

Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral

Non-photoautotrophic cultivation of microalgae: an overview

Elisângela Andrade Angelo¹; Diva Souza Andrade²; Arnaldo Colozzi Filho³

Resumo

As microalgas são um grupo heterogêneo de microrganismos, dos quais podem ser extraídos diversos produtos tais como: proteínas, carboidratos, pigmentos e óleos com perfil contendo ácidos graxos saturados, poli-insaturados e mono-insaturados. Esses microrganismos apresentam diferentes formas de metabolismo energético, destacando-se o fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico. A compreensão destas formas de metabolismo permite aplicar às microalgas estratégias de cultivos visando o aumento da produção de biomassa algal, e seus coprodutos em grandes escalas. Tradicionalmente, o cultivo de microalgas explora seu metabolismo fotoautotrófico. No entanto, estudos têm apontado vantagens da produção de biomassa destes microrganismos por outras vias metabólicas. Desta maneira, essa revisão tem por objetivo apresentar uma visão geral das formas de metabolismo não-fotoautotrófico das microalgas e considerações sobre a produção de biomassa desses microrganismos nesses diferentes sistemas de cultivo. No metabolismo heterotrófico, as fontes de carbono que mais têm se destacado para as microalgas são: glicose, glicerol e ácido acético. Além disso, diversos estudos apresentam fontes alternativas de meio de cultivo, como os resíduos agroindustriais e sanitários. O metabolismo mixotrófico pode ser definido como aquele em que ocorre simultaneamente a fotossíntese e a oxidação de compostos orgânicos externos. No metabolismo fotoheterotrófico, a luz é a fonte de energia e o composto orgânico é a fonte de carbono. Os sistemas de cultivo não-fotoautotróficos de microalgas são de alto potencial, principalmente devido ao aumento de escala e produtividade. No entanto, deve-se ressaltar que informações sobre esses sistemas de cultivo de microalgas em grande escala para uma produção competitiva ainda são escassas.

Palavras-Chaves: Metabolismo fotoautotrófico. Fotoheterotrófico. Heterotrófico. Mixotrófico.

Abstract

Microalgae are a heterogeneous group of microorganisms that produces biomass from which can be extracted various products such as proteins, carbohydrates, pigments and oils with profile containing saturated fatty acids, polyunsaturated and monounsaturated. These microorganisms have different forms of energetic metabolism, especially the photoautotrophic, heterotrophic, mixotrophic and photoautotrophic. Understanding these metabolic forms allows to apply microalgae strategies of cultivation aiming to increase algal biomass production, and its co-products in large scales. Traditionally, the microalgae cultivation is done by exploiting their photoautotrophic metabolism. However, studies have point out some advantages in the production of biomass of these microorganisms by using other metabolic pathways. Thus, this review aims to present an overview of the forms of non-photoautotrophic microalgae metabolism and considerations on the different systems of biomass production of these microorganisms. In the heterotrophic metabolism, sources of carbon that have stood out the most for microalgae are: glucose, glycerol and acetic acid. Nevertheless, there are several studies that present alternative sources of culture medium, such as agro-industrial and sanitary waste. The mixotrophic can

¹ Mestrado em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina. Bióloga na Companhia Paranaense de Energia (COPEL). E-mail: elisangela.angelo@copel.com

² Doutora em Ciências Biológicas - London University Wye College. Pesquisadora do Instituto Agrônomo do Paraná. Professora no mestrado em Agricultura Conservacionista do IAPAR. E-mail: diva@iapar.br

³ Doutor em Agronomia pela Universidade de São Paulo. Pesquisador do Instituto Agrônomo do Paraná. E-mail: acolozzi@iapar.br

be defined as the metabolism when photosynthesis and oxidation of external organic carbon take place at the same time. In the photoheterotrophic metabolism the light is the energy source and the organic compound is a carbon source. The non-photoautotrophic cultivation systems are high potential, mainly for increasing production with better productivity and scaling up. However, it should be noted that information about these microalgae cultivation systems on a large scale for a competitive production is scarce.

Key words: Metabolism photoautotrophic. Photoheterotrophic. Heterotrophic. Mixotrophic.

Introdução

As microalgas são fonte de uma ampla variedade de importantes compostos, tais como: lipídios poli-insaturados, pigmentos, polissacarídeos, óleos, hidrocarbonetos, carboidratos e proteínas que podem compor produtos de natureza variável como o biodiesel ou até mesmo compostos para ração animal. Portanto, o conhecimento do metabolismo destes microrganismos é um ponto crucial para otimizar a produção destes compostos em grande escala.

Os estudos dos cultivos de microalgas em grande escala têm dado ênfase ao metabolismo fotoautotrófico. No entanto, estes microrganismos apresentam grande versatilidade metabólica, a qual reflete as diversas condições dos habitat onde podem ser encontrados. Em muitas ocasiões, os habitat naturais das microalgas apresentam condições inadequadas para fotossíntese, principalmente em relação à luminosidade. Dessa maneira, durante a evolução das microalgas, diferentes formas de metabolismo foram selecionadas a fim de sustentar a sua manutenção e até mesmo o seu crescimento (BRUTEMARK; GRANÉLI, 2011; JEONG et al., 2010).

De acordo com os estudos taxonômicos e bioquímicos, as microalgas podem apresentar as seguintes formas de metabolismo: (1) fotoautotrófico: quando a energia é obtida de fonte luminosa e o carbono de fonte inorgânica, pela fotossíntese; (2) heterotrófico: quando a energia e o carbono são obtidos de fonte orgânica externa, em geral pela oxidação de açúcares; (3) mixotrófico: quando a fotossíntese e a oxidação de compostos orgânicos

ocorrem concomitantemente e (4) fotoheterotrófico: quando a fonte de energia é a luz, e a fonte de carbono são compostos orgânicos (BUMBAK et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Esta diversidade metabólica das microalgas deve ser considerada durante o desenvolvimento de sistemas de cultivo. Por isto, além dos cultivos fotoautotróficos, nos últimos anos tem despontado estudos que destacam sistemas de cultivo heterotrófico e mixotrófico para produção destes microrganismos. A escolha de qual o melhor sistema para produção dependerá do objetivo do cultivo, bem como das características da microalga. Cada sistema apresenta vantagens, desvantagens e desafios tecnológicos próprios. Desta maneira, essa revisão tem por objetivo apresentar uma visão geral sobre as formas de metabolismos e cultivos não-fotoautotróficos das microalgas, a fim de contribuir para tomada de decisões sobre qual o sistema adequado a ser adotado para a produção destes microrganismos. O foco principal dessa revisão é o cultivo heterotrófico bem como comentários pontuais sobre os metabolismos mixotrófico e fotoheterotrófico, especialmente de microalgas do grupo das clorófitas.

