de cosméticos e farmacêutica. O uso desses compostos em aplicações terapêuticas como agentes na prevenção de doenças degenerativas e do câncer e estimuladores do sistema imunológico é resultado de sua habilidade de proteção contra os radicais livres (Del Campo *et al.*, 2000; Baker e Günther, 2004). O grande interesse na aplicação de produtos provenientes de algas marinhas na formulação de drogas e alimentos é também devido à composição lipídica diversificada de ácidos graxos poli-insaturados (Elenkov *et al.*, 1996; Gill e Valivety, 1997; Medina *et al.*, 1998). Além disso, os lipídios de microalgas são quimicamente similares aos óleos vegetais, tornando-os fontes potenciais para a produção de biodiesel a partir da transesterificação do óleo (Chisti, 2007; Chiu *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2010) ou óleo combustível através da liquefação direta da massa de células de microalgas (Francisco *et al.*, 2010; Johnson e Admassu, 2013; Yeh *et al.*, 2013).

Entre as microalgas marinhas, células da espécie *Dunaliella* são conhecidas por sintetizar quantidades significativas de carotenoides e lipídios em cultivos submetidos a condições de estresse salino e luminoso. É esperado algum efeito do aumento da salinidade sobre o metabolismo destes microrganismos, especialmente sobre constituintes importantes da membrana celular tais como os lipídios (Elenkov *et al.*, 1996). Um aumento na composição lipídica da microalga *D. tertiolecta* foi reportado como sendo resposta ao aumento da salinidade ambiental (Takagi *et al.*, 2006). Por sua vez, o acúmulo de carotenoides pode ser uma resposta ao estresse oxidativo produzido pelo excesso de luz. Os carotenoides são reconhecidos como antioxidantes eficazes contra o dano oxidativo, pois são capazes de eliminar formas radicais de oxigênio ativo, protegendo as células contra um excesso de luminosidade (Orosa *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2008; Mogedas *et al.*, 2009).

As condições de estresse normalmente não coincidem com as condições ótimas de crescimento da maioria das microalgas, diminuindo suas taxas de crescimento (Chen *et al.*, 2011). Além disso, a combinação de parâmetros ambientais e a configuração do sistema de produção das microalgas a fim de produzir uma densidade celular elevada e considerável conteúdo lipídico e de carotenoides são bastante complexos (Tang *et al.*, 2010). Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho é elucidar o efeito da intensidade luminosa e da salinidade do meio no acúmulo de carotenoides e lipídios pela microalga *D. tertiolecta* cultivada em fotobiorreator airlift. A fim de minimizar a influência destes parâmetros sobre a redução na produção de biomassa, os cultivos foram realizados em duas fases: nas primeiras 140 h o crescimento das células ocorreu nas condições ideais de crescimento e,

posteriormente foram aplicadas condições de estresse salino e luminoso até o final dos cultivos.

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Microrganismo e meio de cultivo

O microrganismo utilizado neste estudo foi a microalga unicelular *Dunaliella tertiolecta*, cedida pelo professor Sérgio Lourenço do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense (Rio de Janeiro / Brasil).

As células foram cultivadas no meio Guillard f/2 (Guillard, 1975) modificado, consistindo de água destilada, 34 g L<sup>-1</sup> de sal marinho (Red Sea), 16,5 g L<sup>-1</sup> NaCl, 300 mg L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, 5 mg L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O, 30 mg L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O, 1 mL L<sup>-1</sup> solução de metais traço com 9,8 mg L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 22 mg L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10 mg L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 180 mg L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 6,3 mg L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 4,36 mg L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA e 3,15 mg L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1 mL L<sup>-1</sup> de solução de vitaminas com 100 mg L<sup>-1</sup> Tiamina, 0,5 mg L<sup>-1</sup> Cianocobalamina e 0,5 mg L<sup>-1</sup> Biotina. O pH do meio foi ajustado para 7,2 pela adição de 40 mM de Tris (2-amino-2-[hidroximetil]-1-3-propanediol). O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a (121 °C / 15 min), exceto a solução de vitaminas que foi esterilizada por microfiltração (0,22 µm, Millipore, Barueri, Brasil).

As microalgas foram mantidas no meio de cultivo Guillard f/2 (Guillard, 1975) a temperatura controlada (20 °C) e com fotoperíodo de 12 h fornecido por lâmpada eletrônica de 30 W, correspondente a uma intensidade luminosa de aproximadamente 5,8 klx.

