

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Otimização da Composição Nutricional do Meio
de Crescimento de Microalgas**

Beatriz Ornelas Jardim

Dissertação

Mestrado em Biotecnologia

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Sara Raposo

Mestre Ana Constantino

2018

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Otimização da Composição Nutricional do Meio
de Crescimento de Microalgas**

Beatriz Ornelas Jardim

Dissertação

Mestrado em Biotecnologia

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Sara Raposo

Mestre Ana Constantino

2018

Otimização da composição nutricional do meio de crescimento de microalgas

Declaração de autoria do trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam na lista de referências incluída.



(Beatriz Ornelas Jardim)

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Ao longo do meu percurso foram muitas as pessoas que me apoiaram para nunca desistir, e que me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos, e por isso estou muito grata a todos os que de alguma forma foram uma fonte de força e inspiração para que chegasse até aqui.

A elaboração desta tese de mestrado não teria sido possível sem o apoio e colaboração de várias pessoas, às quais deixo aqui os meus agradecimentos:

À Professora Doutora Sara Raposo, por ter aceite ser minha orientadora, pela disponibilidade e pelos conhecimentos transmitidos;

À Mestre Ana Constantino, por ter aceite ser minha orientadora, pela sua ajuda e disponibilidade, pela sua simpatia, boa-disposição e generosidade;

À Mestre Brígida Rodrigues, por todo o seu apoio e disponibilidade, pela sua alegria e boa-disposição;

Aos meus colegas de laboratório, por toda a ajuda e por toda a animação, cantoria e dança;

Aos meus amigos, pela amizade e alegria, por todo o incentivo, por todos os momentos felizes que proporcionaram;

Aos meus primos e primas que sempre me deram força para continuar, mesmo quando as saudades de casa apertavam;

Aos meus avós, tios e tias, por sempre me terem apoiado em todo o percurso, com palavras de incentivo e orgulho;

À minha MÃE e ao meu PAI, por todo o amor, generosidade e confiança, por fazerem o possível e o impossível para que nunca me faltasse nada, por todos os ensinamentos e por todo o apoio. Obrigada!

RESUMO

Os organismos marinhos são conhecidos por produzirem uma grande diversidade de compostos com aplicabilidades na área da medicina, cosmética, indústria agroalimentar, biocombustíveis e aquacultura, principalmente por estarem sujeitos a condições físicas e químicas diferentes. As microalgas são um dos recursos de eleição, devido à capacidade de operarem em autotrofia, heterotrofia ou mixotrofia.

O objetivo deste estudo foi otimizar a composição nutricional do meio ALGAL e do meio TAP, de forma a maximizar o rendimento e a produtividade de biomassa das microalgas *Tetraselmis* sp. CTP4 e *Chlorella sorokiniana*. Para a otimização do meio ALGAL utilizou-se a glucose como fonte de carbono, foram testadas três concentrações. O carbono é um nutriente vital para o desenvolvimento da microalga, para além de ser o seu principal constituinte é também a sua fonte de energia, e em alguns casos a sua limitação pode inibir ou estimular a produtividade da estirpe em estudo. A otimização do meio TAP dividiu-se em duas fases, na primeira otimizou-se a concentração de fósforo e na segunda a concentração de enxofre. O fósforo é um elemento que desempenha um papel importante na produção lipídica e proteica. E o enxofre está presente no processo de divisão celular e no metabolismo proteico, além de ser um elemento estrutural das proteínas e vitaminas.

Com a microalga *Tetraselmis* sp. CTP4 em meio ALGAL realizam-se ensaios em condições de hetero e de mixotrofia. Em condições mixotróficas, a microalga CTP4 cultivada em meio ALGAL com 10 g/L de glucose produziu cerca de 7 g/L de biomassa, enquanto que em heterotrofia, foram obtidas apenas 3 g/L.

Na otimização do meio TAP, a microalga *Chlorella sorokiniana* apresentou as melhores condições de crescimento para a concentração de 3 mM de fósforo e 1 mM de enxofre, onde se registaram produtividades máximas de 0,233 g_{biomassa}/L.d e 0,227 g_{biomassa}/L.d, respetivamente. Usando o meio otimizado no crescimento desta microalga, foi atingida uma produtividade máxima foi 0,393 g_{biomassa}/L.d.

Os resultados obtidos na otimização do meio ALGAL sugerem que a CTP4 consegue ativar o sistema mixotrófico, aliando o consumo de uma fonte de carbono orgânico (glucose) e o efeito da luz na fixação do dióxido de carbono (CO₂). Os ensaios de otimização do meio TAP para o aumento da produtividade da microalga *Chlorella*

sorokiniana apresentaram resultados promissores, revelando assim a importância de definir as concentrações ótimas dos constituintes do meio de forma a estimular a produção dos produtos de interesse.

Palavras-Chave: Microalgas, Otimização, *Tetraselmis* sp. CTP4, *Chlorella sorokiniana*, Heterotrofia, Mixotrofia, Produtividade

ABSTRACT

Marine organisms are known to produce a vast diversity of compounds with applications in medicine, cosmetics, agro-food industry, biofuel, and aquaculture, mainly because they are exposed to different physical and chemical conditions. Microalgae are one of the resources of choice due to the ability to grow in autotrophy, heterotrophy or mixotrophy.

The aim of this study was to optimize the nutritional composition of the ALGAL medium and TAP medium, to maximize yield and biomass productivity of the *Tetraselmis* sp. CTP4 and *Chlorella sorokiniana*. For the optimization of the ALGAL medium, glucose was used as the carbon source, three concentrations were tested. Carbon is a vital nutrient for the development of microalgae. In addition, to be its main constituent, it is also its source of energy, in some cases, its limitation may inhibit or stimulate the productivity of the strain. The optimization of the TAP medium was divided into two phases, in the first one the phosphorus concentration was optimized and in the second the sulfur concentration, for which several concentrations were tested. Phosphorus plays an essential role in lipid and protein production. Sulfur, in addition to being a structural element of proteins, vitamins and amino acids, it is also present in the process of cell division and protein metabolism.

With *Tetraselmis* sp. CTP4 in ALGAL tests were performed in hetero and mixotrophic conditions. In mixotrophy, the microalgae cultivated in ALGAL medium with 10 g/L of glucose produced about 7 g/L of biomass, whereas in heterotrophy 3 g/L were obtained.

In the optimization of the TAP medium with *Chlorella sorokiniana* the best results were obtained for the concentration of 3 mM of phosphorus and 1 mM of sulfur, where the maximum productivity was 0,233 g_{biomass}/L.d e 0,227 g_{biomass}/L.d, respectively. For the final assay, the conditions described above were added and the maximum productivity obtained was 0,393 g_{biomass}/L.d.

The results obtained from the *Tetraselmis* sp. CTP4 suggest that it can activate the mixotrophic system, combining the consumption of an organic carbon source (glucose) and the effect of light in the carbon dioxide (CO₂) fixation. The optimization tests of the TAP medium to increase the productivity of *Chlorella sorokiniana* presented promising

results, thus revealing the importance of defining the optimal concentrations of the constituents of the medium to stimulate the production of the products of interest.

Key words: Microalgae, Optimization, *Tetraselmis* sp. CTP4, *Chlorella sorokiniana*, Heterotrophy, Mixotrophy, Productivity.

PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTE TRABALHO

Jardim, B. O., Constantino, A., Varela, J., Raposo, S. (maio, 2018). *Crescimento da microalga Tetraselmis sp. CTP4 em diferentes condições tróficas*. Resumo publicado em IX Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico, Cartaya (Huelva)

Constantino, A., Jardim, B., Leon, A., Leon, R., Rodrigues, B., Raposo, S. *Microalgae growth in different trophic conditions*. Trabalho submetido ao ALGAEUROPE 2018 INTERNATIONAL CONFERENCE, a realizar entre 4 e 6 de dezembro de 2018

LISTA DE ABREVIACÕES

μ - Taxa específica de crescimento (d^{-1});

A – Meio ALGAL;

A10 – Meio ALGAL + 2,5 g/L de extrato de levedura + 10 g/L de glucose;

A15 – Meio ALGAL + 2,5 g/L de extrato de levedura + 15 g/L de glucose;

A5 – Meio ALGAL + 2,5 g/L de extrato de levedura + 5 g/L de glucose;

AE – Meio ALGAL + 2,5 g/L de extrato de levedura;

B – Meio TAP (0,3 mM de fósforo ou enxofre);

C – Meio TAP (controlo);

C_a – Clorofila a;

C_b – Clorofila b;

C_C – Carotenoides;

CCMAR – Centro de Ciências do Mar;

CIMA – Centro de Investigação Marinha e Ambiental;

CO₂ – Dióxido de Carbono;

C_T – Clorofila total;

CTP4 – *Tetraselmis* sp. CTP4;

D – Meio TAP (1 mM de fósforo ou enxofre);

DO – Densidade ótica;

E – Meio TAP (3 mM de fósforo ou enxofre);

F – Meio TAP (6 mM de fósforo ou enxofre);

G – Meio TAP (10 mM de fósforo ou enxofre);

LEBA - Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental;

O – Meio TAP otimizado;

Prod_{xn} – Produtividade (mg/L.d)

PS – Peso seco (g_{DCW}/L);

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO	V
ABSTRACT.....	VII
PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTE TRABALHO	IX
LISTA DE ABREVIACÕES	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIV
ÍNDICE DE TABELAS	XVI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 MICROALGAS	1
1.1.1 <i>Tetraselmis</i> sp. CTP4	2
1.1.2 <i>Chlorella sorokiniana</i>	3
1.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	4
1.2.1 Carbono (C).....	6
1.2.2 Azoto (N).....	7
1.2.3 Fósforo (P).....	7
1.2.4 Enxofre (S)	19
1.3 APLICAÇÕES	19
1.3.1 Biodiesel.....	19
1.3.2 Compostos bioativos	20
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 MICROORGANISMOS	22
3.2 MEIOS DE CULTURA	22
3.2.1 <i>Tetraselmis</i> sp. CTP4	22
3.2.2 <i>Chlorella sorokiniana</i>	22
3.3 ENSAIOS EXPERIMENTAIS	23
3.3.1 <i>Tetraselmis</i> sp. CTP4	24
3.3.2 <i>Chlorella sorokiniana</i>	25
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	26
3.4.1 Determinação da biomassa.....	26
3.4.2 Determinação da densidade ótica.....	26
3.4.3 Determinação de pigmentos totais, clorofilas e carotenoides	27
3.4.4 Quantificação do ácido acético.....	27
3.5 PARÂMETROS CINÉTICOS DO CRESCIMENTO	28
3.5.1 Taxa específica de crescimento (μ)	28
3.5.2 Produtividade específica máxima de biomassa	28

3.5.3	Produtividade total de biomassa.....	28
3.5.4	Produtividade específica máxima de carotenoides.....	29
3.5.5	Produtividade total de carotenoides	29
3.5.6	Análise de dados.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	<i>Tetraselmis</i> sp. CTP4	30
4.1.1	Análise do crescimento	30
4.2	<i>Chlorella sorokiniana</i>	33
4.2.1	Otimização da concentração de fósforo	33
4.2.2	Otimização da concentração de enxofre.....	37
4.2.3	Meio TAP otimizado	41
5	CONCLUSÃO	45
6	BIBLIOGRAFIA.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.1 – <i>Tetraselmis</i> sp. CTP4, vista ao microscópio Scale bar = 5 µm. Adaptado de (Pereira et al., 2016a).....	2
Figura 1.1.2 – Células de <i>Chlorella sorokiniana</i> vistas a microscópio (Giovanna Salbitani & Carfagna, 2017).....	3
Figura 3.3.1 – Diferentes fases do ensaio experimental.	24
Figura 4.1.1 – Perfis de crescimento da CTP4, em meio ALGAL suplementado com diferentes concentrações de glucose e extrato de levedura, em <i>erlenmeyers</i> , em mixotrofia. I - Meio ALGAL; II - Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura; III - Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de glucose; IV - Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de glucose; V - Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de glucose. O gráfico de barras representa o PS no tempo inicial, e o PS máximo, para o tempo indicado. Valores médios ± desvio-padrão	31
Figura 4.2.1 – Perfis de crescimento da <i>Chlorella sorokiniana</i> durante a otimização da concentração de fósforo. A microalga foi cultivada em mixotrofia em meio TAP com diferentes concentrações de fósforo, em <i>erlenmeyers</i> . (B) – 0,3 mM de fósforo; (C) – controlo; (D) – 1 mM de fósforo; (E) - 3 mM de fósforo; (F) – 6 mM de fósforo; (G) – 10 mM de fósforo; ● - Peso seco (g/L) ■ - Densidade ótica (750 nm). Valores médios ± desvio-padrão.....	34
Figura 4.2.2 – Perfis de crescimento da <i>Chlorella sorokiniana</i> durante a otimização da concentração de enxofre. A estirpe foi cultivada em mixotrofia em meio TAP com diferentes concentrações de enxofre, em <i>erlenmeyers</i> . (B) – 0,3 mM de enxofre; (C) – controlo; (D) – 1 mM de enxofre; (E) - 3 mM de enxofre; (F) – 6 mM de enxofre; (G) – 10 mM de enxofre; ● - Peso seco (g/L) ■ - Densidade ótica (750 nm). Valores médios ± desvio-padrão.....	38
Figura 4.2.3 – Perfis de crescimento da <i>Chlorella sorokiniana</i> durante o ensaio final da otimização. A estirpe foi cultivada em mixotrofia em meio TAP com as concentrações de fósforo e enxofre otimizadas, em <i>erlenmeyers</i> . (C) – controlo; (O) – 3mM de fósforo + 1	

mM de enxofre; ● - Peso seco (g/L) ■ - Densidade ótica (750 nm). Valores médios ±
desvio-padrão..... 41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.2.1 – Comparação das características das diferentes condições de cultivo (C.-Y. Chen et al., 2011).....	4
Tabela 1.2.2 – Efeito de diferentes fontes de carbono e de azoto no crescimento de várias espécies de microalgas em condições heterotróficas.....	8
Tabela 1.2.3 – Efeito de diferentes fontes de carbono e de azoto no crescimento de várias espécies de microalgas em condições de mixotrofia.	15
Tabela 3.2.1 – Composição do meio TAP (Gorman & Levine, 1965).....	23
Tabela 4.1.1 – Parâmetros cinéticos de crescimento da microalga <i>Tetraselmis</i> sp. CTP4 em mixotrofia, para as diferentes condições de cultivo. μ - taxa específica de crescimento (d^{-1}).	32
Tabela 4.1.2 – Peso seco máximo obtido para as diferentes condições tróficas de cultivo.	33
Tabela 4.2.1 – Parâmetros cinéticos de crescimento registados para a microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> em mixotrofia, crescida em <i>erlenmeyer</i> , durante 336 h, para as diferentes concentrações de nutrientes com fósforo.....	35
Tabela 4.2.2 – Valores de pigmentos totais, clorofilas e carotenoides, em mg/L, produzidos durante o ensaio de otimização das diferentes concentrações de nutrientes com fósforo.....	36
Tabela 4.2.3 – Valores das produtividades máximas e totais dos carotenoides, produzidas pela microalga <i>C. sorokiniana</i> , em meio TAP com diferentes concentrações de fósforo e cultivada em condições mixotróficas, em <i>erlenmeyer</i>	37
Tabela 4.2.4 – Parâmetros cinéticos de crescimento registados durante a otimização das concentrações de enxofre para a estipe <i>C. sorokiniana</i> , crescida em condições de mixotrofia.	39
Tabela 4.2.5 – Pigmentos, em mg/L, produzidos durante o ensaio de otimização das diferentes concentrações de enxofre.....	40