Para a elaboração deste trabalho foi feito um levantamento de artigos no site de busca: *Science Direct* (<www.sciencedirect.com/>) e de patentes no site *Google Patent Search* (<www.google.com/patents>). Com base nestes levantamentos, foi feita a revisão dos pontos mais relevantes sobre o cultivo não-fotoautotrófico de microalgas, bem como uma listagem geral das principais vantagens e desvantagens de cada um deles (Tabela 1). Os tópicos a seguir apresentam discussões sobre estas vantagens e desvantagens.

Tabela 1 - Principais vantagens e desvantagens dos cultivos heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico de microalgas.

Heterotrófico	
Vantagens	Desvantagens
<p>Maior facilidade de aumento de escala.</p> <p>Possibilidade de se utilizar sistemas desenvolvidos para o cultivo heterotrófico de outros microrganismos.</p> <p>Possibilidade do cultivo em grandes densidades.</p> <p>Maior facilidade do controle dos parâmetros e menor interferência dos fatores climáticos no processo de produção.</p> <p>Alta produtividade e melhor taxa de crescimento.</p> <p>Necessidade de menor área para implantação.</p> <p>Facilidade operacional do sistema.</p>	<p>Custo com fonte de carbono orgânica externa.</p> <p>Não fixa dióxido de carbono e, portanto, não pode ser utilizada para mitigar a emissão deste gás.</p> <p>Aumento dos custos com esterilização.</p> <p>Menor número de cepas de microalgas que podem ser utilizadas em cultivos heterotróficos em grande escala.</p> <p>Grande demanda por gás oxigênio no sistema.</p> <p>Altas concentrações das fontes de carbono podem inibir o crescimento da microalga.</p> <p>Alguns produtos microalgais são apenas significativamente produzidos na presença de luz.</p>
Mixotrófico	
Vantagens	Desvantagens
<p>Não ocorre foto inibição.</p> <p>Diminuição da fotoxidação.</p> <p>Alta taxa metabólica.</p> <p>Fixação de gás carbônico.</p> <p>Necessitam de menor intensidade luminosa do que o fotoautotrófico.</p> <p>Podem ser utilizados para produzir compostos, cujo metabolismo depende da luz.</p> <p>Maior facilidade de crescimento em meio a base de resíduos da agricultura e da indústria.</p> <p>Menor demanda por gás oxigênio do que o sistema heterotrófico.</p>	<p>Dificuldade operacional.</p> <p>Inibição pela fonte de carbono.</p> <p>Custos com fonte orgânica de carbono.</p> <p>Maior dificuldade de aumento de escala.</p>
Fotoheterotrófico	
Vantagens	Desvantagens
<p>Algumas cepas promissoras só podem ser produzidas neste sistema de cultivo.</p> <p>Praticamente não há produção de gás carbônico, como no heterotrófico.</p>	<p>Necessidade de luz e fonte de carbono orgânico simultaneamente.</p> <p>Tanto a luz quanto a fonte de carbono são fatores limitantes.</p> <p>Maior dificuldade de aumento de escala.</p>

Fonte: Elaborado pelos autores.

Metabolismo Heterotrófico

A principal característica do metabolismo heterotrófico é a necessidade de uma fonte orgânica externa para obtenção de energia e carbono. Microalgas em cultivo heterotrófico não realizam fotossíntese, e por isto não necessitam de luz. Segundo (BUMBAK et al., 2011), o metabolismo heterotrófico das microalgas é semelhante ao de outros microrganismos, como as leveduras utilizadas na produção da cerveja e de etanol.

Ressalta-se que até mesmo as microalgas fotoautotróficas são capazes de oxidar compostos orgânicos para obter energia. O que difere estas microalgas das heterotróficas é a origem destes compostos orgânicos; nas fotoautotróficas o carbono orgânico tem origem do processo interno de fotossíntese, enquanto que nas heterotróficas, o carbono orgânico é captado do meio externo (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

As espécies de microalgas fotoautotróficas estritas são incapazes de transportar as fontes de carbono orgânico externas para o interior da célula (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). A manipulação genética pode ser uma alternativa viável para as cepas de microalgas que possuem esse metabolismo fotoautotrófico estrito e também apresentam características promissoras quanto a produção de determinado composto de valor.

Em ambientes onde existe a combinação de pouca luz e presença de determinados compostos orgânicos, algumas microalgas fotoautotróficas são capazes de assimilar estes compostos para sobreviver. No entanto, tais microalgas não são capazes de sustentar o metabolismo heterotrófico por tempo suficiente para duplicar-se. Desta maneira, para que uma microalga seja considerada heterotrófica, ela deve ser capaz de sustentar este tipo de metabolismo também para crescer e duplicar-se (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Segundo Azma et al. (2011), a capacidade de crescer heterotroficamente está presente em vários gêneros de microalgas e tem relação principal com as seguintes características: (1) permeabilidade celular à fonte de carbono orgânica, (2) transporte ativo da fonte de carbono orgânico e (3) fatores enzimáticos presentes no interior da célula. Nota-se que a maior parte das características determinantes para o metabolismo heterotrófico refere-se à entrada da fonte de carbono orgânico na célula.

As principais fontes de carbono e energia para o crescimento heterotrófico das microalgas são carboidratos e ácidos orgânicos (LIANG; SARKANY; CUI, 2009), destacando-se a glicose, o acetato (ácido acético) e o glicerol, bem como o amido de mandioca (WEI et al., 2009). No entanto, em estudo utilizando método rápido, o teste de placas (Biolog-ECO), com 31

substratos de compostos orgânicos para avaliar as propriedades metabólicas de cinco cepas isoladas de águas residuárias, foi observado que cepas de *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. apresentaram diferentes padrões metabólicos de acordo com as categorias dos substratos orgânicos (TIAN-YUAN et al., 2014).

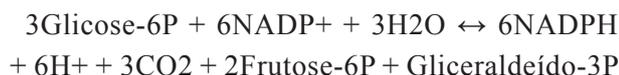
Segundo Chojnacka e Marquez-Rocha (2004), a produtividade de biomassa de microalgas heterotróficas em meio com glicose é comparável a de outros microrganismos heterotróficos aeróbicos. As taxas de respiração e crescimento tendem a ser melhores com glicose do que com qualquer outra fonte de carbono. Isto ocorre porque a glicose libera mais energia por mol do que outras fontes; por exemplo, o acetato libera 0,8 kJ mol⁻¹, enquanto que a glicose libera 2,8 kJ mol⁻¹ (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

O metabolismo inicial da glicose nas microalgas pode ocorrer por duas vias metabólicas: Via Embden-Meyerhof e Via das Pentoses, ambas ocorrendo no citosol (PEREZ-GARCIA et al., 2011; YEH, CHANG, 2012). As equações químicas a seguir descrevem estas vias.