### 2.2 Experimentos em fotobiorreator

A fim de obter um volume de 200 mL de cultura para inocular os fotobiorreatores, uma alíquota de 20 mL de microalgas da cultura mãe do banco de cultivo foi inoculada em 180 mL de meio de cultivo estéril em frascos Erlenmeyer de 500 mL. Estes frascos foram colocados em incubadora com agitação orbital com temperatura controlada de 28 ± 1 °C e iluminação permanente através de lâmpada eletrônica de 30 W, correspondente a uma intensidade luminosa de aproximadamente 5,8 klx, durante 12 dias. Após este período, os pré-inóculos foram considerados prontos para serem utilizados nos fotobiorreatores.

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores de placa do tipo airlift (Kochem *et al.*, 2014), confeccionados em acrílico, com 450 mm de altura, 108 mm de largura, 30 mm de profundidade do riser, 20 mm de profundidade do downcomer e com volume útil de 2,2 L.



Para realizar a limpeza/asepsia dos reatores, os mesmos foram totalmente preenchidos com água destilada e 10 mL de solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5 %). Após 15 min, foram adicionados 2,5 mL de solução de tiosulfato de sódio 250 g L<sup>-1</sup> para a completa neutralização do cloro. Após 2 h esta solução foi descartada e os reatores foram preenchidos com 2,0 L de meio de cultura estéril.

Os pré-inóculos (200 mL) foram inoculados nos fotobiorreatores, totalizando um volume de 2,2 L. A temperatura dos cultivos foi mantida constante em 28 °C através da passagem de água de banhos térmicos conectados por mangueiras a camisa interna de aquecimento/resfriamento de cada fotobiorreator, com área de 635 cm<sup>2</sup>. A aeração foi realizada com vazão 0,5 L min<sup>-1</sup> de uma mistura de ar comprimido e CO<sub>2</sub> filtrados com membrana de 0,22 µm (Midisart®2000 / Sartorius Stedim Biotech) utilizando-se duas pedras porosas conectadas em mangueiras inseridas pelo topo dos reatores até o fundo dos mesmos. As vazões da mistura ar-CO<sub>2</sub> foram controladas utilizando-se rotômetros (Dwyer). A quantidade de CO<sub>2</sub> adicionada ao ar comprimido variou entre 1 e 2 % a fim de manter o pH da cultura entre 7,5 e 8,5 durante todo o cultivo. Os fotobiorreatores foram iluminados continuamente na seção *riser* a 17,5 klx por um painel de lâmpadas eletrônicas (24 × 13 W, luz branca, Tashibra).

Os experimentos foram realizados em duplicata totalizando oito cultivos realizados simultaneamente. Nos cultivos submetidos ao estresse salino, uma solução concentrada de NaCl (5,0 M) foi adicionada no final da fase log, após 140 h de cultivo. Nesse mesmo tempo (140 h), também foi aumentada a intensidade luminosa na seção *riser* nos cultivos submetidos ao estresse luminoso. Portanto, após 140 h, dois cultivos continuaram sendo realizados nas mesmas condições, sem adição de NaCl e aumento da intensidade de luz (0,715 M NaCl e 17,5 klx). Após o mesmo intervalo de tempo, outros dois cultivos foram submetidos apenas ao estresse salino (1,215 M NaCl e 17,5 klx), mais dois cultivos foram submetidos apenas ao estresse luminoso (0,715 M NaCl e 30 klx) e dois cultivos foram submetidos ao estresse salino e luminoso (1,215 M NaCl e 30 klx).

A temperatura dos cultivos foi monitorada com termômetros de mercúrio e a intensidade luminosa com auxílio de um luxímetro digital (MS6610, Akso, Brazil). O pH foi medido através de fita indicadora de pH (Alkalit®Merck, Alemanha). O crescimento das microalgas foi acompanhado através de medidas de densidade ótica a 750 nm com espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 Pro e relacionadas com biomassa por medida de peso-seco.