Tabela 4.2.6 – Valores das produtividades máximas e totais dos carotenoides, produzidas pela microalga <i>C. sorokiniana</i> , em meio TAP com diferentes concentrações de enxofre e cultivada em condições mixotróficas, em erlenmeyer.....	40
Tabela 4.2.7 – Parâmetros cinéticos de crescimento determinados para o ensaio final de otimização do meio TAP com a <i>Chlorella sorokiniana</i> em mixotrofia.	42
Tabela 4.2.8 – Valores das clorofilas e carotenoides, produzidos pela microalga <i>C. sorokiniana</i> em meio TAP (controlo) e em meio TAP otimizado.	43
Tabela 4.2.9 – Parâmetros cinéticos da produção de pigmentos registados para o meio otimizado e para o controlo.	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICROALGAS

Desde sempre que o oceano é utilizado para a exploração de recursos, mas nas últimas décadas verificou-se um aumento da exploração dos recursos marinhos, sobretudo devido ao interesse no que diz respeito à investigação dos organismos marinhos e das suas possíveis contribuições para a ciência (Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental (EMEPC), 2014). Os organismos marinhos são conhecidos por produzirem compostos bastante variados, principalmente por estarem sujeitos a condições físicas e químicas diferentes, nomeadamente temperatura, salinidade, luminosidade, disponibilidade de nutrientes, entre outros. O avanço tecnológico possibilitou a exploração destes recursos e a sua aplicação nas mais diversas áreas, desde a produção energética à cosmética e farmacêutica (Khan, Shin, & Kim, 2018; S.-K. Kim & Pangestuti, 2011; W. Kim et al., 2012).

Um dos principais recursos explorados são as microalgas. Estas são um grupo polifilético de organismos unicelulares eucariotas fotossintéticos, que podem ter dimensões desde poucos micrómetros até várias centenas de micrómetros (Dragone, Fernandes, Vicente, & Teixeira, 2010; Khan et al., 2018; S.-K. Kim, 2015a). Devido à sua elevada eficiência fotossintética, superior à das plantas terrestres, as microalgas são o grupo mais importante para a fixação de carbono e produção de oxigénio (S.-K. Kim, 2015a). Os principais componentes celulares são: proteínas, hidratos de carbono e lípidos (Griffiths, Dicks, Richardson, & L. Harrison, 2011). Sabe-se que existem cerca de 35 mil espécies de microalgas descritas (Borowitzka, 2013) e calcula-se que anualmente, sejam produzidas cerca de 10 mil toneladas de microalgas (Griffiths et al., 2011). Os géneros mais utilizados para produção de compostos são as microalgas *Chlorella*, *Dunaliella* e *Haematococcus* (Griffiths et al., 2011) e recentemente a microalga *Tetraselmis* tem revelado resultados promissores na produção em grande escala (Pereira et al., 2018).

O cultivo da maior parte das algas em condições normais é relativamente fácil, mas de modo a aumentar e tornar a produção dos produtos de interesse sustentável, é necessário otimizar as condições de cultivo, tornando as algas em biorreatores naturais (Ibañez, Herrero, Mendiola, & Castro-Puyana, 2012). O crescimento das microalgas pode ser afetado por fatores químicos, como a composição do meio nutricional, em macro e

micronutrientes, sendo a concentração dos vários compostos de elevada importância, assim como, e fatores físicos, como o pH, temperatura, luz e arejamento (Daliry, Hallajisani, Roshandeh, Nouri, & Golzary, 2017).

1.1.1 *Tetraselmis* sp. CTP4

A microalga *Tetraselmis* pertence ao filo *Chlorophyta* e à família *Chlorodendraceae* (Arora, 2016). Esta é uma espécie unicelular que possui quatro flagelos (derivando daí o sufixo tetra-), um cloroplasto com um pirenoide central (muito raramente pode registrar-se a ocorrência de dois cloroplastos) e possui mobilidade. As células podem ser cordiformes, elípticas ou quase esféricas (Guiry, M.D. & Guiry, 2017). Esta microalga pode ser encontrada tanto em ambientes marinhos como em ambientes de água doce.

Muitas espécies de *Tetraselmis* são economicamente importantes, devido ao seu elevado valor nutricional e à facilidade de cultivo. As estirpes mais ricas em lípidos são normalmente utilizadas para produção de biodiesel. Tendo em conta os diversos compostos bioativos produzidos, a *Tetraselmis* tem um potencial enorme como fonte de alimentos funcionais, para a alimentação humana e para a aquacultura, e compostos para a indústria farmacêutica e cosmética (Arora, 2016).

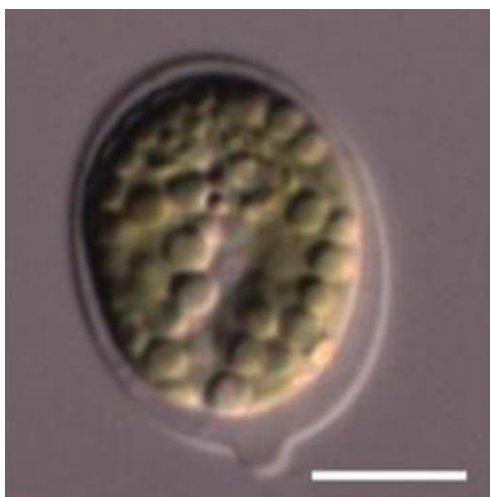


Figura 1.1.1 – *Tetraselmis* sp. CTP4, vista ao microscópio Scale bar = 5 μ m. Adaptado de (Pereira et al., 2016a)

A *Tetraselmis* sp. CTP4 (Figura 1.1.1) pertence ao ramo *T. striata/convolutae* e foi isolada de amostras de água recolhidas na Ria Formosa (Faro, Portugal) pelo grupo MarBiotech (CCMAR) (Pereira et al., 2016a; Schulze et al., 2017; Varela et al., 2014). Esta é uma estirpe eurialina capaz de se produzir quer em meio preparado com água salgada, quer em águas residuais não-estéreis, podendo até ser utilizada para o tratamento

de águas residuais (Schulze et al., 2017). O tamanho das suas células (9 a 22 μm) (Pereira et al., 2016a) e a perda dos seus flagelos quando sujeita a *stress* leva à sedimentação (Varela et al., 2014).

1.1.2 *Chlorella sorokiniana*

A *Chlorella* pertence ao filo *Chlorophyta* e à família *Chlorellaceae* (Guiry, M.D. & Guiry, 2018). É uma espécie unicelular, de água doce, esférica, o seu diâmetro varia entre 2 a 10 μm de diâmetro, apresenta um cloroplasto com pirenoide, rodeado por reservatórios de amido (Guiry, M.D. & Guiry, 2018; Juntilla, Bautista, & Monotilla, 2015). Microalgas do género *Chlorella* são o eucariota mais cultivado, pois contem um grande teor em proteínas, lípidos e vitaminas (Juntilla et al., 2015; Masojídek & Torzillo, 2014; Y. Zheng et al., 2013).

A *Chlorella sorokiniana* é uma das microalgas com maior produtividade em biomassa e produtos intercelulares, revelando um elevado potencial para a produção de biocombustível, alimentos e compostos de valor elevado, como é o caso dos carotenoides e proteínas (Cecchin et al., 2018; Kumar & Das, 2012; Li, Zheng, Yu, & Chen, 2013). Esta espécie tem a capacidade de acumular grandes quantidades de lípidos, carotenoides e proteínas, a produtividade de alguns compostos pode ser estimulada com recurso a fatores de *stress*, sendo o exemplo mais utilizado a limitação em azoto que possibilita o aumento da produtividade de conteúdo lipídico (Cecchin et al., 2018; Juntilla et al., 2015). Para além da sua elevada produtividade, quer em biomassa quer em metabolitos de interesse (Cecchin et al., 2018), esta estirpe pode também ser utilizada para o tratamento

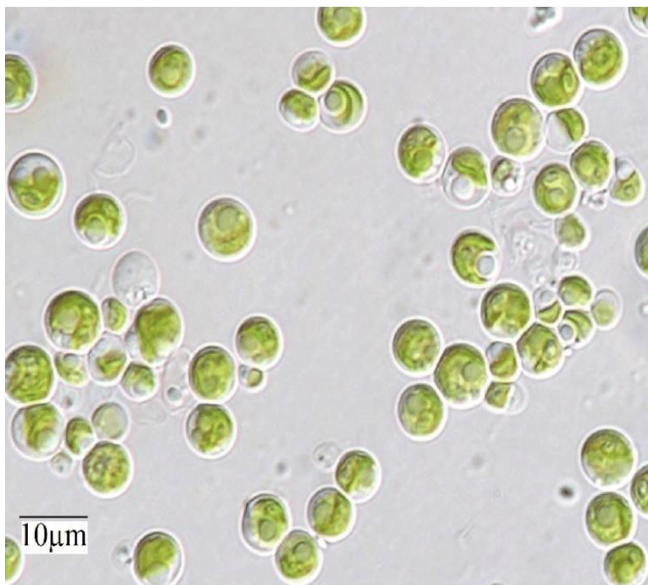


Figura 1.1.2 – Células de *Chlorella sorokiniana* vistas a microscópio (Giovanna Salbitani & Carfagna, 2017).

de águas residuais, e pode ainda ser cultivada em auto, hetero ou mixotrofia (S. Kim, Park, Cho, & Hwang, 2013).

1.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

A composição e características de crescimento das microalgas dependem das condições e modo de cultivo (C.-Y. Chen, Yeh, Aisyah, Lee, & Chang, 2011). Os três principais modos de cultivo são: autotrofia, heterotrofia e mixotrofia. A Tabela 1.2.1 apresenta uma breve comparação das características das condições de cultivo descritas.

Tabela 1.2.1 – Comparação das características das diferentes condições de cultivo (C.-Y. Chen et al., 2011).

Condição de Cultivo	Fonte de Energia	Fonte de Carbono	Custo
Autotrófico	Luz	Inorgânica	Baixo
Heterotrófico	Orgânica	Orgânica	Médio
Mixotrófico	Luz e Orgânica	Inorgânica e Orgânica	Alto

O cultivo por autotrofia é o método mais económico, pois as microalgas utilizam apenas a luz e alguns nutrientes, sendo o dióxido de carbono (CO₂) a fonte de carbono. O fornecimento de luz é uma das variantes mais importantes no cultivo autotrófico. De forma a maximizar a produção de biomassa, a intensidade luminosa deve ser fornecida em níveis elevados (S.-K. Kim, 2015a). Este método pode ser utilizado tanto em biorreatores como em sistemas de tanques abertos. A produção em biorreatores é aplicada para evitar riscos de contaminação e poluição, que normalmente ocorrem nos sistemas abertos (Brennan & Owende, 2010).

Na produção heterotrófica, o carbono é fornecido através de uma fonte orgânica, sendo por vezes, também o azoto fornecido por uma fonte orgânica. O oxigénio é um nutriente que desempenha um papel importante a nível metabólico, uma vez que a sua limitação pode levar à redução da taxa específica de crescimento e consequentemente à produção de biomassa (S.-K. Kim, 2015a). Alguns autores obtiveram elevadas concentrações de biomassa utilizando a microalga *Chlorella sorokiniana* com nitrato de

potássio como fonte de azoto, sendo que a maior biomassa, 33,46 g_{DCW}/L, foi registada aquando da utilização de 80 g/L de glucose e 4 g/L de nitrato de potássio (Li et al., 2013). A utilização de peptona (8 e 12 g/L) e extrato de levedura (5 g/L) como fonte de azoto, em conjunto com glucose (5 g/L) como fonte de carbono também apresenta valores elevados de biomassa (17,2, 17,6 e 15,7 g_{DCW}/L , respetivamente) (Azma, Mohamed, Mohamad, Rahim, & Ariff, 2011). Os resultados menos promissores foram obtidos com a utilização de nitrato de amónio e nitrato de sódio como fonte de azoto e quando utilizado acetato de sódio como fonte de carbono (Azma et al., 2011). A Tabela 1.2.2 apresenta a produtividade e as concentrações das fontes de carbono e de azoto utilizadas para várias espécies, em heterotrofia. A fonte de carbono mais utilizada é a glucose, mas de forma a obter uma produção mais sustentável é necessário estabelecer quais as concentrações de carbono e azoto que potenciam uma maior produção de biomassa, uma vez que esta fonte acarreta custos elevados de produção. A disponibilidade de azoto tem um impacto elevado no perfil de ácidos gordos e lípidos, sendo que concentrações baixas deste nutriente favorecem a acumulação intracelular de lípidos (S.-K. Kim, 2015a). A composição do meio e a presença de compostos orgânicos, aumentam a probabilidade de contaminação com fungos e bactérias (S.-K. Kim, 2015a). Por outro lado, algumas das vantagens da heterotrofia é a eliminação do fornecimento de luz, a obtenção de elevada densidade celular e o elevado conteúdo lipídico das células (Brennan & Owende, 2010; S.-K. Kim, 2015a).

O cultivo em mixotrofia é uma combinação dos dois modos tróficos descritos anteriormente, ou seja, algumas microalgas possuem a capacidade de terem ativos os dois sistemas, o autotrófico, em que fixam o CO₂ na presença de luz e o heterotrófico, em que assimilam uma fonte de carbono orgânica. Estas microalgas consomem dióxido de carbono atmosférico (por fotossíntese, na presença de luz), carbono orgânico e micronutrientes presentes no meio de cultivo (C.-Y. Chen et al., 2011; S.-K. Kim, 2015a). Tal como ocorre para as culturas heterotróficas, a presença de compostos orgânicos no meio aumenta a probabilidade de contaminação, sendo este uma das grandes limitações no aumento de escala de produção (S.-K. Kim, 2015a). O cultivo em mixotrofia reduz o tempo de cultivo e a fotoinibição que pode ocorrer, e leva a um aumento da produção de biomassa e à diminuição da quantidade de matéria orgânica utilizada (Brennan & Owende, 2010; Khan et al., 2018).

Um das maiores desvantagens do cultivo de hetero e mixotrofia é o elevado custo associado à composição do meio de cultura, o que leva ao aumento do custo de produção de biomassa. Uma forma de diminuir este custo é utilizar fontes de carbono menos dispendiosas como é o caso de águas residuais e resíduos provenientes da indústria e agricultura (S.-K. Kim, 2015a). Na Tabela 1.2.3 estão representados os valores de produtividade e as concentrações de carbono utilizadas para o cultivo em mixotrofia.