- Reação Global da via Embden-Meyerhof:



- Reação Global da Via das Pentoses:

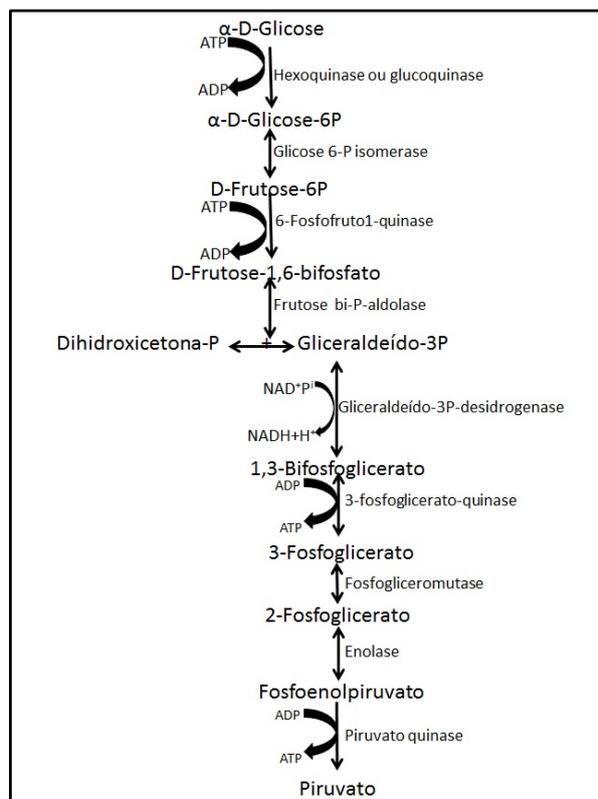


A Via Embden-Meyerhof (Figura 1) é a rota inicial mais comum em situações em que há luz, ou seja, nos cultivos fotoautotróficos, consumindo a glicose originária da fotossíntese. O produto final da oxidação via Embden-Meyerhof é o piruvato, o qual pode ser utilizado no Ciclo

do Ácido Cítrico, no interior da mitocôndria (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

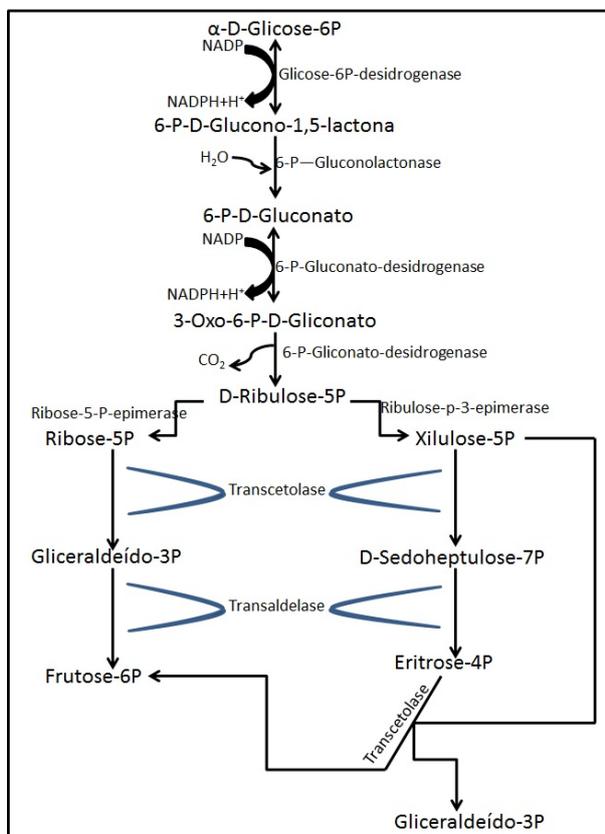
A via das Pentoses (Figura 2) é a rota inicial mais utilizada em cultivos de microrganismos heterotróficos. Entre os produtos finais desta via destacam-se a frutose 6-P e o gliceraldeído 3-P, que são compostos intermediários da glicólise via Embden-Meyerhof. Percebe-se que a via das Pentoses pode ser considerada uma preparação para gerar ATP pela via Embden-Meyerhof/Ciclo do Ácido Cítrico (PEREZ-GARCIA et al., 2011; YEH; CHANG, 2012).

Figura 1 - Via metabólica Embden-Meyerhof, que representa o consumo da glicose originária da fotossíntese. Um dos destinos do piruvato gerado nesta via metabólica é o Ciclo do Ácido Cítrico, que ocorre na mitocôndria. Siglas: ATP, adenosina-trifosfato, ADP, adenosina-difosfato, NAD⁺Pi, dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada, mais fósforo inorgânico, NADH+H⁺, dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida, mais hidrogênio.



Fonte: Lehninger, Nelson e Cox (1995).

Figura 2 - Via metabólica das Pentoses, rota inicial de consumo da glicose em microrganismos heterotróficos. A frutose-6P e o gliceraldeído 3P são compostos intermediários da via Embden-Meyerhof. Siglas: NADP, fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada, mais fósforo inorgânico, NADPH+H, fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida, mais hidrogênio.



Fonte: Lehninger, Nelson e Cox (1995).

A presença da glicose no meio de cultivo promove alterações na composição enzimática e na fisiologia celular da microalga; isto porque a glicose pode atuar como estimulante ou supressora de alguns genes. Há estudos que comprovam que em cepas do gênero *Synechocystis* Sauvageau, o gene para a enzima 6-fosfogluconato-desidrogenase é 60% mais expresso quando há glicose no meio de cultivo. Por outro lado, em algumas cepas, a luz pode atuar como supressora de determinados genes relacionados ao metabolismo heterotrófico. Por exemplo, em cepas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck], a

expressão das enzimas do sistema simporte hexose/H⁺ é inibida pela presença de luz (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

O tempo decorrido entre a estimulação pela glicose e a expressão das enzimas é bastante variável entre as cepas, podendo levar alguns minutos a várias horas. Este tempo está intimamente relacionado a duração da fase lag nos cultivos heterotróficos. Em geral, quanto maior a concentração inicial da glicose, maior a duração deste período de adaptação da microalga às condições de cultivo (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). Segundo Wu e Shi (2007), a produção de biomassa de *Chlorella pyrenoidosa* H. Chick aumentou proporcionalmente à concentração de glicose. No entanto, a taxa de crescimento específica diminuiu a medida que se aumentou a concentração deste açúcar, ou seja, em altas concentrações, levou-se mais tempo para que a cepa alcançasse a velocidade máxima de crescimento.