As medidas de temperatura, intensidade luminosa, pH e densidade ótica foram realizadas duas vezes ao dia com intervalos aproximados de 12 h. Além disso, nestes mesmos intervalos, foram retiradas duas alíquotas de 2 mL de cada fotobiorreator, uma para a realização de medidas da densidade ótica (750 nm) dos cultivos e outra para análise de nitrogênio do meio de cultura e de carotenoides sintetizados pelas células. Essa última alíquota foi centrifugada (16000 × g / 5 min) e o sobrenadante (meio de cultura) foi removido com auxílio de uma pipeta Pasteur. O sobrenadante e o precipitado (*pellet*) foram congelados separadamente para determinação de nitrogênio e carotenoides totais respectivamente.

A duração média de cada cultivo foi de 210 h. Finalizados os cultivos, as células de cada fotobiorreator foram separadas do meio de cultura por centrifugação e posterior liofilização. Amostras do material liofilizado obtido em cada experimento foram utilizadas para determinação do teor de lipídios totais em extrator Soxhlet.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey utilizando o *software* Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

### 2.3 Análises da biomassa

O teor de lipídios totais na biomassa foi determinado por diferença após extração com éter de petróleo (135 °C) utilizando-se extrator Soxhlet (Foss/Soxtec 2055TM).

O teor de carotenoides totais foi determinado por espectrofotometria. Em tubos de ensaio, 2,0 mL de acetona (Synth) foram adicionados ao precipitado de microalgas (descongelado). Após 12 h em refrigerador (-4 °C), o material foi centrifugado (16000 × g / 5 min). Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o extrato (sobrenadante) foi transferido para uma cubeta de vidro. Foram medidas as absorvâncias ( $A$ ) nos comprimentos de onda 661,6, 644,8 e 470 nm. Medidas de turbidez foram realizadas em 750 e 520 nm. As concentrações de clorofilas a e b ( $C_{Chla}$  e  $C_{Chlb}$ ) e a concentração de carotenoides totais das células ( $C_{Ct}$ ) foram calculadas com as Equações 1, 2 e 3 (Lichtenthaler e Buschmann, 2001), onde a concentração de pigmentos é dada em mg L<sup>-1</sup> de solução do extrato.

$$C_{Chla} = 11,24A_{661,6} - 2,04A_{644,8} \quad (1)$$

$$C_{Chlb} = 20,13A_{644,8} - 4,19A_{661,6} \quad (2)$$

$$C_{Ct} = (1000A_{470} - 1,90C_{Chla} - 63,14C_{Chlb}) / 214 \quad (3)$$

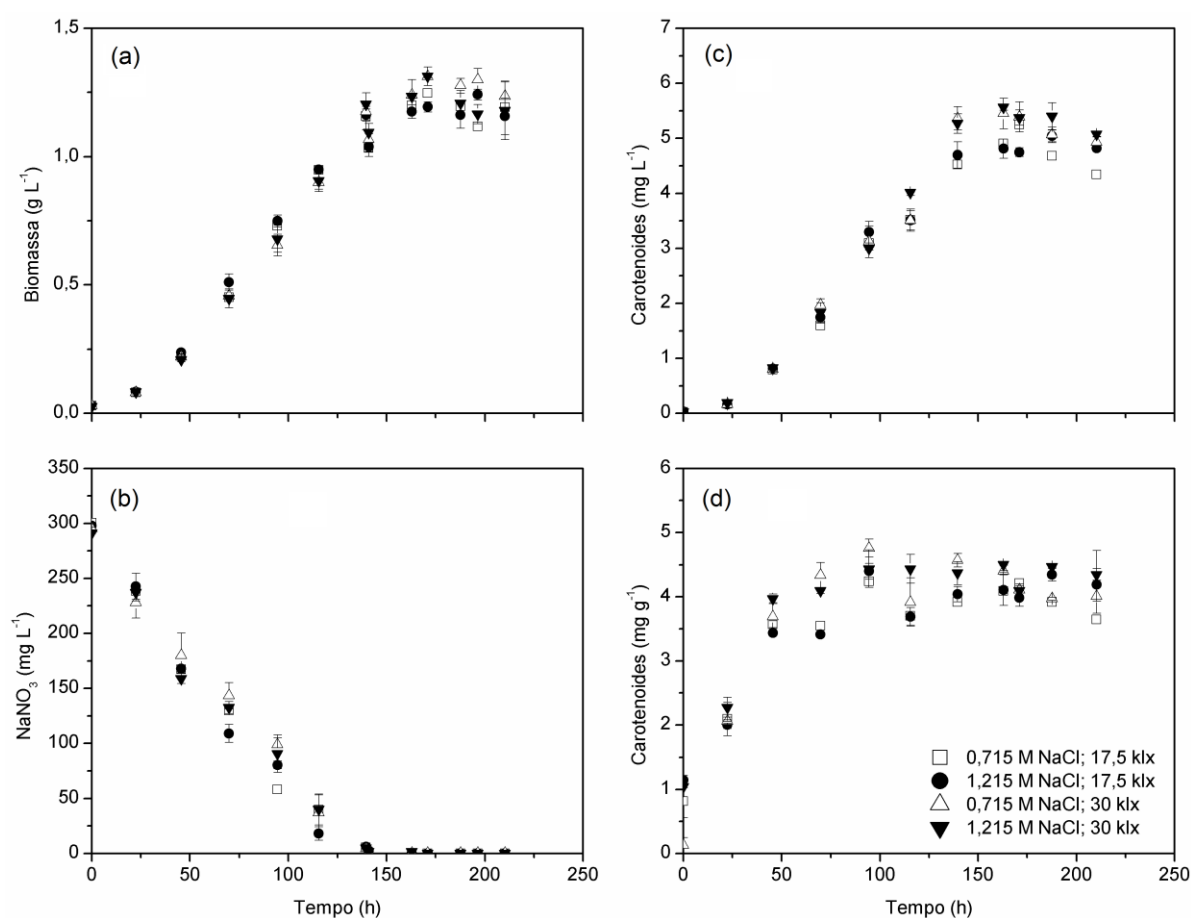
### 2.4 Análise de NaNO<sub>3</sub> no meio de cultivo