A composição do meio de cultura, a fonte de carbono e de azoto usadas, são também fatores bastante importantes para o aumento da biomassa, assim como a composição vitamínica deve ser otimizada, de forma a aumentar a taxa de crescimento das espécies em estudo. Alguns dos meios mais utilizados nos cultivos são: Guillard's f/2 (Guillard & Ryther, 1962), PCA (Plate Count Agar) (Atlas, 2005), TAP (Tris Acetate Phosphate) (Gorman & Levine, 1965), ALGAL (Fabregas, Abalde, Herrero, Cabezas, & Veiga, 1984), Sueoka (Sueoka, Chiang, & Kates, 1967) e Walne (Walne, 1970).

Para além das diversas condições de cultivo e modo de operação, existem ainda outros fatores que influenciam o sucesso do processo de produção de microalgas. As culturas podem ser descritas com base no mecanismo de cultura utilizado para o estudo da morfologia, fisiologia, resposta a fatores químicos e físicos, cruzamentos experimentais e extração de compostos de contaminação (Kiuru et al., 2014). Dependendo dos organismos presentes nos inóculos, existem três mecanismos que diferenciam as culturas:

- Unialgal ou Não-axénica: Cultivo de uma única espécie de alga em conjunto com bactérias, fungos, ou protozoários (Kiuru et al., 2014);
- Clonal: cultura de um conjunto de genoma único (por exemplo, culturas derivadas de uma única célula ou tecido vegetativo ou de uma célula reprodutiva) e propagadas vegetativamente (Kiuru et al., 2014);
- Axénica: Idêntica à cultura unialgal mas na ausência de bactérias, fungos, ou protozoários (Kiuru et al., 2014);

1.2.1 Carbono (C)

O carbono é um nutriente vital para o desenvolvimento da microalga, para além de ser o seu principal constituinte é também a sua fonte de energia. Para as culturas em heterotrofia e mixotrofia é comum utilizar-se a glucose, sacarose, amido, acetato ou

glicerol como fonte de carbono (C.-Y. Chen et al., 2011; Daliry et al., 2017; S.-K. Kim, 2015a). A concentração de fonte de carbono utilizada é também um fator de elevada importância para o crescimento da microalga, em alguns casos uma concentração elevada pode ter efeitos inibidores na produtividade, enquanto que em outros casos pode estimular bastante o crescimento (Daliry et al., 2017). Como referido anteriormente a Tabela 1.2.2 apresenta a produtividade e as concentrações das fontes de carbono utilizadas para várias espécies, em heterotrofia, e a Tabela 1.2.3 para o cultivo em mixotrofia.

1.2.2 Azoto (N)

O azoto desempenha um papel importante na regulação do crescimento da microalga e no metabolismo dos lípidos. Algumas das fontes azoto utilizadas são: ureia, nitrato de potássio, sulfato de amónia, nitrato de amónia, peptona e extrato de levedura (Daliry et al., 2017). Tal como acontece para o carbono, e para os restantes nutrientes, a concentração em que o azoto está presente no meio pode estimular ou inibir o crescimento e a produção de compostos, como é o caso dos lípidos. No caso do azoto, a sua limitação leva a um aumento da produtividade de lípidos, mas tem um efeito inibidor na concentração em biomassa (Daliry et al., 2017). A Tabela 1.2.2 apresenta também várias fontes de azoto e a concentração utilizada para o cultivo de diferentes estirpes de microalgas, em heterotrofia.

1.2.3 Fósforo (P)

O fósforo é um nutriente essencial na fotossíntese e a sua concentração no meio afeta significativamente o crescimento da microalga (Chu et al., 2013; W. Kim et al., 2012). O fósforo desempenha um papel importante na produção lipídica aquando da limitação em azoto. A fonte de fósforo normalmente utilizada é o fosfato dipotássico (K_2HPO_4) (W. Kim et al., 2012). Este nutriente é acumulado no interior das células na forma de polifosfato (Poly-P), este composto pode ser ácido insolúvel – armazenado nas células e utilizado quando a concentração de fósforo no meio é insuficiente para o crescimento da microalga – ou ácido solúvel – que está envolvido no metabolismo do ADN e na produção proteica (Chu et al., 2013).

Tabela 1.2.2 – Efeito de diferentes fontes de carbono e de azoto no crescimento de várias espécies de microalgas em condições heterotróficas.

Espécie	Fonte de Carbono	Concentração (g/L)	Fonte de Azoto	Concentração (g/L)	PS (g _{dcw} /L)	Prod _{xn} (g/L.d)	Condições de Cultura	Referência
<i>Chlorella</i> sp	Glicerol	10	Amónia total		5,58	335	Heterotrófico <i>Batch</i>	(H. Zheng et al., 2015)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Extrato de levedura	0,75	11,7		Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	10	Extrato de levedura	0,75	7,9		Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	15	Extrato de levedura	0,75	6,6		Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Acetato de Sódio	0,5	Extrato de levedura	0,75	6,0		Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Acetato de Sódio	1	Extrato de levedura	0,75	4,1		Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Acetato de Sódio	2	Extrato de levedura	0,75	3,3		Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Peptona	4	11,7		Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)

Tabela 1.2.2 – Efeito de diferentes fontes de carbono e de azoto no crescimento de várias espécies de microalgas em condições heterotróficas. (continuação)							
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Peptona	8	17,2	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Peptona	12	17,6	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Extrato de levedura	5	15,7	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Extrato de levedura	10	9,1	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Extrato de levedura	15	10,3	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Extrato de carne	5	17,3	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Extrato de carne	10	8,82	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Extrato de carne	15	8,1	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Extrato de malte	5	8,4	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Extrato de malte	10	11,3	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)

Tabela 1.2.2 – Efeito de diferentes fontes de carbono e de azoto no crescimento de várias espécies de microalgas em condições heterotróficas. (continuação)							
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Extrato de malte	15	9,4	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Ureia	1,2	8,1	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Ureia	2,2	4,8	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Ureia	3,2	4,3	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Nitrato de sódio	1	2,8	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Nitrato de sódio	3	3,5	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Nitrato de sódio	5	2,8	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Nitrato de amónio	1	2,0	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Nitrato de amónio	3	0,07	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	5	Nitrato de amónio	5	0,06	Heterotrófico, sem luz, meio Walne	(Azma et al., 2011)

Tabela 1.2.2 – Efeito de diferentes fontes de carbono e de azoto no crescimento de várias espécies de microalgas em condições heterotróficas. (continuação)							
<i>Chlorella sp.</i> Bta 9031	Frutose	5			0,683	0,012	Heterotrófico, meio Blue Green- 11 (Mondal et al., 2017)
<i>Chlorella sp.</i> Bta 9032	Na-Acetato	5			0,718	0,014	Heterotrófico, meio Blue Green- 11 (Mondal et al., 2017)
<i>Chlorella sp.</i> Bta 9033	Melaço	5			0,843	0,022	Heterotrófico, meio Blue Green- 11 (Mondal et al., 2017)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	20	Nitrato de potássio	1	7,09		Heterotrófico, meio Kuhl (Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	20	Nitrato de potássio	2	10,55		Heterotrófico, meio Kuhl (Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	20	Nitrato de potássio	4	10,18		Heterotrófico, meio Kuhl (Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	20	Nitrato de potássio	6	10,73		Heterotrófico, meio Kuhl (Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	20	Nitrato de potássio	8	10,37		Heterotrófico, meio Kuhl (Li et al., 2013)

Tabela 1.2.2 – Efeito de diferentes fontes de carbono e de azoto no crescimento de várias espécies de microalgas em condições heterotróficas. (continuação)							
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	40	Nitrato de potássio	1	6,16	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	40	Nitrato de potássio	2	13,07	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	40	Nitrato de potássio	4	14,83	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	40	Nitrato de potássio	6	18,89	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	40	Nitrato de potássio	8	19,43	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	60	Nitrato de potássio	1	6,67	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	60	Nitrato de potássio	2	13,75	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	60	Nitrato de potássio	4	22,92	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	60	Nitrato de potássio	6	25,43	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	60	Nitrato de potássio	8	24,36	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)

Tabela 1.2.2 – Efeito de diferentes fontes de carbono e de azoto no crescimento de várias espécies de microalgas em condições heterotróficas. (continuação)							
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	80	Nitrato de potássio	1	7,41	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	80	Nitrato de potássio	2	15,82	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	80	Nitrato de potássio	4	33,46	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	80	Nitrato de potássio	6	25,35	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	80	Nitrato de potássio	8	22,28	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	80	Nitrato de potássio	1	6,64	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	80	Nitrato de potássio	2	16,02	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	80	Nitrato de potássio	4	24,20	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	80	Nitrato de potássio	6	24,43	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucose	80	Nitrato de potássio	8	20,59	Heterotrófico, meio Kuhl	(Li et al., 2013)

<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	10	Nitrato de sódio	1,00	Heterotrófico, meio Guillard's f/2	(Lu, Wang, Yang, Zhu, & Pan, 2017a)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	10	Nitrato de sódio	1,18	Heterotrófico, meio Guillard's f/2	(Lu et al., 2017a)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	10	Nitrato de sódio	1,26	Heterotrófico, meio Guillard's f/2	(Lu et al., 2017a)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	10	Nitrato de sódio	1,37	Heterotrófico, meio Guillard's f/2	(Lu et al., 2017a)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	10	Nitrato de sódio	1,25	Heterotrófico, meio Guillard's f/2	(Lu et al., 2017a)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glucose	10	Nitrato de sódio	1,19	Heterotrófico, meio Guillard's f/2	(Lu et al., 2017a)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Glucose			7,31	Heterotrófico, meio Basal	(H.-H. Chen & Jiang, 2017)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Hidrolisado de amido de mandioca			1,58	Heterotrófico, meio Basal	(H.-H. Chen & Jiang, 2017)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Melaço hidrolisado			3,58	Heterotrófico, meio Basal	(H.-H. Chen & Jiang, 2017)

<i>Chlorella vulgaris</i>	Acetato e glicerol	0,076 - 0,082	Heterotrófico, meio Basal	(H.-H. Chen & Jiang, 2017)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Glucose	0,3 - 0,47	Heterotrófico, meio Basal	(H.-H. Chen & Jiang, 2017)

PS – Peso seco (g_{dcw}/ L); Prod_{xn} – Produtividade (g/ L.d)

Tabela 1.2.3 – Efeito de diferentes fontes de carbono e de azoto no crescimento de várias espécies de microalgas em condições de mixotrofia.

Espécie	Fonte de Carbono	Concentração (g/L)	PS (g _{dcw} / L)	Prod _{xn} (g / L.d)	Condições de Cultura	Referência
<i>Chlorella sp. Bta 9031</i>	Na-acetato	5	1,45	0,12	Mixotrófico, meio Blue Green-11	(Mondal et al., 2017)
<i>Chlorella sp. Bta 9032</i>	Frutose	5	1,25	0,10	Mixotrófico, meio Blue Green-11	(Mondal et al., 2017)
<i>Chlorella sp. Bta 9033</i>	Melaço	5	1,55	0,07	Mixotrófico, meio Blue Green-11	(Mondal et al., 2017)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Soro de queijo não hidrolisado	10	1,98	0,32	Mixotrófico	(Abreu, Fernandes, Vicente, Teixeira, & Dragone, 2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Soro de queijo hidrolisado	10	3,58	0,75	Mixotrófico	(Abreu et al., 2012)

Tabela 1.2.3 – Efeito de diferentes fontes de carbono e de azoto no crescimento de várias espécies de microalgas em condições de mixotrofia. (continuação)						
<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucose + galactose	5 + 5	2,24	0,46	Mixotrófico	(Abreu et al., 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Glucose	0,5	1		Mixotrófico, meio Guillard's f/2	(Wang, Fu, & Pei, 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Glucose	1	1,2		Mixotrófico, meio Guillard's f/2	(Wang et al., 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Glucose	2	1		Mixotrófico, meio Guillard's f/2	(Wang et al., 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Glucose	5	0,6		Mixotrófico, meio Guillard's f/2	(Wang et al., 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Amido	0,5	0,6		Mixotrófico, meio Guillard's f/2	(Wang et al., 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Amido	1	0,5		Mixotrófico, meio Guillard's f/2	(Wang et al., 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Amido	2	0,8		Mixotrófico, meio Guillard's f/2	(Wang et al., 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Amido	5	0,6		Mixotrófico, meio Guillard's f/2	(Wang et al., 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Acetato de sódio	0,5	1		Mixotrófico, meio Guillard's f/2	(Wang et al., 2012)

<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Acetato de sódio	1	0,7	Mixotrófico, meio Guillard's f/2	(Wang et al., 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Acetato de sódio	2	0,7	Mixotrófico, meio Guillard's f/2	(Wang et al., 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Acetato de sódio	5	0,6	Mixotrófico, meio Guillard's f/2	(Wang et al., 2012)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Acetato	1	1,5	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Acetato	2	1,7	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Acetato	5	1,6	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Acetato	10	2	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Glucose	1	1,3	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Glucose	2	1,4	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Glucose	5	1,6	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)

Tabela 1.2.3 – Efeito de diferentes fontes de carbono e de azoto no crescimento de várias espécies de microalgas em condições de mixotrofia. (continuação)					
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Glucose	10	1,7	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Glicerol	1	1,4	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Glicerol	2	1,6	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Glicerol	5	1,6	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Glicerol	10	1,5	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Sacarose	1	1,3	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Sacarose	2	1,3	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Sacarose	5	1,4	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Sacarose	10	1,2	Mixotrófico, TAP	(Moon et al., 2013)

PS – Peso seco (g_{DCW}/L); Prod_{xn} – Produtividade (g/L.d)

1.2.4 Enxofre (S)

O enxofre é um macronutriente importante para o crescimento das microalgas, estando presente no processo de divisão celular, metabolismo proteico, além de ser um elemento estrutural de proteínas, vitaminas e aminoácidos (Golub & Voyevoda, 2013; Hase, Morimura, Mihara, & Tamiya, 1958; G. Salbitani, Vona, Bottone, Petriccione, & Carfagna, 2015). A limitação em enxofre pode levar por um lado, a um resultado positivo, promovendo um aumento da acumulação de lípidos, e por outro lado, a um resultado negativo, levando a um descontrole da divisão celular (Golub & Voyevoda, 2013).

1.3 APLICAÇÕES

As microalgas são fontes de produtos de alto valor comercial (Borowitzka, 2013). Os compostos extraídos destes organismos podem ter várias aplicações. Os produtos extraídos das microalgas incluem: pigmentos, antioxidantes, polissacarídeos, triglicéridos, vitaminas e extratos (Morales-Sánchez, Martinez-Rodriguez, & Martinez, 2017).