Altas concentrações de glicose inibem o crescimento de microalgas, sendo que esta concentração varia muito entre espécies (SHI; ZHANG; CHEN, 2000). Por exemplo, a inibição ocorre em meios com concentrações maiores do que 25 g L⁻¹ para *Chlorella saccharophila* (Krüger) Migula e 5 g L⁻¹ para *C. sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss, respectivamente. No entanto, para *Chlorella protothecoides* Krüger, o máximo de crescimento é obtido em valores altos (em torno de 85 g L⁻¹) e o crescimento é inibido apenas em concentrações maiores do que 100 g L⁻¹.

A composição bioquímica da biomassa de microalgas pode ser influenciada pela fonte e pela concentração de carbono no meio de cultivo (LIANG; SARKANY; CUI, 2009). Por exemplo, a porcentagem de carboidratos na biomassa da *Chlorella vulgaris* variou de acordo com a fonte de carbono, sendo de 23% quando o meio de cultivo foi suplementado com acetato e 44% no meio com glicose (Tabela 2). Por isto, a escolha da fonte de carbono no meio de cultivo heterotrófico deve ser em função do composto que se deseja produzir.

Tabela 2 - Composição da biomassa (%) de *Chlorella vulgaris*, cultivada em meio heterotrófico com diferentes fontes de carbono.

Componentes da biomassa	Fontes de carbono do meio de cultivo			
	Glicose	Acetato	Glicerol	Glicerol
Carboidratos	44±0	23±0	29±3	34±4
Lipídios	21±1	31±1	22±4	32±2
Proteínas	32	42	45	30
Cinzas	3	4	4	3

Fonte: Liang, Sarkany e Cui (2009).

Segundo trabalhos citados na revisão de Perez-Garcia et al. (2011), o uso de ácido acético para produção heterotrófica de *Cryptocodinium cohnii* (Seligo) Javornicky resulta em muito mais ácido docosa-hexaenóico (DHA), quando comparado com o cultivo com glicose. Esta diferença na composição provavelmente está relacionada à localização das enzimas das rotas metabólicas destas duas fontes de carbono. No meio com glicose, o acetil-CoA necessário para a síntese lipídica deve ser transportado da mitocôndria para o citosol, onde se encontra o complexo enzimático produtor de lipídios. Enquanto que, com o ácido acético, este composto resulta em íon acetato, o qual pode ser transformado em acetil-CoA no citosol, onde já se encontram as enzimas de síntese lipídica.

Além da glicose e do ácido acético, o glicerol é outra fonte promissora para o cultivo heterotrófico de microalgas. Este álcool orgânico é um subproduto da indústria do biodiesel; sendo produzido aproximadamente 1 L de glicerol para cada 10 L de biodiesel. Desta maneira, o cultivo de microrganismos, entre eles as microalgas, pode ser um destino interessante para o glicerol. Destaca-se que o glicerol pode inibir o crescimento de microalgas, sendo importante otimizar a concentração do substrato, de acordo com a cepa de interesse e, se preciso, adotar o cultivo em *fed-batch* (LIANG; SARKANY; CUI, 2009; SARMA et al., 2012). Caso a opção de fonte de carbono seja o glicerol não purificado, oriundo da produção de biodiesel, é necessário observar se as impurezas presentes prejudicam o

crescimento da microalga. Neste contexto, além do glicerol, a xilose, importante fonte de carbono encontrada em águas residuais das indústrias de celulose e papel, também tem mostrado potencial para incrementar significativamente a produção de biomassa e lipídios em microalgas capazes de crescerem em condições mixotróficas e heterotróficas, em comparação ao crescimento fotoautotrófico (YANG et al., 2014; ZHENG et al., 2014).

Cerón-García et al. (2013) compararam o cultivo heterotrófico semi-contínuo e batelada alimentada da microalga *Chlorella prothotecooides* em um meio a base de glicerol, obtendo produção de 8,7 g L⁻¹ dia⁻¹ de biomassa no semi-contínuo, valores esses similares aos resultados com a utilização de glicose. Esses resultados demonstram que o processo operacional pode ter grande influência no rendimento da fonte de carbono escolhida.

Assim como outros microrganismos heterotróficos, o meio de cultivo para as microalgas heterotróficas deve apresentar a fonte de carbono, mas também outros compostos, destacando-se as fontes de nitrogênio e fósforo. Estudos da cinética do crescimento de *Chlorella* spp. têm mostrado que o consumo de glicose por unidade da biomassa é maior em condições de cultivo com limitação de nutrientes, tais como o nitrogênio e fósforo, (MUTHURAJ et al., 2014; PALABHANVI et al., 2014). Portanto, é necessário considerar a necessidade nutricional como um todo da cepa e não apenas de sua fonte de carbono.

Espécies Heterotróficas

Embora existam espécies de microalgas heterotróficas, percebe-se que há poucas com potencial para produção em grande escala. Isto ocorre porque além da capacidade de oxidar compostos orgânicos presentes no meio externo,

para produção em grande escala, de acordo com Bumbak et al. (2011) é desejável que as cepas apresentem as seguintes características:

- Capacidade de oxidar uma fonte de carbono orgânico, que não seja onerosa e, se possível, esterilizável.
- Adaptar-se rapidamente às condições de cultivo, ou seja, possuir fase lag curta.
- Apresentar taxas de crescimento específico compatíveis com a produção em grande escala. Além de propiciar maior produtividade em curto espaço de tempo, cepas com altas taxas de crescimento específico tendem a se sobreporem em relação a outros microrganismos que possam contaminar o sistema de cultivo.
- Apresentar alta taxa de sobrevivência e conservar suas características após cultivos sucessivos, ou após períodos de armazenamento a baixas temperaturas.
- Possibilidade de ser cultivada em biorreatores convencionais, já desenvolvidos para outros microrganismos, como as leveduras.
- Resistir aos estresses mecânico (hidrodinâmico) e químico impostos pelo sistema de produção.
- Resistir ao processo de colheita adotado durante a produção.
- Não ser tóxica, no caso do produto ser um composto para fins alimentares.

A Tabela 3 apresenta uma lista com as principais espécies de cepas de microalgas com metabolismo heterotrófico, bem como informações sobre parâmetros importantes durante o cultivo.

Tabela 3 - Espécies de microalgas com potencial para cultivo heterotrófico.