As concentrações de nitrato de sódio foram determinadas por espectrofotometria utilizando-se teste colorimétrico para determinação de nitrato de sódio em água de aquário (Mydor, Ft. Lauderdale, EUA). Foram medidas as densidades óticas ( $OD$ ) em 517 nm, comprimento de onda no qual se observou a maior absorvância do nitrato de sódio. As concentrações de NaNO<sub>3</sub> dos meios de cultivo foram determinadas a partir de reta padrão relacionando concentrações conhecidas de NaNO<sub>3</sub> e densidades óticas a 517 nm.

### 3 Resultados e Discussões

A microalga *D. tertiolecta* apresenta diferentes curvas de crescimento e quantidades de carotenoides totais ( $\text{mg L}^{-1}$  e  $\text{mg g}^{-1}$ ) produzidas pelas células de acordo com as condições de estresse salino e/ou luminoso submetidos aos cultivos (Figura 1a,c,d). O consumo de  $\text{NaNO}_3$  durante os cultivos não foi influenciado pelas diferentes condições de estresse, pois as curvas de concentração de  $\text{NaNO}_3$  em função do tempo para todos os cultivos realizados foram muito semelhantes (Figura 1b). Outros autores também não identificaram diferenças significativas nas concentrações de nitrato no decorrer dos cultivos submetidos a diferentes concentrações salinas (Takagi *et al.*, 2006).

As condições de estresse não diminuíram a produção de biomassa quando comparados aos cultivos não submetidos a estas condições. A comparação das médias através do teste de Tukey mostrou que os valores de biomassa obtidos nas condições normais de crescimento e em condições de estresse salino e luminoso não diferem entre si após 210 h de cultivo (Tabela 1).