1.3.1 Biodiesel

As microalgas oleaginosas acumulam naturalmente elevadas quantidades de lípidos. Normalmente o conteúdo lipídico das algas oleaginosas corresponde entre 20 a 70% do peso seco, mas algumas espécies conseguem atingir os 90% quando submetidas a certas condições nutricionais (H.-H. Chen & Jiang, 2017). A composição em lípidos depende da temperatura, pH, nutrição (concentração de carbono, azoto, fósforo, enxofre), condições de cultura e espécie (Griffiths et al., 2011; Morales-Sánchez et al., 2017), estas propriedades podem ser modificadas de modo a aumentar a produção de ácidos gordos específicos (Perez-Garcia, Escalante, de-Bashan, & Bashan, 2011). A saturação dos ácidos gordos produzidos é diretamente dependente da concentração de açúcares (Perez-Garcia et al., 2011). A produção e acumulação de lípidos é maior quando o meio está em saturação de nutrientes e em excesso de carbono, nesta fase o carbono é metabolizado e são produzidos os triglicéridos (Morales-Sánchez et al., 2017). Nas culturas autotróficas e heterotróficas a acumulação de lípidos é atribuída ao consumo de açúcares numa taxa superior à da produção de células (Perez-Garcia et al., 2011). Estima-se que a produção em condições de heterotrofia obtenha resultados até 4 vezes superiores aos obtidos em autotrofia, algumas das espécies em que este fenómeno se verifica são *Chlorella*

saccharophila, *Chlorella vulgaris*, *Nitzschia. laevis*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Navicula incerta* e *Tetraselmis suecica* (Perez-Garcia et al., 2011).

1.3.2 Compostos bioativos

Além das suas aplicações como alimento na aquacultura e da produção de biocombustíveis e no setor alimentar, as microalgas também representam uma fonte de produtos de elevado valor para a indústria farmacêutica e de cosmética (S.-K. Kim, 2015b). A estes produtos dá-se o nome de compostos bioativos. Os compostos bioativos são metabolitos primários ou secundários que desencadeiam efeitos, benéficos ou nocivos, no organismo a nível dos tecidos e das células, estes podem também ser considerados nutrientes não essenciais. Estes compostos podem ser agrupados de acordo com a sua natureza. Os grupos existentes atualmente são: biopolímeros, biocerâmicas, produtos naturais, ácidos gordos, toxinas marinhas, pigmentos marinhos, nanopartículas marinhas, estes podem ser obtidos de vários organismos marinhos (Jha & Zi-rong, 2004; Richmond, 2004). Os produtos das microalgas mais utilizados para a indústria farmacêutica são os pigmentos, dos quais se destacam os carotenoides (α -caroteno e β -caroteno), ficocianina, astaxantina, clorofilas (clorofila a e b), fucoxantina, licopeno, luteína, ficobiliproteínas, xantofilas (S.-K. Kim, 2015a).

Os compostos provenientes das microalgas podem apresentar propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antialérgicas, antivirais, antibacterianas, dermoprotetoras, preventivas contra doenças ósseas, proteção do sistema cardiovascular, neuro-protetoras (Cuellar-Bermudez et al., 2015; Ibañez et al., 2012; Khan et al., 2018; S.-K. Kim, 2015a, 2015b). Cada vez mais se regista um aumento do interesse na produção das microalgas para extração dos seus compostos bioativos devido a estas propriedades.

2 OBJETIVOS

Esta dissertação de mestrado foi realizada no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA), integrado no Centro de Investigação Marinha e Ambiental (CIMA). O trabalho foi desenvolvido em parceria com a Universidade de Huelva, no âmbito do Programa INTERREG V A Espanha-Portugal (POCTEP) 2014-2020.

Este trabalho teve como objetivo principal a otimização da composição nutricional do meio de crescimento de microalgas (meio ALGAL e meio TAP), de modo a aumentar a sua produtividade e a tornar a produção das microalgas sustentável.

Para a otimização do meio ALGAL utilizou-se a microalga *Tetraselmis* sp. CTP4. Esta fase do trabalho experimental teve como objetivos específicos:

- a. Avaliação da capacidade da microalga crescer na presença de fontes de carbono orgânicas;
- b. Otimização das condições de cultivo da microalga *Tetraselmis* sp. CTP4;

A segunda fase do trabalho consistiu na otimização do meio TAP para a produção de *Chlorella sorokiniana*, em que os objetivos específicos foram:

- a. Otimização da composição do meio em fósforo;
- b. Otimização da composição do meio em enxofre;
- c. Definição das condições de produção para obtenção de elevado rendimento em biomassa e metabolitos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICROORGANISMOS

Neste trabalho foram utilizadas duas espécies de microalgas, a *Tetraselmis* sp. CTP4, isolada de amostras de água retiradas da Ria Formosa (Faro, Portugal) pelos Laboratórios MarBiotech da Universidade do Algarve (Pereira et al., 2016a) e a *Chlorella sorokiniana*, gentilmente cedida pela Professora Rosa Leon, responsável pelo Laboratório de Biotecnologia de Microalgas da Universidade de Huelva, Espanha, no âmbito do Programa INTERREG V A España-Portugal (POCTEP) 2014-2020.

3.2 MEIOS DE CULTURA

Foram utilizados meios diferentes para as culturas das duas estirpes. Para a *Tetraselmis* sp. CTP4 foi utilizado o meio ALGAL e para a *Chlorella sorokiniana* foi utilizado o meio TAP.

3.2.1 *Tetraselmis* sp. CTP4

As culturas de *Tetraselmis* cresceram em água salgada estéril suplementada com meio ALGAL modificado, a uma concentração de 1,5 mL de meio para 1 L de água salgada. A produção do meio é baseada no método descrito por (Fabregas et al., 1984), denominado meio ALGAL.

O ensaio foi realizado em mixotrofia (com luz, agitação e arejamento) e em heterotrofia (sem luz e sem arejamento e com agitação), o meio foi suplementado com diferentes concentrações de glucose, com o objetivo de otimizar o crescimento microalga.

3.2.2 *Chlorella sorokiniana*

As culturas de *Chlorella sorokiniana* foram inicialmente cultivadas em meio TAP sólido e depois foram passadas para meio líquido, a composição do meio e das soluções stock está descrita na Tabela 3.2.2.

O ensaio decorreu em mixotrofia (com luz e arejamento), e as concentrações de fósforo e enxofre foram alteradas para testar qual a que proporcionava um maior crescimento. O ácido acético é a fonte de carbono naturalmente presente no meio TAP.

Tabela 3.2.1 – Composição do meio TAP (Gorman & Levine, 1965).

Composto	Concentração (mL/L)
Solução A	10
Solução B (Tampão Fosfato II)	1
Hutner traces 1x	5
Tris HCl 1m	20
Ácido acético	0,95
Soluções Stock	
Composto	Concentração (g/L)
Solução A	
CaCl ₂ 2H ₂ O	5
MgSO ₄ 7H ₂ O	10
NH ₄ Cl	40
Solução B (Tampão Fosfato II)	
K ₂ HPO ₄	115
KH ₂ PO ₄	6

3.3 ENSAIOS EXPERIMENTAIS

Como referido anteriormente, os ensaios com o meio ALGAL foram realizados em hetero e mixotrofia e os ensaios com o meio TAP foram realizados em mixotrofia. Nos ensaios de mixotrofia, os *erlenmeyers* foram mantidos numa sala iluminada à temperatura ambiente, tendo sido montado em sistema de arejamento, em que o fluxo de ar passava por um filtro de ar (Pressure Filters Sartolab® P20), antes de entrar em cada *erlenmeyer*. Para os ensaios em heterotrofia, os *erlenmeyers* foram mantidos numa agitadora sem luz artificial. Todo o material utilizado estava estéril e todas as manipulações foram realizadas dentro de uma câmara de fluxo laminar horizontal.



Figura 3.3.1 – Diferentes fases do ensaio experimental.

3.3.1 *Tetraselmis* sp. CTP4

Para este estudo comparou-se o crescimento da microalga em diferentes condições, para tal utilizou-se diferentes concentrações de glucose como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de azoto. A estirpe cresceu inicialmente em meio sólido e foi posteriormente passada para meio líquido, onde se realizou o aumento de escala, desde *erlenmeyers* de 100 mL com 50 mL de meio até *erlenmeyers* de 500 mL com 250 mL de meio. Para os pré-inóculos foram preparadas as seguintes condições:

- Meio ALGAL
- Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura;
- Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de Glucose;

Para os ensaios preparou-se cinco condições diferentes, que foram inoculadas a 20% (v/v):

- Meio ALGAL (A) (controlo), em duplicado;
- Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura (AE) (controlo), em duplicado;
- Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de Glucose (A5), em triplicado;
- Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de Glucose (A10), em triplicado;

- Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de Glucose (A15), em triplicado.

O ensaio em mixotrofia foi realizado com agitação, luz ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e arejamento constante, e o ensaio em heterotrofia foi realizado sem luz e arejamento apenas com agitação constante, ambos os ensaios decorreram durante 360 horas (15 dias). Diariamente retirou-se 3 mL de amostra de cada *erlenmeyer*, para determinação da biomassa celular e da densidade celular, por absorvância.

3.3.2 *Chlorella sorokiniana*

Para este processo de otimização, variaram-se as concentrações de fósforo e enxofre presentes no meio de cultura. A microalga *Chlorella sorokiniana* foi passada do meio sólido para o meio líquido através de um aumento de escala gradual, desde 25 mL de volume até 200 mL. Os ensaios de otimização foram realizados em *erlenmeyers* de 500 mL com 200 mL de meio.

Esta experiência de otimização do meio de cultivo foi dividida em 3 fases. Na primeira fase, foi otimizada a concentração de fósforo, onde se testaram-se 6 concentrações diferentes; na segunda fase, procedeu-se à otimização do enxofre e testaram-se igualmente 6 concentrações. Numa última fase, selecionaram-se as concentrações de fósforo e de enxofre que apresentaram melhores resultados e testou-se o crescimento da microalga com as condições otimizadas (O). Tanto para o fósforo como para o enxofre, as concentrações a testar foram idênticas: 0,3 mM (B), controlo (C), 1 mM (D), 3 mM (E), 6 mM (F) e 10 mM (G). Considerou-se como controlo, a concentração de fósforo (0,544 mM) e de enxofre (0,59 mM) presente meio TAP. Para variar a concentração de fósforo modificou-se o volume de solução B adicionado ao meio, e para a alteração da concentração de enxofre modificou-se o volume de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) adicionado à solução A. Os ensaios realizaram-se com luz e arejamento constante. A primeira e segunda fase, otimização da concentração de fósforo e enxofre, respetivamente, decorreram durante 336 horas e a última fase durante 216 horas. Os ensaios decorreram em triplicado e diariamente retiraram-se cerca de 3,5 mL de amostra para análise da densidade celular, quantificação de carotenoides e de acetato, e de dois em dois dias retirou-se 1,5 mL de amostra para determinação da biomassa formada.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

Ao longo de todos os ensaios foram recolhidas amostras para que se pudesse preceder aos testes analíticos descritos abaixo. Para os ensaios com a *Tetraselmis* sp. CTP4 apenas se utilizou os métodos para determinação da biomassa e da densidade ótica.

3.4.1 Determinação da biomassa

Para a determinação do peso seco, pipetou-se diariamente, em triplicado, 1,5 mL de amostra para *eppendorf* previamente secos na estufa (Binder FD53, EUA) e pesados numa balança analítica de precisão (Precisa XB 120A, Suíça). As amostras foram depois centrifugadas durante 10 minutos a 7500 rpm (Eppendorf AG, Centrifuge 5415 D, Alemanha), separou-se o sobrenadante que depois foi congelado em *eppendorf* para futuras análises. Os *eppendorf* com a biomassa foram colocados a secar na estufa (Binder FD53, EUA) a $50 \pm 1^\circ \text{C}$, durante aproximadamente 48 horas. Os tubos foram retirados da estufa e deixados a arrefecer à temperatura ambiente e depois pesados (Precisa XB 120A, Suíça). O peso seco (PS) de biomassa foi obtido através da subtração do peso inicial (*eppendorf*) ao peso final (*eppendorf* + *pellet* seco) (equação 1), este valor foi depois multiplicado por 1000 mL, e por fim dividido pelo volume de amostra, neste caso 1,5 mL (equação 2). sendo expresso em g/L.

$$\text{PS} = \text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}$$

Equação 1

$$\text{Biomassa (g/L)} = \frac{\text{PS} \times 1000 \text{ mL}}{1,5 \text{ mL}}$$

Equação 2

3.4.2 Determinação da densidade ótica

Com o objetivo de acompanhar o crescimento celular das estirpes realizou-se diariamente para todos os ensaios a leitura da densidade ótica (DO). Esta leitura foi feita em triplicado a um comprimento de onda de 750 nm num espectrofotómetro (Cintra 202 GBC, Inglaterra), com o *software GBC Spectral*. Para os brancos, utilizou-se o meio de cultura retirado antes da inoculação. As amostras foram diluídas para que os valores de absorvância obtidos ficassem dentro da gama de linearização. Uma vez que as amostras foram diluídas para a leitura, de forma a obter o valor real da densidade ótica foi necessário multiplicar o valor obtido pelo fator de diluição.

3.4.3 Determinação de pigmentos totais, clorofilas e carotenoides

Seguindo o método descrito por Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987), procedeu-se à extração e quantificação dos carotenoides por espectrofotometria (GBC Cintra 202). Primeiramente, centrifugou-se (Hettich Zentrifugen Universal 320, Alemanha) 1,5 mL de amostra a 3000 rpm durante 2 minutos, e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 4 mL de acetona a 100% ao *pellet*, e procedeu-se à sonicação num banho de ultrassons (Selecta Ultrassons H, Espanha) durante 1 h. Por fim, centrifugou-se e reservou-se o sobrenadante. O processo foi repetido até o *pellet* ficar com uma coloração branca. No fim o *pellet* foi descartado e os sobrenadantes resultantes foram lidos aos comprimentos de onda de 662, 645 e 470 nm. Os valores obtidos foram aplicados nas equações desenvolvidas por Lichtenthaler (1987) apresentadas abaixo. A partir destas equações obteve-se os valores em mg/L de clorofila a (C_a), clorofila b (C_b), clorofila total (C_T) e carotenoides (C_C).

$$C_a = 11,24 \times A_{662\text{nm}} - 2,04 \times A_{645\text{nm}}$$

Equação 3

$$C_b = 20,13 \times A_{645\text{nm}} - 4,19 \times A_{662\text{nm}}$$

Equação 4

$$C_T = 7,05 \times A_{662\text{nm}} + 18,09 \times A_{645\text{nm}}$$

Equação 5

$$C_c = \frac{1000 \times A_{470\text{nm}} - 1,90 \times C_a - 63,14 \times C_b}{214}$$

Equação 6

3.4.4 Quantificação do ácido acético

A determinação da concentração em ácido acético foi feita com recurso à Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC) (Elite LaChrom Hitachi, Japão). Utilizou-se a coluna Rezex ROA - *Organic Acid H+* (8 %) 300 x 7,80 mm da Phenomenex com o eluente de 4 mM H₂SO₄, fluxo 0,6 ml/min e temperatura 63° C, detetor de índice de refração.