Espécie	Fonte de carbono	Produtos	T (°C)	pH	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹) ^a	S _{inh} (L ⁻¹)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard	Acetato	Biomassa	35,0	6,9	0,035	0,4
<i>Chlorella protothecoides</i> Krüger	Glicose, acetato e glicerol	Biodiesel, luteína, lipídios, violaxantina	28,0	6,6	0,090	24
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> H. Chick	Glicose, acetato, glutamato e lactato	Ácido ascórbico e luteína	5,0	6,9	0,201	10
<i>Chlorella regularis</i> (Artari) Oltmanns	Glicose, acetato e etanol	Biomassa, fitoquímicos intracelular	6,0	6,5	0,240	10
<i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck [Beijerinck]	Glicose, acetato, glutamato e lactato	Biomassa	6,0	6,0 - 7,0	0,180	n.a.
<i>Chlorella zofingiensis</i> Dönz	Glicose, frutose, galactose, manose, lactose e sacarose	Astaxantina	0,0	5,5	0,031	20
<i>Cryptochodinium colnii</i> (Seligo) Javornicky*	Glicose e acetato	Ácido docosaexaenoico	5,0	7,2	0,089	20
<i>Dunaliella</i> sp.	Acetato, lactato, glicose, glutamato e glicerol	Biomassa e beta-caroteno	6,0	7,5 - 8,3	<0,010	n.a.
<i>Engelmannia gracilis</i> Klebs	Glicose, acetato, alanina, aspartato, asparagina, etanol e glutamato	Alfa-tocoferol	5	2,8 - 3,5	0,045	n.a.
<i>Galdieria sulphuraria</i> [Galdieri] Merola	Glicose, frutose e sacarose	Ficocianina	2,0	2,0	0,045 - 0,048	200 > 350
<i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow	Acetato, glicose e asparagina	Astaxantina, cantaxantina e luteína	5,0	8,0	0,009	>1,6
<i>Nannochloropsis oculata</i> [Droop] D.J.Hibberd	Glicose e etanol	Biomassa e ácido eicosapentaenoico	6,0	7,5 - 8,3	<0,007	n.a.
<i>Nitzschia alba</i> J.C.Lewin & R.A.Lewin*	Lactato, succinato, glicose e glutamato	Biomassa e ácido eicosapentaenoico	0,0	n.a.	0,106	n.a.
<i>Nannochloropsis oculata</i> [Droop] D.J.Hibberd	Glicose e etanol	Biomassa e ácido eicosapentaenoico	6,0	7,5 - 8,3	<0,007	n.a.
<i>Nitzschia alba</i> J.C.Lewin & R.A.Lewin*	Lactato, succinato, glicose e glutamato	Biomassa e ácido eicosapentaenoico	0,0	n.a.	0,106	n.a.
<i>Nitzschia laevis</i> Hustedt*	Acetato e glicose	Ácido eicosapentaenoico	0,0	8,2	0,017	n.a.
<i>Prototheca zopfii</i> W.Krüger*	Glicose e acetato	L-Ácido ascórbico	1,0	7,2	0,330	n.a.
<i>Scenedesmus actus</i> Meyen	Glicose	Biomassa	0,0	6,0	0,040	> 1
<i>Schizochytrium</i> sp. Goldstein & Belsky*	Glicose	Ácidos graxos poli-insaturados, ácido docosaexaenoico e ácido gama-linolênico.	7,0	7,0	0,071	> 200
<i>Tetraselmis sueica</i> [Kyllin] Butcher	Acetato, glicose, glutamina e lactato.	Lipídios, ácidos graxos poli-insaturados e ácidos graxos insaturados.	5,0	7,5	0,028	n.a.

$\mu_{m\acute{a}x}$ – Velocidade específica máxima de crescimento. S_{inh} - Concentração de substrato que resulta em inibição do crescimento. n.a. - não avaliado. *Estas espécies crescem apenas em cultivo heterotrófico.

Fonte: Bumbak et al. (2011).

Segundo Isleten-Hosoglu; Gultpe; Elibol, (2012), microalgas do gênero *Chlorella* Beyerinck são as que apresentam maior potencial para a produção heterotrófica em grande escala, com destaque para a espécie *C. protothecoides* que tem sido amplamente estudada (XU; MIAO; WU, 2006; LI; XU; WU, 2007; CHENG et al., 2009; SHEN et al., 2010). *Chlorella protothecoides* pode crescer tanto em condições fotoautotróficas, quanto heterotróficas e mixotróficas, sendo bastante promissora para a produção de biodiesel, pois chega a apresentar cerca de 55% de sua biomassa como lipídio (MIAO; WU, 2006). Segundo esses autores, a composição da biomassa de *C. prothotecooides* varia muito dependendo de qual sistema de cultivo é adotado, conforme exemplificado na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição da biomassa (%) de *Chlorella protothecoides* em condições de cultivo fotoautotrófico e heterotrófico.

Componentes da biomassa	Cultivo fotoautotrófico	Cultivo heterotrófico
Proteínas	52,64±0,26	10,28±0,10
Lipídios	14,57±0,16	55,20±0,28
Carboidratos	10,62±0,14	15,43±0,17
Cinzas	6,36±0,05	5,93±0,04
Umidade	5,39±0,04	1,96±0,02
Outros	10,42±0,65	11,20±0,61

Fonte: Miao e Wu (2006).

Cultivo Heterotrófico

Como não necessita de luz, o cultivo heterotrófico não apresenta problemas relacionados ao sombreamento decorrente do aumento da densidade. Este fato diminui os custos com a separação da biomassa, pois quanto mais densa a produção, mais facilmente a biomassa pode ser separada do meio de cultivo. Bumbak et al. (2011) citam que o cultivo fotoautotrófico é considerado denso quando atinge valores de biomassa da ordem de 40 g L⁻¹, enquanto que para o cultivo heterotrófico, o sistema é considerado denso quando atinge em torno de 100 g L⁻¹. No entanto, é necessário observar que, dependendo do composto que se deseja obter, a alta densidade não necessariamente reflete em maior produtividade. Por exemplo, alguns produtos microbianos resultantes do metabolismo secundário apresentam síntese não proporcional ao crescimento

celular e, portanto, não aumentam em função da densidade da biomassa.

O fato de não depender de fonte luminosa também facilita o cultivo heterotrófico em grandes volumes, o que contribui para o aumento de escala do sistema. Li, Xu e Wu (2007) estudaram o cultivo heterotrófico de *C. protothecoides* para produção de biodiesel em três volumes: 5, 750 e 11.000 L. Os autores não observaram variação considerável na densidade de biomassa nos três volumes testados. A possibilidade de realizar o cultivo heterotrófico concentrado em biorreatores com grandes volumes tende a diminuir a área utilizada para a produção de microalga (SHEN et al., 2010).

Segundo Azma et al. (2011), o aumento de escala do cultivo heterotrófico de microalgas também pode se beneficiar das técnicas e equipamentos projetados para os cultivos industriais heterotróficos de outros microrganismos, o que pode tornar mais breve a sua viabilidade técnica-econômica. Os biorreatores utilizados nos cultivos de microrganismos, em geral, permitem um controle adequado dos principais parâmetros do cultivo, independente das condições do clima. Por ser um sistema fechado e controlado, a produtividade dos cultivos heterotróficos tende a ser bem maior do que o fotoautotrófico (CHEN, 1996; SHEN, YUAN, PEI et al., 2010).