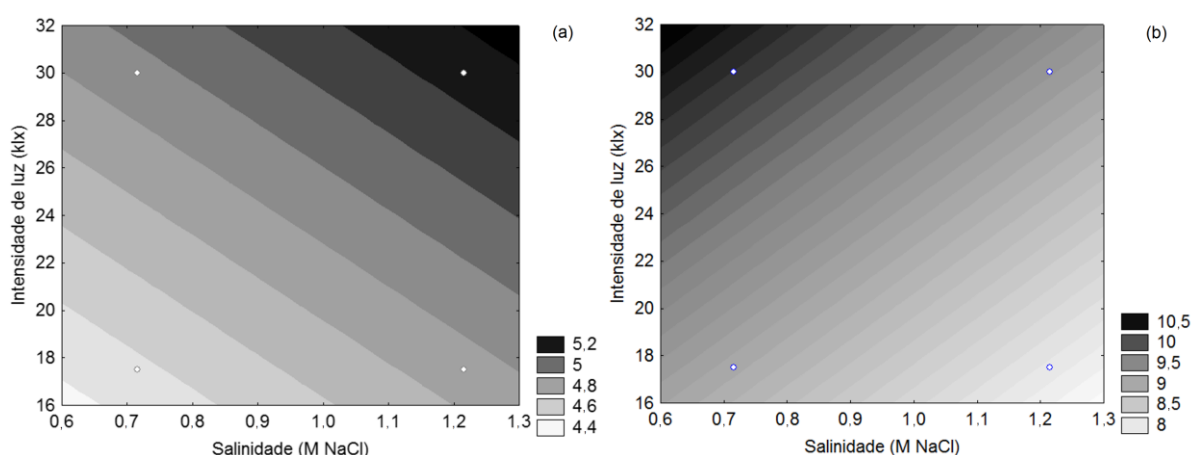


**Figura C.1:** (a) Biomassa, (b) consumo de nitrato de sódio, (c) concentração de carotenoides ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e (d) concentração de carotenoides ( $\text{mg g}^{-1}$ ) nos cultivos de *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator airlift em condições de estresse salino e luminoso.

**Tabela C.1:** Biomassa e concentrações de carotenoides e lipídios nos cultivos de *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator airlift em condições de estresse salino e luminoso em 210 h.

Salinidade, intensidade de luz (M NaCl; klx)	Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Concentração de carotenoides (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração de carotenoides (mg g <sup>-1</sup> )	Teor de lipídios (%)
0,715; 17,5	1,19 ± 0,00 <sup>a</sup>	4,34 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,64 ± 0,00 <sup>a</sup>	8,93 ± 0,13 <sup>a</sup>
1,215; 17,5	1,16 ± 0,07 <sup>a</sup>	4,82 ± 0,00 <sup>ab</sup>	4,18 ± 0,26 <sup>a</sup>	7,98 ± 0,09 <sup>b</sup>
0,715; 30	1,24 ± 0,06 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,09 <sup>b</sup>	4,00 ± 0,25 <sup>a</sup>	10,21 ± 0,03 <sup>c</sup>
1,215; 30	1,18 ± 0,11 <sup>a</sup>	5,08 ± 0,04 <sup>b</sup>	4,34 ± 0,28 <sup>a</sup>	9,20 ± 0,11 <sup>a</sup>

A análise estatística dos dados experimentais mostrou que a iluminação e a salinidade afetam significativamente a produção de carotenoides (mg L<sup>-1</sup>) ( $p = 0,028$ ) e lipídios ( $p < 0,0001$ ) pela microalga *D. tertiolecta*. Quanto maiores as condições de estresse salino e luminoso, após a fase de crescimento das microalgas, maior a síntese de carotenoides (mg L<sup>-1</sup>) (Figura 2a). A comparação das médias através do teste de Tukey mostrou que as quantidades de carotenoides (mg L<sup>-1</sup>) obtidas nos cultivos sob condições de estresse são diferentes das obtidas nas condições normais de crescimento durante todo o período (Tabela 1). Para os valores de carotenoides (mg g<sup>-1</sup>), o teste de Tukey demonstrou que os resultados obtidos não diferem entre si (Tabela 1). Com relação ao teor lipídico total, o aumento da iluminação provoca maior síntese de lipídios pela microalga *D. tertiolecta*, porém esta é diminuída com o aumento da salinidade (Figura 2b). A comparação das médias através do teste de Tukey mostrou que os valores de lipídios obtidos nas diferentes condições testadas neste trabalho diferem e entre si (Tabela 1). Outros autores também obtiveram conteúdos lipídicos mais elevados nas células de microalgas submetidas a maiores intensidades luminosas (Tang *et al.*, 2010).



**Figura C.2:** Superfície de resposta da (a) concentração de carotenoides em (mg L<sup>-1</sup>) e do (b) teor de lipídios totais em 210 h de cultivo em função da salinidade e intensidade luminosa.