Para esta análise utilizou-se o sobrenadante resultante da centrifugação para obter o peso seco. O sobrenadante foi filtrado com recurso a filtros de membrana hidrofóbica para seringa com uma porosidade de 0,22 μm (WHATMAN) para um *vial*.

Para a determinação da concentração da fonte de carbono no meio foram traçadas curvas padrão de ácido acético a concentrações de 0,4 g/L, 0,6 g/L, 0,8 g/L, 0,95 g/L (concentração inicial presente no meio de cultura) e 1,2 g/L.

3.5 PARÂMETROS CINÉTICOS DO CRESCIMENTO

3.5.1 Taxa específica de crescimento (μ)

Para a determinação da taxa específica de crescimento recorreu-se à regressão linear do logaritmo do peso seco em função do tempo, relativos à fase exponencial do crescimento, assim a taxa específica de crescimento corresponde ao declive da reta obtida na fase exponencial. Esta relação resume-se na equação 7, em que x corresponde ao peso seco em g/L no tempo (t), expresso em horas ou dias e x_0 corresponde ao peso seco no tempo inicial.

$$\mu = \frac{\ln(x) - \ln(x_0)}{t}$$

Equação 7

3.5.2 Produtividade específica máxima de biomassa

A produtividade específica máxima de biomassa, expressa em $g_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$ ou $g_{\text{biomassa}}/\text{L.h}$, é definida como a quantidade máxima de biomassa obtida ($X_{\text{máx}}$) por unidade de tempo em que se registou esse máximo ($t_{X_{\text{máx}}}$) e foi calculada através da equação 8. A biomassa máxima é expressa em g/L e o tempo é expresso em dias ou horas.

$$\text{Produtividade máxima biomassa} = \frac{X_{\text{máx}}}{t_{X_{\text{máx}}}}$$

Equação 8

3.5.3 Produtividade total de biomassa

Define-se por produtividade total de biomassa ($g_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$ ou $g_{\text{biomassa}}/\text{L.h}$) a diferença entre a biomassa final (X_F) e a biomassa inicial (X_I), em g/L, por unidade de tempo final (t_F), em dias ou horas. Esta relação é expressa pela seguinte equação:

$$\text{Produtividade total biomassa} = \frac{X_F - X_I}{t_F}$$

Equação 9

3.5.4 Produtividade específica máxima de carotenoides

A produtividade específica máxima é obtida através da concentração máxima de carotenoides ($C_{c\text{máx}}$) obtida, em mg/L, a dividir pela biomassa ($X_{\text{tmáx}}$) obtida, em g/L, e pelo tempo ($t_{C\text{máx}}$) em que se obteve o valor máximo, em dias.

$$\text{Produtividade máxima carotenoides} = \frac{C_{c\text{máx}}}{X_{\text{tmáx}} \times t_{C\text{máx}}}$$

Equação 10

A produtividade específica máxima de carotenoides é expressa em ($\text{mg}_{\text{carotenoides}}/\text{g}_{\text{biomassa}}.\text{d}$).

3.5.5 Produtividade total de carotenoides

A produtividade total ($\text{mg}_{\text{carotenoides}}/\text{g}_{\text{biomassa}}.\text{d}$) é obtida através da diferença entre a concentração final (C_{cF}) e inicial (C_{cI}) de carotenoides obtida, em mg/L, a dividir pela diferença entre a biomassa final (X_F) e a biomassa inicial (X_I) obtida, em g/L, e pelo tempo final (t_F), em dias, como expresso na seguinte equação.

$$\text{Produtividade Total Carotenoides} = \frac{C_{cF} - C_{cI}}{(X_F - X_I) \times t_F}$$

Equação 11

3.5.6 Análise de dados

Todos os cálculos e regressões lineares realizados para os dados obtidos a partir dos vários ensaios foram efetuados com recurso ao *software Microsoft Office Excel 2016*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os trabalhos experimentais para esta tese de dissertação foram realizados no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA) da Universidade do Algarve, no âmbito do Programa INTERREG V A Espanha-Portugal (POCTEP) 2014-2020, em parceria com a Universidade de Huelva.

Este trabalho dividiu-se em duas fases. Na primeira, desenvolveram-se trabalhos de otimização da concentração de glucose em meio ALGAL para a microalga *Tetraselmis* sp. CTP4, isolada e identificada por um grupo de investigadores do CCMAR (Pereira et al., 2016b), e na segunda fase, procurou-se otimizar a composição nutricional, em termos das concentrações de fósforo e de enxofre presentes no meio TAP para o cultivo da *Chlorella sorokiniana*, no seguimento do trabalho desenvolvido pelos investigadores da Universidade de Huelva, em colaboração com o LEBA.

4.1 *Tetraselmis* sp. CTP4

Com o objetivo de otimizar o crescimento da estirpe *Tetraselmis* sp. CTP4 analisou-se a densidade ótica e o peso seco diariamente, e a partir dos resultados obtidos determinou-se a taxa específica de crescimento μ (d^{-1}) e a produtividade total e máxima ($g_{\text{biomassa}}/L.d$).

Uma vez que a estirpe utilizada é não-axénica foi necessário interromper o cultivo de alguns *erlenmeyers* devido ao surgimento de contaminações, tal como ocorreu para as culturas representadas na Figura 3.1.1.II. Por vezes o crescimento da contaminação sobreponha-se ao crescimento da microalga devido às elevadas concentrações de açúcares.

4.1.1 Análise do crescimento

Antes de ser colocada em meio líquido a estirpe CTP4 foi cultivada em 3 tipos de meio ALGAL sólido (meio ALGAL, meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura e meio ALGAL com 2,5 g/l de extrato de levedura e 1 g/L de glucose) para que a estirpe se adapte às novas condições de cultivo. Todas as culturas foram inoculadas a 20% (v/v) do volume final. Como referido no ponto 3.3.1 foram preparadas cinco condições diferentes, e testou-se o crescimento em hetero e mixotrofia durante 360 horas (aproximadamente 15 dias), medindo-se diariamente a densidade ótica a 750 nm e o peso seco. Na Figura 4.1.1 é possível observar a média da densidade ótica obtida ao longo do tempo, o peso

seco inicial (t_0) e o peso seco máximo obtido, para cada condição em mixotrofia. A partir dos gráficos é observável a diferença no crescimento de cada condição, sendo que as culturas suplementadas com glucose apresentam um melhor crescimento, o que está de acordo com o descrito por Lu, Wang, Yang, Zhu, & Pan, 2017. Tal como referido anteriormente esta é uma cultura não-axénica, e a presença de contaminantes pode influenciar os valores da densidade ótica, levando a uma incorreta avaliação do perfil de crescimento da microalga, sobrevalorizando os crescimentos. Contudo, os cultivos foram terminados, assim que era observada contaminação. Nos perfis de crescimento é possível

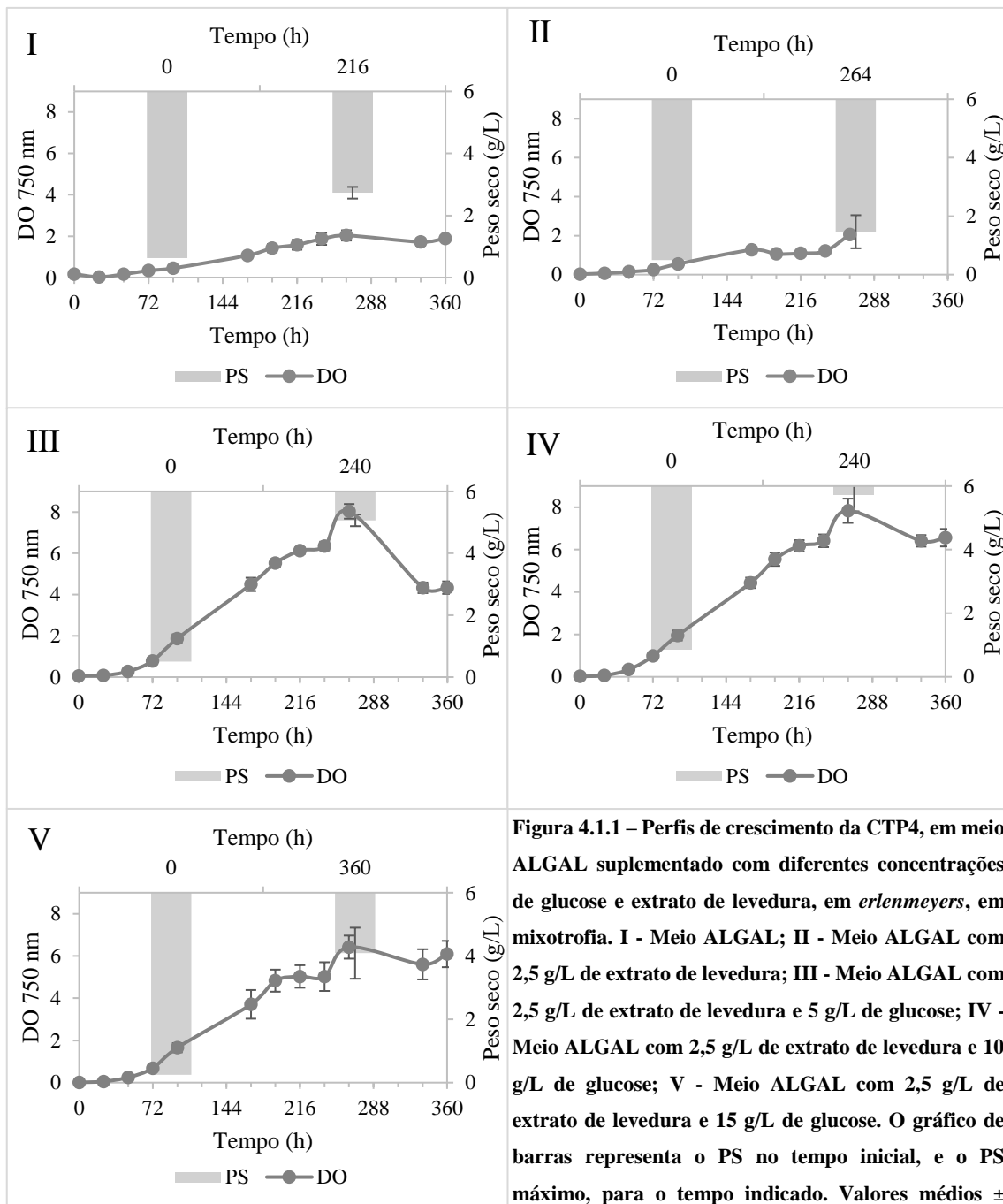


Figura 4.1.1 – Perfis de crescimento da CTP4, em meio ALGAL suplementado com diferentes concentrações de glucose e extrato de levedura, em erlenmeyers, em mixotrofia. I - Meio ALGAL; II - Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura; III - Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de glucose; IV - Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de glucose; V - Meio ALGAL com 2,5 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de glucose. O gráfico de barras representa o PS no tempo inicial, e o PS máximo, para o tempo indicado. Valores médios \pm desvio-padrão

observar que a microalga passa por 3 fases: 1) fase *lag*, caracterizada por um crescimento lento; 2) fase do crescimento exponencial, que se inicia entre o terceiro e quarto dia; 3) fase de declínio, em que ocorre uma diminuição da densidade ótica pois devido ao esgotamento dos nutrientes, a taxa de morte sobrepõe-se à de crescimento, ocorrendo a morte dos microrganismos. (Mata, Martins, & Caetano, 2010)

Na Tabela 4.1.1 é possível observar a taxa específica de crescimento (μ) e a produtividade total e máxima obtida para as diferentes condições de cultura em mixotrofia. Tal como é observável nos perfis de crescimento, os meios suplementados com glucose apresentam taxas de crescimento mais elevadas do que as obtidas no controlo, sendo a taxa específica mais elevada ($0,404\text{ d}^{-1}$) obtida na cultura suplementada com 15 g/L de glucose. No controlo com meio ALGAL a fase exponencial ($\mu=0,285\text{ d}^{-1}$) registou-se entre o quarto e o nono dia, enquanto que para a cultura com meio ALGAL suplementado com extrato de levedura, a fase exponencial ($\mu=0,221\text{ d}^{-1}$) ocorreu entre o segundo e o sétimo dia. Comparando os valores obtidos neste ensaio, com os obtidos por Pereira et al., 2016, em que as taxas específicas variaram entre 0,29 e 0,31 d^{-1} e as produtividades totais entre os 0,25 e os 0,29 $\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$, podemos dizer que o extrato de levedura e a glucose são ótimos aditivos ao meio de cultura proporcionando um aumento na taxa específica de crescimento e na produtividade máxima e total.

Tabela 4.1.1 – Parâmetros cinéticos de crescimento da microalga *Tetraselmis* sp. CTP4 em mixotrofia, para as diferentes condições de cultivo. μ - taxa específica de crescimento (d^{-1}).

Meio de cultura	μ (d^{-1})	Produtividade máxima ($\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$)	Produtividade total ($\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$)
A	0,285	0,304	0,123
AE	0,221	0,133	0,088
A5	0,246	0,507	0,200
A10	0,293	0,427	0,369
A15	0,404	0,273	0,256

A – Meio ALGAL; AE – Meio ALGAL + 2,5 g/L de extrato de levedura; A5 – Meio ALGAL + 2,5 g/L de extrato de levedura + 5 g/L de glucose; A10 – Meio ALGAL + 2,5 g/L de extrato de levedura + 10 g/L de glucose; A15 – Meio ALGAL + 2,5 g/L de extrato de levedura + 15 g/L de glucose.

A Tabela 4.1.2 representa os valores máximos de biomassa (g/L) obtidos em cada condição para heterotrofia e para mixotrofia. Através dos valores obtidos é observável um crescimento superior em mixotrofia, tal como é descrito por (Day & Tsavalos, 1996;

S.-K. Kim, 2015a). Os valores de biomassa voltam a demonstrar a influência positiva da adição de glucose e de extrato de levedura ao meio ALGAL, proporcionando um aumento significativo da biomassa obtida quando comparado aos valores obtidos nos controlos. O carbono e o azoto são nutrientes essenciais para o crescimento das microalgas (Lu et al., 2017b)

Tabela 4.1.2 – Peso seco máximo obtido para as diferentes condições tróficas de cultivo.

Condições de cultivo	Heterotrofia	Mixotrofia
	Peso seco (g/L)	Peso seco (g/L)
A	1,80	2,87
AE	2,87	5,33
A5	3,27	5,20
A10	3,07	7,02
A15	3,13	6,20

A – Meio ALGAL; AE – Meio ALGAL + 2,5 g/L de extrato de levedura; A5 – Meio ALGAL + 2,5 g/L de extrato de levedura + 5 g/L de glucose; A10 – Meio ALGAL + 2,5 g/L de extrato de levedura + 10 g/L de glucose; A15 – Meio ALGAL + 2,5 g/L de extrato de levedura + 15 g/L de glucose.