Por depender de uma fonte de carbono externo, o cultivo heterotrófico é mais propenso à contaminação (MUTHURAJ et al., 2014). No entanto, quando o sistema é fechado e controlado, as chances de contaminação são menores (LI et al., 2014). Para tanto, é necessário realizar a esterilização do sistema de produção, porém o custo benefício deve ser analisado. Segundo Li, Xu e Wu (2007), o vapor utilizado para esterilização, pode corresponder a 14,2% dos custos totais da produção.

A comparação da produtividade dos diferentes sistemas de cultivo de microalgas nem sempre é fácil, pois existe grande variação nas metodologias utilizadas para obtenção de dados, bem como, nas condições de cultivo. Mesmo assim, é possível

comparar alguns resultados de um mesmo grupo de pesquisa. Por exemplo, Liang, Sarkany e Cui (2009) relatam que para a microalga *C. protothecoides*, a produção de biomassa no cultivo heterotrófico chega a ser 3,4 vezes maior, do que no cultivo fotoautotrófico. Outro fator crucial no cultivo heterotrófico, principalmente os que apresentam altas densidades, é o suprimento com oxigênio. Todas as microalgas heterotróficas são aeróbicas e quanto mais denso o cultivo, maior a demanda por oxigênio, o qual é utilizado durante o metabolismo energético (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). Wu e Shi (2007) relataram que tiveram problemas com a aeração de seu sistema de cultivo e, como consequência, a produtividade final foi bem menor do que o esperado. Portanto, ao se projetar um sistema heterotrófico de microalgas é essencial considerar como será suprida esta alta demanda por oxigênio.

Um fator que influencia o suprimento de oxigênio é a agitação adequada do meio de cultivo, pois favorece o intercâmbio gasoso entre células e o meio. Além disto, a agitação evita a sedimentação da biomassa e impede a formação de gradientes das condições de cultivo (CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006). Destaca-se que algumas cepas de microalgas são especialmente sensíveis a altas taxas de agitação (CAMACHO et al., 2011; RAVELONANDRO et al., 2011).

Outro parâmetro crucial no cultivo heterotrófico é o potencial hidrogeniônico (pH) do meio de cultivo. Em geral, o pH tende a diminuir principalmente na fase exponencial de crescimento, isto porque a oxidação da fonte de carbono resulta em gás carbônico e/ou ácidos orgânicos. Shi, Zhang e Chen (2000) monitoraram o pH do cultivo heterotrófico de *C. protothecoides* e observaram que o pH decaiu a valores próximos a 4,0, o que prejudicou a produtividade de biomassa. Desta maneira, dependendo da sensibilidade da cepa em relação ao pH, pode ser necessário controlar este parâmetro durante o cultivo.

Embora seja comum o cultivo heterotrófico em batelada, várias alternativas a este sistema foram estudadas, principalmente para evitar a inibição inicial, causada pelas altas concentrações de substrato. O sistema de cultivo em *fed-batch* tem apresentado bons resultados para o cultivo de *C. protothecoides* em sistema heterotrófico em comparação com o de batelada, com aumentos na produção da biomassa de 3,2 para 51,2 g L⁻¹ (XIONG et al., 2008) e de 9,1 para 17,2 g L⁻¹ (ESPINOSA-GONZALEZ; PARASHAR; BRESSLER, 2014). Estes estudos demonstraram a forte influência do sistema operacional sob a produtividade de microalgas.

Sistemas Alternativos para Cultivo Heterotrófico

A fonte de carbono é um dos itens que mais encarecem os cultivos heterotróficos. Li, Xu e Wu (2007) estimam que a glicose corresponda a 45,4% do custo global da produção heterotrófica. Embora este carboidrato sustente as melhores produções de biomassa, dependendo do valor agregado do produto final, é essencial pesquisar alternativas a esta fonte. Desta maneira, várias pesquisas têm sido feitas a fim de encontrar fontes alternativas e, com isto, melhorar a viabilidade financeira (SHEN et al., 2010). Cheng et al. (2009) testaram meios de cultivo heterotróficos feitos à base de alcachofra-de-jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.) para produção de *C. protothecoides*. A taxa de conversão da fonte de carbono em biomassa foi de 62,7% (±6,6) no meio com glicose e 57,2% (±2,8) no meio a base de alcachofra-de-jerusalém, o que comprova que é possível utilizar essa espécie como meio alternativo para o cultivo da microalga estudada.

Alguns autores têm estudado o uso de águas residuais como base para o meio de cultivo heterotrófico de microalgas (BEEVI; SUKUMARAN, 2014; PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011; SINGH; REYNOLDS;

DAS, 2011). Em geral, estes sistemas têm como foco principal o tratamento do efluente, sendo a biomassa gerada um sub-produto do processo. Embora não produzam tanto quanto o meio à base de glicose, estes meios de cultivo podem ser promissores, principalmente, para a produção de compostos de baixo valor agregado, como o biodiesel. Além disso, como ocorre redução do potencial de poluição dos resíduos utilizados, agrega-se valor ambiental ao processo.

Embora promissor, a utilização de resíduos para a produção de microalgas apresenta alguns desafios, tais como; presença de compostos tóxicos e de microrganismos e a variabilidade da composição. Uma alternativa para solucionar parte dessas questões é o isolamento de cepas de microalgas dos próprios resíduos, as quais tendem a ser mais robustas e competitivas (LIANG et al., 2010). Para minimizar o problema da variabilidade da composição do resíduo a sugestão é a análise química previamente.

Alguns grupos de pesquisa, utilizando resíduos, têm adotado a produção de microalgas em sistemas sequenciais com uma etapa heterotrófica e outra fotoautotrófica. Zhou et al. (2012) estudaram o tratamento de esgoto doméstico utilizando um sistema sequencial de microalgas. Na primeira etapa, as microalgas cresceram heterotroficamente, com o objetivo de diminuir o potencial poluidor do esgoto e também produzir biomassa para produção de biodiesel. Após esta etapa, a biomassa foi separada por sedimentação, e o sobrenadante foi utilizado como meio de cultivo para a etapa fotototrófica, a qual foi feita em fotobiorreator. Esta segunda etapa foi considerada importante por propiciar redução adicional do potencial poluidor e também por permitir a fixação de gás carbônico. Neste estudo, o sistema mostrou-se mais eficaz na diminuição do potencial poluidor do que na produção de biomassa, no entanto, como o custo de cultivo foi mais baixo que o convencional, mesmo não ocorrendo grande produção de biomassa, esta foi considerada viável.