Estudos realizados com *D. salina* demonstraram que a melhor salinidade para a obtenção de concentrações mais altas de carotenoides ( $\text{mg L}^{-1}$ ) foi 1,5 M NaCl (Farhat *et al.*, 2011), resultado semelhante ao obtido neste trabalho, 1,215 M NaCl. Porém, os resultados obtidos por Farhat *et al.* (2011) demonstram que uma vez atingido o crescimento das células, um acréscimo maior de sal poderia aumentar o rendimento em carotenoides, da mesma forma como foi comprovado neste trabalho de acordo com a Figura 2a. Os autores cresceram as microalgas nas concentrações de 0,6, 1,5, 3,0 e 4,5 M NaCl durante todo o tempo de cultivo e a concentração máxima de carotenoides obtida em todos tratamentos não ultrapassou  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . A maior concentração de carotenoides obtida neste trabalho ( $5,08 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$ ) pode ser atribuída a adição complementar de NaCl no final da fase log de crescimento das células, pois salinidades em torno de 0,5 M NaCl são consideradas mais apropriadas para a obtenção de maiores concentrações celulares da microalga *D. tertiolecta* (Jahnke e White, 2003).

## 4 Referências

BAKER, R.; GÜNTHER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, n. 10, p. 484-488, 2004.

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; NG, K. Y. S.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 1649-1655, 2011.

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

CHIU, S.; KAO, C.; TSAI, M.; ONG, S.; CHEN, C.; LIN, C. Lipid accumulation and  $\text{CO}_2$  utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to  $\text{CO}_2$  aeration. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 2, p. 833-838, 2009.

DEL CAMPO, J. A.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, H.; ANGELES VARGAS, M.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, v. 76, n. 1, p. 51-59, 2000.

ELENKOV, I.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; POPOV, S. Effect of salinity on lipid composition of *Cladophora vagabunda*. *Phytochemistry*, v. 42, n. 1, p. 39-44, 1996.

FARHAT, N.; RABHI, M.; FALLEH, H.; JOUINI, J.; ABDELLY, C.; SMAOUI, A. Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella salina* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, v. 47, n. 5, p. 1072-1077, 2011.

FRANCISCO, É. C.; NEVES, D. B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 85, n. 3, p. 395-403, 2010.

GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 10, p. 401-409, 1997.

GUILLARD, R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. e CHANLEY, M. (Ed.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*: Springer US, 1975, chap. 3, p. 29-60.

HU, C.; LIN, J.; LU, F.; CHOU, F.; YANG, D. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, v. 109, n. 2, p. 439-446, 2008.

INBARAJ, B. S.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Chromatography A*, v. 1102, n. 1-2, p. 193-199, 2006.

JAHNKE, L. S.; WHITE, A. L. Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Plant Physiology*, v. 160, n. 10, p. 1193-1202, 2003.

JOHNSON, K. R.; ADMASSU, W. Mixed algae cultures for low cost environmental compensation in cultures grown for lipid production and wastewater remediation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 88, n. 6, p. 992-998, 2013.

KOCHEM, L. H.; DA FRÉ, N. C., REDAELLI, C., RECH, R.; MARCÍLIO, N. R. Characterization of a novel flat-panel airlift photobioreactor with an internal heat exchanger. *Chemical Engineering & Technology*, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2001, p. F4.3.1-F4.3.8.

MEDINA, A. R.; GRIMA, E. M.; GIMÉNEZ, A. G.; GONZÁLEZ, M. J. I. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, v. 16, n. 3, p. 517-580, 1998.

MOGEDAS, B.; CASAL, C.; FORJÁN, E.; VÍLCHEZ, C.  $\beta$ -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 108, n. 1, p. 47-51, 2009.

OROSA, M.; TORRES, E.; FIDALGO, P.; ABALDE, J. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, n. 3, p. 553-556, 2000.

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S.; RENGASAMY, R. Exploitation of *Dunaliella* for  $\beta$ -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, n. 3, p. 517-523, 2007.

TAKAGI, M.; KARSENKO; YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, n. 3, p. 223-226, 2006.

TANG, H.; ABUNASSER, N.; GARCIA, M. E. D.; CHEN, M.; SIMON NG, K. Y.; SALLEY, S. O. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3324-3330, 2010.

YEH, T. M.; DICKINSON, J. G.; FRANCK, A.; LINIC, S.; THOMPSON, L. T.; SAVAGE, P. E. Hydrothermal catalytic production of fuels and chemicals from aquatic biomass. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 88, n. 1, p. 13-24, 2013.