4.2 *Chlorella sorokiniana*

A segunda fase do trabalho experimental consistiu na otimização da composição nutricional do meio TAP, em termos das concentrações de fósforo e enxofre com o objetivo de melhorar o crescimento da *Chlorella sorokiniana* em mixotrofia. Para tal, realizaram-se três ensaios, o primeiro onde se variou a concentração dos compostos com fósforo, num segundo, com enxofre e por último, o terceiro ensaio consistiu na avaliação do crescimento da *C. sorokiniana*, com as concentrações de fósforo e enxofre que apresentaram melhores resultados. De forma a analisar o crescimento mediu-se diariamente a densidade ótica e o peso seco a cada 48h. Realizou-se também a quantificação de clorofila total e de carotenoides no início e no fim do ensaio, e do consumo de ácido acético presente no meio, no início, a meio e no fim do tempo de cultura.

4.2.1 Otimização da concentração de fósforo

Para a otimização do fósforo testaram-se 5 concentrações diferentes e utilizou-se o meio TAP não-modificado como controlo, a inoculação foi feita a 20% (v/v). As concentrações testadas foram as seguintes: B – 0,3 mM; C – 0,544 mM (controlo); D – 1 mM; E - 3 mM; F - 6 mM; G - 10 mM.

4.2.1.1 Análise do crescimento

Este ensaio teve a duração de 336 horas (14 dias), onde se registou a densidade ótica e o peso seco. Na Figura 4.2.1 é possível observar os perfis de crescimento. A partir da análise dos resultados obtidos através da cromatografia líquida, verificou-se que o acetato foi totalmente consumido em todas as condições testadas.

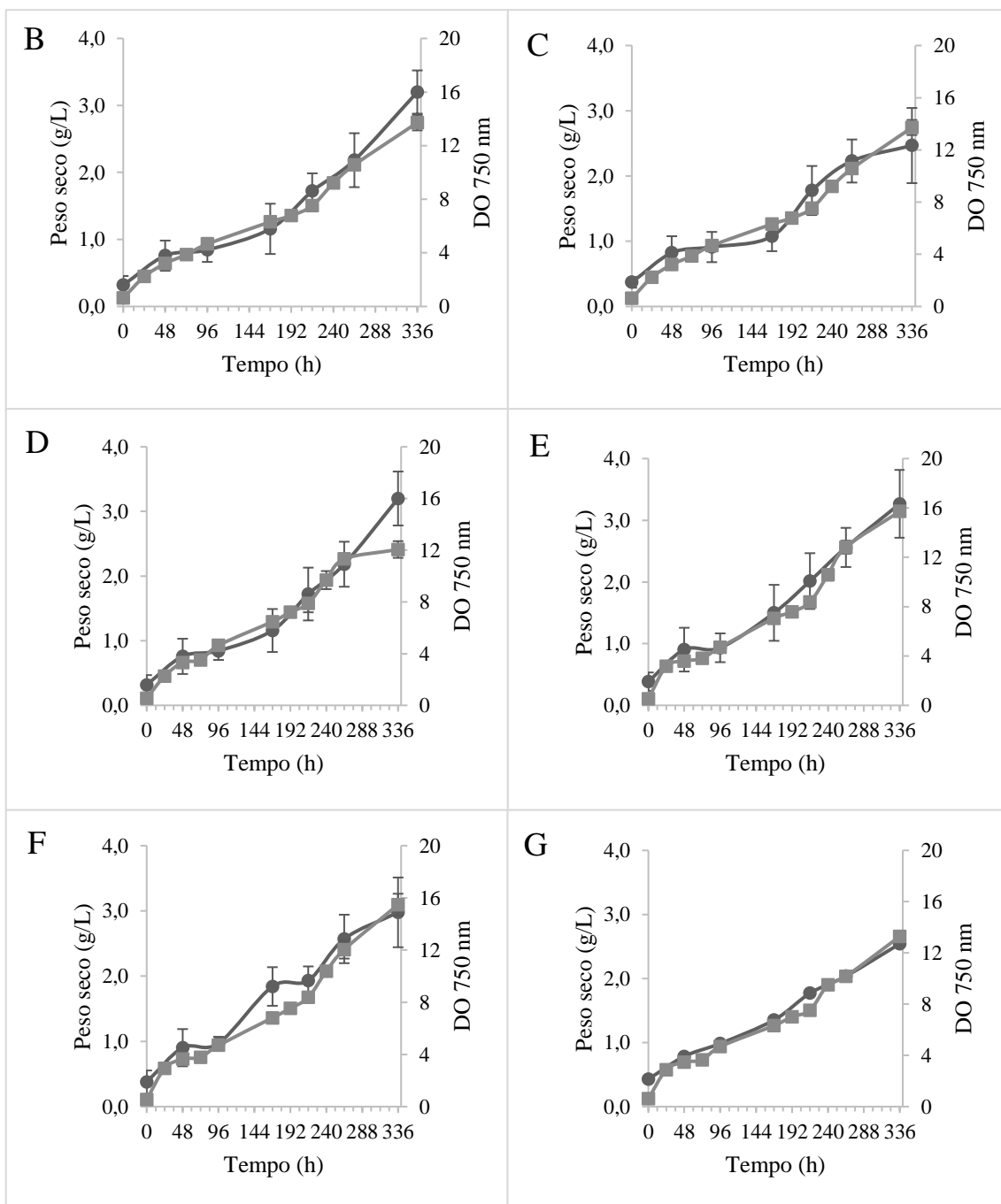


Figura 4.2.1 – Perfis de crescimento da *Chlorella sorokiniana* durante a otimização da concentração de fósforo. A microalga foi cultivada em mixotrofia em meio TAP com diferentes concentrações de fósforo, em erlenmeyers. (B) – 0,3 mM de fósforo; (C) – controlo; (D) – 1 mM de fósforo; (E) - 3 mM de fósforo; (F) – 6 mM de fósforo; (G) – 10 mM de fósforo; ● - Peso seco (g/L) ■ - Densidade ótica (750 nm). Valores médios \pm desvio-padrão

Ao analisar os perfis de crescimento é possível observar que o peso seco e a densidade ótica se comportam de maneira semelhante, isto demonstra uma boa correlação entre estes dois parâmetros. Analisando os perfis de crescimento e os parâmetros cinéticos (Tabela 4.2.1) a condição que proporciona um peso seco e uma absorvância mais elevada é a concentração de 3 mM de fósforo (E). A Tabela 4.2.1 apresenta valores relativos à taxa específica de crescimento e produtividades de biomassa. Para a condição E obteve-se uma taxa de crescimento de $0,427 \text{ d}^{-1}$, este valor é semelhante ao obtido por S. Kim et al., 2013 ($0,44 \text{ d}^{-1}$), em culturas em mixotrofia, com meio suplementados com carbono orgânico e inorgânico. Embora se tenham registado taxas mais elevadas do que a obtida para a condição E, nomeadamente na condição controlo, uma vez que a microalga já estava adaptada às condições do meio, foi para esta condição que se obteve as melhores produtividades de biomassa, obtendo uma produtividade máxima de $0,233 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$. O máximo de peso seco ($3,267 \text{ g/L}$) e de absorvância ($15,72$) foi após 336h na concentração de 3mM (E).

Tabela 4.2.1 – Parâmetros cinéticos de crescimento registados para a microalga *Chlorella sorokiniana* em mixotrofia, crescida em *erlenmeyer*, durante 336 h, para as diferentes concentrações de nutrientes com fósforo.

Condições de cultivo		B	C	D	E	F	G
$\mu \text{ (d}^{-1}\text{)}$		0,434	0,501	0,399	0,426	0,436	0,303
Biomassa	Produtividade máxima ($\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$)	0,229	0,203	0,176	0,233	0,213	0,182
	Produtividade total ($\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$)	0,206	0,182	0,150	0,206	0,186	0,151

B – 0,3 mM; C – 0,544 mM (controlo); D – 1 mM; E - 3 mM; F - 6 mM; G - 10 mM. μ - taxa específica de crescimento (d^{-1}).

4.2.1.2 Quantificação de pigmentos totais, clorofilas e carotenoides

Para avaliar a produção de pigmentos e carotenoides, utilizaram-se amostras recolhidas no início da cultura e no final do ciclo de crescimento, desta forma foi possível

quantificar os metabolitos produzidos durante o ensaio. Na Tabela 4.2.2 são apresentados os valores obtidos, através da subtração dos pigmentos iniciais aos pigmentos finais. Para as diferentes concentrações de fósforo presentes no meio, a cultura de *C. sorokiniana* que apresentou valores mais elevados de carotenoides (2,72 mg/L) foi o cultivo com 3 mM de fósforo.

Tabela 4.2.2 – Valores de pigmentos totais, clorofilas e carotenoides, em mg/L, produzidos durante o ensaio de otimização das diferentes concentrações de nutrientes com fósforo.

Condição	C _a (mg/L)	C _b (mg/L)	C _T (mg/L)	C _C (mg/L)
B	8,23	4,33	12,56	2,05
C	9,64	5,14	14,70	2,61
D	8,36	4,04	13,09	2,12
E	7,82	4,22	12,04	2,72
F	9,04	4,99	14,03	2,58
G	8,79	4,27	13,52	1,97

B – 0,3 mM; C – 0,544 mM (controle); D – 1 mM; E – 3 mM; F – 6 mM; G – 10 mM; (C_a – clorofila a; C_b – clorofila b; C_T – clorofila total; C_C – carotenoides).

À exceção da condição B (0,3 mM), todas as restantes produtividades de carotenoides (Tabela 4.2.3) foram semelhantes, sendo que o controle foi o que obteve as melhores produtividades. No entanto quando comparamos as concentrações de carotenoides obtidas neste ensaio com os resultados obtidos em outros estudos com estirpes diferentes, estes valores ficam muito aquém do esperado, sendo que em culturas de *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella vulgaris* em águas residuais com concentrações de fósforo semelhantes às utilizadas neste ensaio se obtiveram concentrações superiores a 7,4 mg/L (Guedes et al., 2011; Safafar et al., 2016). A produção de carotenoides pode ser afetada pela composição do meio, pH, temperatura, agitação e arejamento, por isso é importante otimizar todas as condições de cultivo de modo a maximizar a produtividade dos compostos desejados, para além destes fatores foi também descrito que a produção destes compostos pode ser estimulada por condições de stress associadas a um aumento na concentração de NaCl ou a uma limitação nos nutrientes (Cordero et al., 2011; Guedes et al., 2011).

Tabela 4.2.3 – Valores das produtividades máximas e totais dos carotenoides, produzidas pela microalga *C. sorokiniana*, em meio TAP com diferentes concentrações de fósforo e cultivada em condições mixotróficas, em erlenmeyer.

Condições de cultivo	B	C	D	E	F	G
Produtividade máxima (mg _{carotenoides} /g _{biomassa.d})	0,053	0,073	0,069	0,067	0,070	0,064
Produtividade total (mg _{carotenoides} /g _{biomassa.d})	0,051	0,073	0,072	0,067	0,071	0,067

B – 0,3 mM; C – 0,544 mM (controlo); D – 1 mM; E - 3 mM; F - 6 mM; G - 10 mM.

Depois de analisados os perfis de crescimento, as taxas de crescimento e produtividades obtidas para a otimização da concentração de fósforo selecionou-se a condição que apresentou um crescimento mais rápido e uniforme e em que se obtiveram as melhores produtividades em termos de biomassa, desta forma a concentração selecionada foi a de 3 mM de fósforo (E).

4.2.2 Otimização da concentração de enxofre

Tal como ocorreu para a otimização do fósforo, para este ensaio também se utilizaram 5 condições diferentes, seguindo a mesma nomenclatura utilizada anteriormente, a única variação é que no caso do enxofre a concentração controlo (C) é de 0,59 mM.

A preparação do ensaio e a inoculação dos *erlenmeyer* foi realizada de acordo com o realizado no ensaio de otimização do fósforo, assim ambos os ensaios foram preparados e executados da mesma forma.

4.2.2.1 Análise do crescimento

A otimização do enxofre decorreu durante 336 horas, e como descrito anteriormente, o crescimento foi acompanhado diariamente através da leitura da densidade ótica, e a produção de biomassa foi avaliada por peso seco de dois em dois dias. À semelhança do que aconteceu para o ensaio de otimização do fósforo, neste também se

avaliou o consumo da fonte de carbono, ácido acético, presente no meio, verificando-se esgotamento ao fim das 336 h de cultivo.

A Figura 4.2.2 representa os perfis de crescimento obtidos para cada concentração de enxofre. Apenas uma das condições demonstra uma melhoria mais acentuada no crescimento e na biomassa. Os dados dos perfis de crescimento são suportados pela taxa

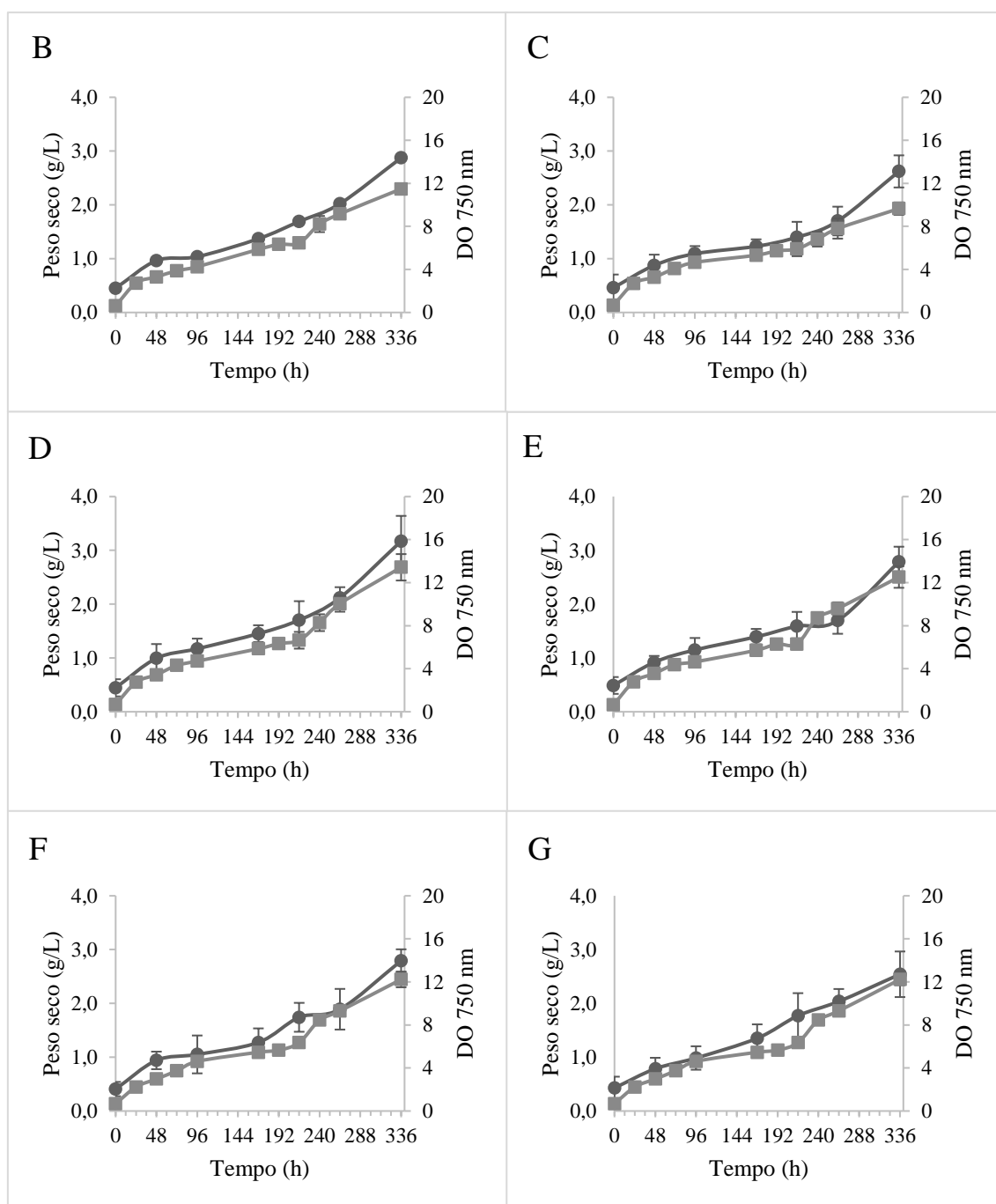


Figura 4.2.2 – Perfis de crescimento da *Chlorella sorokiniana* durante a otimização da concentração de enxofre. A estirpe foi cultivada em mixotrofia em meio TAP com diferentes concentrações de enxofre, em erlenmeyers. (B) – 0,3 mM de enxofre; (C) – controle; (D) – 1 mM de enxofre; (E) – 3 mM de enxofre; (F) – 6 mM de enxofre; (G) – 10 mM de enxofre; ● - Peso seco (g/L) ■ - Densidade ótica (750 nm). Valores médios \pm desvio-padrão