O sistema sequencial (heterotrófico-fotoautotrófico) também pode ser adotado com meios de cultivo padrão. Wensel et al. (2014) desenvolveram um sistema de cultivo de duas etapas, a primeira heterotrófica e a segunda fotoautotrófica em tanques abertos, obtendo concentrações de biomassa seca de 0,978 g L⁻¹. Oyler (2007) patenteou um sistema sequencial de produção de microalgas em que a primeira etapa é fotoautotrófica e a segunda é heterotrófica. Também foram patenteados outros sistemas sequenciais fotoautotrófico-heterotrófico, para cultivo de microalgas com o objetivo de produzir biodiesel (WU; XIONG, 2008; WU; XIONG, 2011).

Produtos Microalgais de Sistemas Heterotróficos

Há grande variedade de produtos que podem ser obtidos a partir do cultivo heterotrófico de microalgas (Tabela 5). No entanto, determinados produtos microalgais são produzidos, em grande quantidade, apenas em cultivos fotoatutotróficos. A maior parte dos pigmentos é exemplo deste fato, isto porque tais substâncias captam luz ou tem papel na fotoproteção.

Tabela 5 - Potenciais produtos obtidos do cultivo heterotrófico de microalgas.

Produto	Principais espécies de microalgas
Lípidios em geral	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>C. saccharophila</i> , <i>C. protothecoides</i> , <i>C. sorokiniana</i> , <i>C. pyrenoidosa</i> , <i>Cryptomonidium conhii</i> , <i>Cylindrotheca fusiformis</i> , <i>Engelena gracilis</i> , <i>Navicula incerta</i> , <i>Nitzschia alba</i> , <i>N. laevis</i> , <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Skeletonema costatum</i> , <i>Tetraselmis suecica</i>
Ácidos graxos poli-insaturados	<i>Cryptomonidium conhii</i> , <i>Nitzschia laevis</i> , <i>N. alba</i> , <i>Pavlova lutheri</i> , <i>Schizochytrium limacinum</i> , <i>Tetraselmis suecica</i>
Biodiesel	<i>Chlorella protothecoides</i>
Ficocianina	<i>Galdieria sulphuraria</i> , <i>Spirulina platensis</i>
Carotenóides e xantofilas	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Chlorella protothecoides</i> , <i>Chlorella zofingensis</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Dunaliella</i> sp.

Fonte: Perez-Garcia et al. (2011).

Apesar de ocorrer menor proporção de pigmentos nos cultivos heterotróficos, alguns grupos de pesquisa têm estudado esta produção, pois a produtividade global alta pode compensar a menor proporção de pigmentos da biomassa. Graverholt e Eriksen (2007) estudaram a produção do pigmento ficocianina em cultivo heterotrófico de *Galdieria sulphuraria* (Galdieri) Merola. Eles

alcançaram densidades de 80-100 g L⁻¹ de biomassa e produtividade de ficocianina entre 0,5-0,9 g L⁻¹ d⁻¹. A produtividade final deste experimento foi superior ao cultivo fotoautotrófico de *Spirulina platensis* (Gomont) Geitler (*Arthrospira platensis* Gomont) e *Anabaena* sp. para produção de ficocianina.

Em grande escala, tem-se o conhecimento de produção heterotrófica de microalgas, em volumes de 100 m³, com objetivo de produzir ácidos graxos poli-insaturados (BUMBAK et al., 2011). No entanto, várias patentes foram registradas sobre o cultivo heterotrófico de microalgas, com destaque para: produção de astaxantina em um fermentador convencional pela microalga *Chlorella zofingiensis* Dönn (CHEN, 2004); um sistema para produção de ácidos graxos poli-insaturados por microalgas (BEHRENS et al., 2010a); um método para produção de ácido docosa-hexaenóico (DHA) por microalgas (BEHRENS et al., 2010b). Além destas patentes, também podemos citar as da microalga transgênica com inserção de gene para metabolismo heterotrófico (APT et al., 2011); microalga geneticamente modificada para crescimento heterotrófico e seu método de cultivo (FRANKLIN et al., 2011a; FRANKLIN et al., 2011b). Nestas últimas duas patentes, o cessionário é a Solazyme, uma empresa de biotecnologia que pesquisa a produção de biomassa de microalgas com fins energéticos, alimentares, farmacêuticos e da indústria de cosméticos.

Viabilidade Econômica do Cultivo Heterotrófico

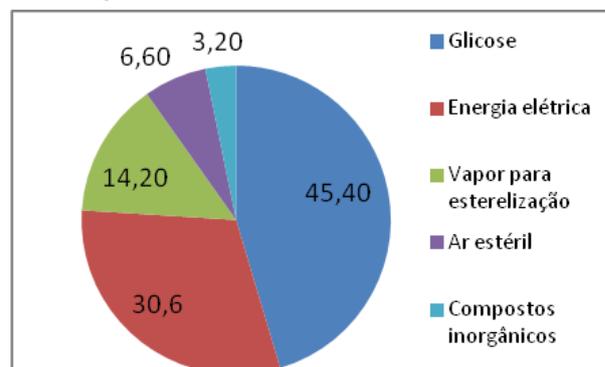
A viabilidade econômica de um sistema de produção de microalgas está relacionada, principalmente, com os investimentos necessários para sua instalação e operação, bem como o valor agregado do produto final. Desta maneira, ao se analisar a viabilidade econômica da produção heterotrófica de microalgas, é essencial considerar que há diferentes produtos que podem ser obtidos a partir deste cultivo, alguns com alto valor agregado,

como pigmentos e óleos poli-insaturados; enquanto outros apresentam baixo valor agregado, como o biodiesel. Além disso, o objetivo do cultivo de microalgas pode não estar relacionado com a obtenção de um produto, mas a um processo, como a diminuição do potencial poluidor de um resíduo ou a fixação de gás carbono.

Quando comparado ao cultivo de leveduras, a produção heterotrófica de microalgas é muito recente, o que dificulta uma análise de viabilidade financeira mais acurada, pois há poucos dados em grandes produções. Por isto, a maior parte das considerações sobre viabilidade encontradas em literatura diz respeito à extrapolação dos dados de laboratório para escalas maiores.

O maior gasto do cultivo heterotrófico é com a fonte de carbono, em geral a glicose (Figura 3). Desta maneira, para produção de produtos com baixo valor agregado, como o biodiesel, é essencial a utilização de fontes alternativas e baratas para a produção.

Figura 3 - Custos com o cultivo heterotrófico de microalgas.



Fonte: Li, Xu e Wu (2007).