específica de crescimento e pela produtividade de biomassa, presentes na Tabela 4.2.4. Assim de acordo com os resultados obtidos, a concentração de enxofre que proporciona um melhor crescimento é a de 1 mM de enxofre, que corresponde à condição D. Para esta condição obteve-se uma produtividade máxima de 0,227 g_{biomassa}/L.d e uma taxa de crescimento específica de 0,402 d⁻¹, enquanto que para o controlo, a produtividade máxima obtida foi de 0,187 g_{biomassa}/L.d e a taxa de crescimento foi 0,322 d⁻¹.

Tabela 4.2.4 – Parâmetros cinéticos de crescimento registados durante a otimização das concentrações de enxofre para a estipe *C. sorokiniana*, crescida em condições de mixotrofia.

Condições de cultivo		B	C	D	E	F	G
μ (d ⁻¹)		0,378	0,322	0,402	0,315	0,371	0,418
Biomassa	Produtividade máxima (g _{biomassa} / L.d)	0,205	0,187	0,227	0,199	0,204	0,200
	Produtividade total (g _{biomassa} / L.d)	0,173	0,155	0,195	0,164	0,172	0,170

B – 0,3 mM; C – 0,59 mM (controlo); D – 1 mM; E - 3 mM; F - 6 mM; G - 10 mM; μ - taxa específica de crescimento (d⁻¹).

Comparando com os perfis de crescimento e as taxas específicas de crescimento obtidos na otimização do fósforo, os valores obtidos para este ensaio são menores. Embora estas produtividades sejam inferiores às registadas no ensaio anterior, encontram-se ainda dentro do intervalo de valores (0,22 a 0,38 g_{biomassa}/ L.d) obtido por Lizzul et al., 2018 em ensaio em reator.

4.2.2.2 Quantificação de pigmentos totais, clorofilas e carotenoides

Tal como ocorreu no ensaio da otimização do fósforo, neste estudo também se procedeu à recolha de uma amostra inicial e outra no final do ciclo de crescimento para a determinação dos pigmentos produzidos. A Tabela 4.2.5 mostra a concentração de clorofilas e de carotenoides produzidos para este ensaio.

Tabela 4.2.5 – Pigmentos, em mg/L, produzidos durante o ensaio de otimização das diferentes concentrações de enxofre.

Condição	C _a (mg/L)	C _b (mg/L)	C _T (mg/L)	C _C (mg/L)
B	11,93	7,04	14,54	4,12
C	9,20	5,54	14,98	3,69
D	12,32	7,12	19,45	5,16
E	10,08	6,85	14,52	4,63
F	11,58	6,98	18,44	4,47
G	9,26	5,70	15,49	3,82

B – 0,3 mM; C – 0,59 mM (controlo); D – 1 mM; E - 3 mM; F - 6 mM; G - 10 mM; (C_a – clorofila a; C_b – clorofila b; C_T – clorofila total; C_C – carotenoides).

Observou-se o aumento destes metabolitos para a concentração de 1 mM de enxofre, sendo a condição que apresentou melhores resultados, com um máximo de 19,45 mg/L de clorofila total e 5,16 mg/L de carotenoides. Embora estes valores sejam superiores aos registados no ensaio do fósforo, ainda são inferiores aos descritos na literatura para outras espécies do género *Chlorella* e para outros géneros de microalga em mixotrofia (Guedes et al., 2011; Safafar et al., 2016).

Tabela 4.2.6 – Valores das produtividades máximas e totais dos carotenoides, produzidas pela microalga *C. sorokiniana*, em meio TAP com diferentes concentrações de enxofre e cultivada em condições mixotróficas, em erlenmeyer.

Condições de cultivo	B	C	D	E	F	G
Produtividade Máxima (mg _{carotenoides} /g _{biomassa} .d)	0,107	0,105	0,120	0,123	0,117	0,102
Produtividade Total (mg _{carotenoides} /g _{biomassa} .d)	0,121	0,122	0,135	0,144	0,133	0,114

B – 0,3 mM; C – 0,59 mM (controlo); D – 1 mM; E - 3 mM; F - 6 mM; G - 10 mM.

Após o cálculo das produtividades pôde confirmar-se que existiu um aumento na produção de carotenoides. Quando comparado com os valores obtidos no ensaio do fósforo, é possível notar que as produtividades quase que duplicaram, mostrando que o enxofre tem uma influência positiva na produção de clorofila e de carotenoides.

Tendo em conta os resultados obtidos, escolheu-se a condição D – 1 mM de enxofre – como a concentração que apresenta uma melhor influencia no crescimento e na produção de pigmentos pela *Chlorella sorokiniana*.

4.2.3 Meio TAP otimizado

Depois de analisados os resultados obtidos para a otimização do fósforo e do enxofre selecionou-se as condições que revelaram ter uma maior influencia na produtividade da microalga *Chlorella sorokiniana*. Para o fósforo selecionou-se a concentração de 3 mM e para o enxofre 1 mM.

Neste ensaio testou-se apenas uma condição, que era composta pelas concentrações selecionadas nos ensaios de otimização, e utilizou-se o meio TAP não modificado como controlo. A preparação deste ensaio foi realizada de forma semelhante aos restantes ensaios descritos.

4.2.3.1 Análise do crescimento

Este ensaio teve uma duração mais curta, as recolhas de amostras foram realizadas até 216 horas após o início do ensaio, que é equivalente a 9 dias. Tal como ocorreu nos ensaios anteriores, analisou-se diariamente a densidade ótica e o peso seco a cada 48 horas, registou-se também a concentração de ácido acético, fonte de carbono, no início, a meio e no fim do ensaio.

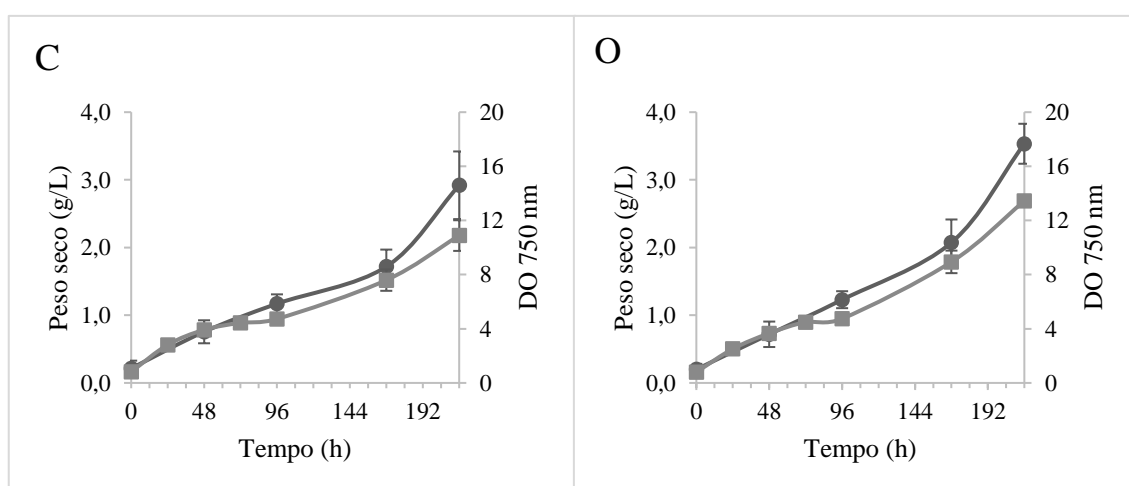


Figura 4.2.3 – Perfis de crescimento da *Chlorella sorokiniana* durante o ensaio final da otimização. A estipe foi cultivada em mixotrofia em meio TAP com as concentrações de fósforo e enxofre otimizadas, em erlenmeyers. (C) – controlo; (O) – 3mM de fósforo + 1 mM de enxofre; ● - Peso seco (g/L) ■ - Densidade ótica (750 nm). Valores médios \pm desvio-padrão

Os perfis de crescimento para este ensaio estão representados na Figura 4.2.3. Analisando os gráficos é possível confirmar que de facto existe uma melhoria no crescimento da microalga. Durante os primeiros dias de cultivo a densidade ótica era muito semelhante, mas a partir das 96 horas a cultura com o meio otimizado começou a apresentar um crescimento mais rápido. A média da densidade ótica obtida para o final deste ensaio foi 13,44, este é o valor mais elevado registado para t=216, nos três ensaios realizados de otimização nutricional. O máximo de peso seco registado durante a otimização do meio TAP (3,53 g/L) foi registado para o meio otimizado, após 216 horas de cultivo. Também neste caso, se verificou que a fonte de carbono presente no meio foi completamente consumida ao fim das 216 h de cultivo.

As taxas de crescimento (Tabela 4.2.7) da microalga crescida em meio TAP otimizado foi superior ao valor obtido no controlo assim como aos estudos descritos por S. Kim et al., 2013. Os valores das produtividades foram igualmente elevados para ambas as condições, obtendo-se para o meio TAP otimizado uma produtividade máxima de 0,393 g_{biomassa}/L.d e uma produtividade total de 0,370 g_{biomassa}/L.d.

Tabela 4.2.7 – Parâmetros cinéticos de crescimento determinados para o ensaio final de otimização do meio TAP com a *Chlorella sorokiniana* em mixotrofia.

Condições de cultivo		C	O
μ (d ⁻¹)		0,629	0,639
Biomassa	Produtividade Máxima (g _{biomassa} / L.d)	0,324	0,393
	Produtividade Total (g _{biomassa} / L.d)	0,301	0,370

C – Controlo; O – 3mM de fósforo + 1 mM de enxofre; μ - taxa específica de crescimento (d⁻¹).

Através da comparação dos perfis de crescimento e dos parâmetros cinéticos obtidos para as duas condições de cultura é possível afirmar que se verificou melhorias no crescimento da microalga e que esta quando cultivada em meio otimizado apresenta um crescimento mais rápido e produtivo.

4.2.3.2 Quantificação de pigmentos totais, clorofilas e carotenoides

Para a quantificação da clorofila e dos carotenoides foram utilizadas amostras do tempo 0 e do tempo 216. Os valores de clorofila total e de carotenoides são apresentados na Tabela 4.2.8, sendo os resultados obtidos para os pigmentos no meio TAP otimizado semelhantes aos obtidos para o controlo, meio TAP normal. Os valores obtidos são inferiores aos da otimização da concentração de enxofre, mas são ligeiramente superiores aos da otimização da concentração de fósforo, este é ainda um valor inferior ao registado por Safafar et al., 2016 no cultivo de espécies do *Chlorella* em mixotrofia com águas residuais.

Tabela 4.2.8 – Valores das clorofilas e carotenoides, produzidos pela microalga *C. sorokiniana* em meio TAP (controlo) e em meio TAP otimizado.

Condição	C _a (mg/L)	C _b (mg/L)	C _T (mg/L)	C _C (mg/L)
C	9,21	5,33	14,54	2,94
O	9,80	5,94	14,92	3,57

C – Controlo; O – 3mM de fósforo + 1 mM de enxofre; (C_a – clorofila a; C_b – clorofila b; C_T – clorofila total; C_C – carotenoides);

As produtividades (Tabela 4.2.9) obtidas foram iguais para o controlo e para a otimização, este resultado não vai de encontro ao que se esperava, uma vez que no ensaio da otimização do enxofre a concentração selecionada (1 mM) proporcionava uma melhoria na produção dos pigmentos em estudo. Este resultado pode estar associado ao facto de a concentração escolhida na otimização do fósforo não provocar um aumento da produção de pigmentos ou a outros fatores abióticos.

Tabela 4.2.9 – Parâmetros cinéticos da produção de pigmentos registados para o meio otimizado e para o controlo.

Condições de cultivo	C	O
Produtividade Máxima (mg _{carotenoides} /g _{biomassa} .d)	0,119	0,119
Produtividade Total (mg _{carotenoides} /g _{biomassa} .d)	0,121	0,119

C – Controlo; O – 3mM de fósforo + 1 mM de enxofre.

A partir dos resultados obtidos neste ensaio com meio otimizado podemos observar que o meio otimizado se mostrou eficaz no aumento da produção de biomassa e da taxa específica de crescimento, mas que não foi eficaz no aumento da produção dos pigmentos. Embora a produção de pigmentos não tenha aumentado, este não é essencialmente um ponto negativo, pois não ocorreu inibição da sua produção, apenas se manteve a produtividade registada no controlo.

5 CONCLUSÃO

Existe um foco cada vez maior na Biotecnologia Azul e nos seus produtos, sobretudo os provenientes da produção de microalgas. Esta é uma área cada vez mais em ascensão e que procura ser sustentável, para tal é necessário aumentar a produtividade utilizando recursos com custos mais baixos.

Neste trabalho procurou-se otimizar a composição nutricional de dois meios de crescimento de duas espécies de microalgas diferentes, modificando as concentrações de macronutrientes essenciais para o crescimento. Para a estirpe *Tetraselmis* sp. CTP4 procurou-se otimizar a concentração de carbono orgânico adicionado ao meio ALGAL, para tal testaram-se três concentrações de glucose. Para a otimização do meio TAP utilizou-se a *Chlorella sorokiniana* em que se testaram-se diferentes concentrações de fósforo e de enxofre.

Na primeira parte do trabalho experimental suplementou-se o meio ALGAL com 5, 10 e 15 g/L de glucose e 2,5 g/L de extrato de levedura. As culturas de CTP4 foram produzidas em condições de hetero e mixotrofia. Em condições de mixotrofia, a biomassa máxima produzida foi de 7,02 g/L, em meio suplementado com 10 g/L de glucose. No cultivo em heterotrofia da microalga CTP4, a cultura que apresentou uma taxa específica de crescimento mais elevada foi cultivada com uma concentração de 15 g/L de glucose ($0,404 \text{ d}^{-1}$). No entanto, a produtividade máxima de biomassa foi obtida para a concentração de 10 g/L, com o valor de $0,427 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$, enquanto que para a concentração de 15 g/L, o valor de produtividade máxima foi de $0,273 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$.

A segunda parte do trabalho consistiu na otimização do meio TAP com a microalga *Chlorella sorokiniana*, crescida em condições mixotróficas. Numa primeira fase testaram-se as várias concentrações de fósforo e selecionou-se a que apresentou melhores resultados. Após a análise das taxas específicas de crescimento e das produtividades de biomassa e de carotenoides obtidas para as várias condições selecionou-se a concentração de 3 mM de fósforo como a que melhor influenciava o crescimento da microalga. Para esta condição a taxa específica de crescimento foi $0,425 \text{ d}^{-1}$, a produtividade máxima foi $0,233 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$ para biomassa e $0,067 \text{ mg}_{\text{carotenoides}}/\text{g}_{\text{biomassa}}.\text{d}$ para carotenoides. Numa segunda fase, procedeu-se à otimização da concentração de enxofre, selecionando-se a concentração de 1mM com base nos

resultados obtidos, como sendo a que proporcionava um melhor crescimento da cultura. Para esta condição a taxa específica de crescimento foi $0,402 \text{ d}^{-1}$, a produtividade máxima em biomassa foi de $0,227 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$ e em carotenoides $0,120 \text{ mg}_{\text{carotenoides}}/\text{g}_{\text{biomassa}}.\text{d}$. Por fim, com base nos resultados obtidos da otimização da concentração de fósforo e de enxofre, procedeu-se ao cultivo da microalga *C. sorokiniana* no meio TAP otimizado. Registrou-se um aumento da taxa específica de crescimento, $0,639 \text{ d}^{-1}$, e da produtividade máxima de biomassa, $0,393 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{L.d}$, quando comparada com a microalga crescida em meio TAP não modificado.

Através dos resultados obtidos nos ensaios com a *Tetraselmis* sp. CTP4 podemos concluir que quando cultivada em meio ALGAL em mixotrofia apresenta resultados promissores. Os resultados obtidos sugerem que esta estirpe consegue ativar o sistema mixotrófico, aliando o consumo de uma fonte de carbono e o efeito da luz na fixação do CO_2 . Contudo é ainda necessário aprofundar e otimizar as condições de cultivo na presença de fontes de carbono orgânicas.

A composição nutricional dos meios de cultivo são um aspeto muito importante no cultivo em larga escala de microalgas. A otimização do meio TAP, em termos da composição em enxofre e fósforo, mostrou-se promissora no cultivo da *Chlorella sorokiniana*, observando-se o aumento da produtividade em biomassa. Contudo, será necessário proceder a mais estudos no sentido de se otimizar o modo de cultivo e as condições operacionais, em termos de arejamento e mesmo de luz, proporcionando melhores trocas gasosas e favorecendo as questões de mistura da cultura.

Embora ambos os ensaios de otimização dos meios de crescimento tenham obtido resultados animadores, é ainda necessário testar concentrações mais elevadas de glucose e outras fontes de carbono para suplementar o meio ALGAL, para o meio TAP é essencial otimizar as concentrações dos restantes constituintes do meio, como por exemplo do cobre (Cu), ferro (Fe) e zinco (Zn), de modo a elevar ao máximo a produtividade desta microalga de elevada importância para o futuro.

6 BIBLIOGRAFIA

- Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J., & Dragone, G. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*, *118*, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.055>
- Arnon, D. I. (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiology*, *24*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Arora, M. (2016). Tetraselmis : an Introduction. *The Botanica (New Delhi, India)*, *66*(December), 155–175. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/318205794_Tetraselmis_an_Introduction
- Atlas, R. M. (2005). *Handbook of Media for Environmental Microbiology. Microbiology*. <https://doi.org/10.1201/9781420037487>
- Azma, M., Mohamed, M. S., Mohamad, R., Rahim, R. A., & Ariff, A. B. (2011). Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, *53*(2), 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.10.010>
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Cecchin, M., Benfatto, S., Griggio, F., Mori, A., Cazzaniga, S., Vitulo, N., ... Ballottari, M. (2018). Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. *Scientific Reports*, *8*(1), 6465. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24979-8>
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2011). Cultivation,

- photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
- Chen, H.-H., & Jiang, J.-G. (2017). Lipid Accumulation Mechanisms in Auto- and Heterotrophic Microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(37), 8099–8110. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03495>
- Chu, F.-F., Chu, P.-N., Cai, P.-J., Li, W.-W., Lam, P. K. S., & Zeng, R. J. (2013). Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. *Bioresource Technology*, 134, 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.131>
- Cordero, B. F., Obraztsova, I., Couso, I., Leon, R., Vargas, M. A., & Rodriguez, H. (2011). Enhancement of Lutein Production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by Improvement of Culture Conditions and Random Mutagenesis. *Marine Drugs*, 9(9), 1607–1624. <https://doi.org/10.3390/md9091607>
- Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A., & Parra-Saldivar, R. (2015). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 190–209. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12167>
- Daliry, S., Hallajisani, A., Roshandeh, J. M., Nouri, H., & Golzary, A. (2017). Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. *Global J. Environ. Sci. Manage*, 3(2), 217–230. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2017.03.02.010>
- Day, J. G., & Tsavalos, A. J. (1996). An Investigation of the Heterotrophic Culture of the Green Alga *Tetraselmis*. *Journal of Applied Phycology*, 8, 73–77. <https://doi.org/10.1007/BF02186225>
- Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A., & Teixeira, J. (2010). Third generation biofuels from microalgae. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, (June 2014), 1355–1366. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.03.012>

- Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental (EMEPC). (2014). Recursos Marinhos. Retrieved March 2, 2017, from <http://www.emepc.pt/pt/recursos-marinhos>
- Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B., & Veiga, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42, 207–215. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90101-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90101-7)
- Golub, N. B., & Voyevoda, D. V. (2013). Effect of sulphur compounds on cultivation process of microalgae *Chlorella vulgaris*. Retrieved from <http://ena.lp.edu.ua/handle/ntb/21838>
- Gorman, D. S., & Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(6), 1665–1669. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.6.1665>
- Griffiths, M. J., Dicks, R. G., Richardson, C., & L. Harrison, S. T. (2011). Advantages and Challenges of Microalgae as a Source of Oil for Biodiesel. In *Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies*. InTech. <https://doi.org/10.5772/30085>
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Malcata, F. X., Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Malcata, F. X. (2011). Microalgae as Sources of Carotenoids. *Marine Drugs*, 9(4), 625–644. <https://doi.org/10.3390/md9040625>
- Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229–239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Guiry, M.D. & Guiry, G. M. (2017). *Tetraselmis* F.Stein, 1878 :: Algaebase. Retrieved December 28, 2017, from http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=K06aaadf731ffe925
- Guiry, M.D. & Guiry, G. M. (2018). *Chlorella* Beyerinck [Beijerinck], 1890, nom. cons. :: Algaebase. Retrieved August 17, 2018, from http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=n36ebee049555c7c&sk

=0

- Hase, E., Morimura, Y., Mihara, S., & Tamiya, H. (1958). The role of sulfur in the cell division of chlorella. *Archiv Für Mikrobiologie*, *31*(1), 87–95. <https://doi.org/10.1007/BF00409966>
- Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A., & Castro-Puyana, M. (2012). Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In M. Hayes (Ed.), *Marine Bioactive Compounds* (Vol. 9781461412, pp. 55–98). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1247-2_2
- Jha, R. K., & Zi-rong, X. (2004). Biomedical Compounds from Marine Organisms. *Marine Drugs*, *2*(1), 123–146. <https://doi.org/10.3390/md90x000x>
- Juntilla, D. J., Bautista, M. A., & Monotilla, W. (2015). Biomass and lipid production of a local isolate *Chlorella sorokiniana* under mixotrophic growth conditions. *Bioresource Technology*, *191*, 395–398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.098>
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, *17*(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kim, S.-K. (2015a). *Handbook of Marine Microalgae. Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-19117-9>
- Kim, S.-K. (2015b). *Hb25_Springer Handbook of Marine Biotechnology*. (S.-K. Kim, Ed.), *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-53971-8>
- Kim, S.-K., & Pangestuti, R. (2011). Potential Role of Marine Algae on Female Health, Beauty, and Longevity. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 64, pp. 41–55). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387669-0.00004-1>
- Kim, S., Park, J. eun, Cho, Y. B., & Hwang, S. J. (2013). Growth rate, organic carbon

- and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, *144*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.068>
- Kim, W., Park, J. M., Gim, G. H., Jeong, S.-H., Kang, C. M., Kim, D.-J., & Kim, S. W. (2012). Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *35*(1–2), 19–27. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0612-1>
- Kiuru, P., D’Auria, M., Muller, C., Tammela, P., Vuorela, H., & Yli-Kauhaluoma, J. (2014). Exploring Marine Resources for Bioactive Compounds. *Planta Medica*, *80*(14), 1234–1246. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1383001>
- Kumar, K., & Das, D. (2012). Growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* in airlift and bubble column photobioreactors. *Bioresource Technology*, *116*, 307–313. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.03.074>
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., & Chen, S. (2013). High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Bioresource Technology*, *131*, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.121>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, *148*, 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lizzul, A., Lekuona-Amundarain, A., Purton, S., Campos, L., Lizzul, A. M., Lekuona-Amundarain, A., ... Campos, L. C. (2018). Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. *Biology*, *7*(2), 25. <https://doi.org/10.3390/biology7020025>
- Lu, L., Wang, J., Yang, G., Zhu, B., & Pan, K. (2017a). Heterotrophic growth and nutrient productivities of *Tetraselmis chuii* using glucose as a carbon source under different C/N ratios. *Journal of Applied Phycology*, *29*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0919-z>
- Lu, L., Wang, J., Yang, G., Zhu, B., & Pan, K. (2017b). Heterotrophic growth and nutrient productivities of *Tetraselmis chuii* using glucose as a carbon source under different C/N ratios. *Journal of Applied Phycology*, *29*(1), 15–21.

<https://doi.org/10.1007/s10811-016-0919-z>

- Masojídek, J., & Torzillo, G. (2014). Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09373-8>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(1), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Mondal, M., Ghosh, A., Tiwari, O. N. N., Gayen, K., Das, P., Mandal, M. K. K., & Halder, G. (2017). Influence of carbon sources and light intensity on biomass and lipid production of *Chlorella sorokiniana* BTA 9031 isolated from coalfield under various nutritional modes. *Energy Conversion and Management*, *145*, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.05.001>
- Moon, M., Kim, C. W., Park, W. K., Yoo, G., Choi, Y. E., & Yang, J. W. (2013). Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*, *2*(4), 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.003>
- Morales-Sánchez, D., Martínez-Rodríguez, O. A., & Martínez, A. (2017). Heterotrophic cultivation of microalgae: production of metabolites of commercial interest. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *92*(5), 925–936. <https://doi.org/10.1002/jctb.5115>
- Pereira, H., Gangadhar, K. N., Schulze, P. S. C., Santos, T., De Sousa, C. B., Schueler, L. M., ... Barreira, L. (2016a). Isolation of a euryhaline microalgal strain, *Tetraselmis* sp. CTP4, as a robust feedstock for biodiesel production. *Scientific Reports*, *6*(June), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep35663>
- Pereira, H., Gangadhar, K. N., Schulze, P. S. C., Santos, T., De Sousa, C. B., Schueler, L. M., ... Barreira, L. (2016b). Isolation of a euryhaline microalgal strain, *Tetraselmis* sp. CTP4, as a robust feedstock for biodiesel production. *Scientific Reports*, *6*(June), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep35663>
- Pereira, H., Páramo, J., Silva, J., Marques, A., Barros, A., Maurício, D., ... Varela, J.

- (2018). Scale-up and large-scale production of *Tetraselmis* sp. CTP4 (Chlorophyta) for CO₂ mitigation: From an agar plate to 100-m³ industrial photobioreactors. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23340-3>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Richmond, A. (2004). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phyecology/edited by Amos Richmond. *Orton.Catie.Ac.Cr*, 472. <https://doi.org/10.1002/9780470995280>
- Safar, H., Uldall Nørregaard, P., Ljubic, A., Møller, P., Løvstad Holdt, S., Jacobsen, C., ... Jacobsen, C. (2016). Enhancement of Protein and Pigment Content in Two *Chlorella* Species Cultivated on Industrial Process Water. *Journal of Marine Science and Engineering*, 4(4), 84. <https://doi.org/10.3390/jmse4040084>
- Salbitani, G., & Carfagna, S. (2017). Extraction and Activity of O-acetylserine(thiol)lyase (OASTL) from Microalga *Chlorella sorokiniana*. *BIO-PROTOCOL*, 7(12). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2342>
- Salbitani, G., Vona, V., Bottone, C., Petriccione, M., & Carfagna, S. (2015). Sulfur Deprivation Results in Oxidative Perturbation in *Chlorella sorokiniana* (211/8k). *Plant and Cell Physiology*, 56(5), 897–905. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv015>
- Schulze, P. S. C., Carvalho, C. F. M., Pereira, H., Gangadhar, K. N., Schüler, L. M., Santos, T. F., ... Barreira, L. (2017). Urban wastewater treatment by *Tetraselmis* sp. CTP4 (Chlorophyta). *Bioresource Technology*, 223, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.027>
- Sueoka, N., Chiang, K., & Kates, J. (1967). Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardi*. *Journal of Molecular Biology*, 25(1), 47–66. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90278-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90278-1)
- Varela, J., Pereira, H., Santos, E., Monteiro, I., Tocha, C., Custódio, L., & Barreira, L. (2014). Boletim de Biotecnologia. In *Boletim de Biotecnologia* (Vol. 2, pp. 8–11).

- Walne, P. R. (1970). Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish. Invest*, *26*, 1–62.
- Wang, H., Fu, R., & Pei, G. (2012). A study on lipid production of the mixotrophic microalgae *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(5), 1041–1047. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.1365>
- Zheng, H., Ma, X., Gao, Z., Wan, Y., Min, M., Zhou, W., ... Ruan, R. (2015). Lipid Production of Heterotrophic *Chlorella* sp. from Hydrolysate Mixtures of Lipid-Extracted Microalgal Biomass Residues and Molasses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *177*(3), 662–674. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1770-4>
- Zheng, Y., Li, T., Yu, X., Bates, P. D., Dong, T., & Chen, S. (2013). High-density fed-batch culture of a thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Applied Energy*, *108*, 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.02.059>