Os biorreatores representam um grande desafio para o cultivo mixotrófico e/ou heterotrófico (LI et al., 2014). A maioria dos estudos utiliza biorreatores do tipo *stirred-tank* (LI; XU; WU, 2007), que seriam viáveis apenas em escala laboratorial e piloto, ou para produção de produtos com alto valor agregado (como produtos farmacêuticos).

Destaca-se, portanto, a necessidade de pesquisas e desenvolvimento de biorreatores específicos para microalgas, com vistas à produção em grande escala (WANG; YANG; WANG, 2014). Neste sentido, a experiência brasileira na indústria do etanol de cana-de-açúcar pode contribuir para o desenvolvimento de novos biorreatores.

Xiong et al. (2008) consideraram que o cultivo heterotrófico de microalgas com densidade de $116,2 \text{ g L}^{-1}$ e produtividade de $10 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ seria competitivo para produção de biocombustíveis. No entanto, Bumbak et al. (2011) consideraram que o cultivo heterotrófico de microalgas é viável apenas para produtos que não são obtidos de outros microrganismos, os quais já estariam mais adaptados a grandes escalas de produção.

Shen et al. (2010) afirmaram que a produção heterotrófica de microalgas poderia ser acoplada à produção de etanol por leveduras, isto porque ambos processos usam matérias-primas semelhantes, porém, com possibilidade de produtos finais diferentes. Destaca-se que a taxa de utilização do açúcar pela microalga pode ser superior ao das leveduras, além disso, as microalgas podem utilizar uma faixa mais ampla de compostos orgânicos como fonte de carbono.

Metabolismo Mixotrófico

Analisando-se a literatura, percebe-se que ainda não há um consenso sobre a definição científica deste termo, sendo que alguns autores utilizam fotoautotróficos e mixotróficos como sinônimos. De acordo com Chojnacka e Marquez-Rocha, (2004) entre as definições mais comuns para o termo mixotrófico destacam-se as seguintes:

- Processo metabólico no qual a fotossíntese é a principal fonte de energia, embora os compostos orgânicos e o dióxido de carbono são essenciais.
- Microrganismo com capacidade de crescer tanto em condições fotoautotróficas quanto heterotrófica, dependendo da concentração de carboidrato ou da

intensidade de luz. Em alguns casos, esta definição é dada ao termo anfitrófico. Percebe-se que, por esta definição ocorreria a rota metabólica hetero ou fotoautotrófica em momentos distintos.

- Organismo capaz de assimilar compostos orgânicos como fonte de carbono e utilizar carbono inorgânico como doador de elétrons.
- Metabolismo que capta energia por meio da catálise de compostos orgânicos externos via respiração; e converte energia luminosa em compostos químicos via fotossíntese.

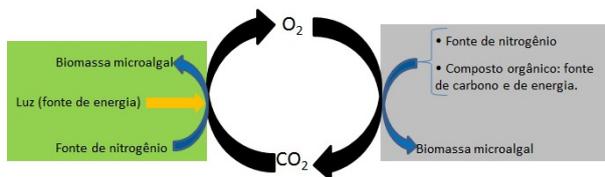
De acordo com esta última definição, no metabolismo mixotrófico ocorreria simultaneamente as rotas metabólicas fotoautotróficas (fotossíntese) e as heterotróficas (oxidação de compostos orgânicos externos via respiração). Esta definição tem sido amplamente adotada na maioria dos estudos consultados nesta revisão.

Embora não seja tão explorado em termos de produção de microalgas, essa forma de metabolismo pode resultar em vantagens competitivas e tem sido observada nos mais diversos ambientes, desde oligotróficos a eutróficos. Para que uma cepa seja capaz de crescer em condições mixotróficas, suas enzimas da rota heterotrófica não podem ser inibidas pela presença de luz. Alguns autores consideram que as rotas metabólicas fotoautotróficas e heterotróficas seriam independentes no cultivo mixotrófico. No entanto, percebe-se que a produtividade dos sistemas mixotróficos não é a simples soma destas outras duas formas de cultivo. Além disso, há indícios de que há uma ligação entre o sistema de transporte de elétrons dos metabolismos fotoautotróficos e heterotróficos das microalgas, tornando-os interdependentes (CHOJNACKA, MARQUEZ-ROCHA, 2004). Adolf, Stoecker e Lawrence (2006) utilizaram carbono radioativo para estudar o metabolismo fotoautotrófico e heterotrófico durante o cultivo mixotrófico de *Karlodinium micrum* (B.Leadbeater & J.D.Dodge) J.Larsen. Os autores perceberam que a fotossíntese continuou a ocorrer durante o cultivo mixotrófico, no entanto, esta rota

metabólica foi 24 a 57% menor do que no cultivo apenas fotoautotrófico. Portanto, há indícios de influência de uma forma de metabolismo sobre a outra.

O diagrama na Figura 4 é uma representação do metabolismo mixotrófico, no qual o oxigênio produzido na fotossíntese é consumido na rota heterotrófica, desta maneira ocorrendo a redução do dano por fotoxidação (fotorrespiração). Ao mesmo tempo, o gás carbônico gerado da oxidação do composto orgânico é aproveitado na fotossíntese, pela mesma microalga. Em um sistema mixotrófico ideal, em que as taxas de respiração e de fotossíntese são correspondentes, não ocorreria liberação de gás carbônico ou oxigênio para o meio externo, pois, haveria um equilíbrio entre consumo e produção destes gases. Porém, na prática, este equilíbrio não é observado, ocorrendo a liberação dos gases, dependendo de qual rota metabólica predomina durante o cultivo. Este desequilíbrio tende a ocorrer, principalmente, devido às limitações de substratos; neste caso tanto a luz quanto a fonte de carbono orgânica são tratados como substratos (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Figura 4 - Diagrama representando o metabolismo mixotrófico. Retângulo verde - metabolismo fotoautotrófico; retângulo cinza - metabolismo heterotrófico.



Fonte: Chojnacka e Marquez-Rocha (2004).

No cultivo mixotrófico não se observa fotoinibição, fenômeno comum em sistemas fotoautotróficos com altas intensidades luminosas. A fotoinibição relaciona-se à saturação do fotossistema II e pode causar danos reparáveis nas células. Esta capacidade de reparação varia conforme as cepas e as condições de cultivo (LIANG; SARKANY; CUI, 2009).

Há algumas suposições com o objetivo de explicar a ausência da fotoinibição em sistemas mixotróficos. Segundo uma das hipóteses, a fonte de carbono orgânico apresentaria um efeito fotoprotetor. Outra hipótese diz respeito ao deslocamento da intensidade luminosa máxima que causaria a fotoinibição, devido à presença da fonte de carbono orgânico. Destaca-se que, embora não ocorra fotoinibição, no cultivo mixotrófico pode ocorrer inibição devido à concentração do composto orgânico (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). De acordo com Markou e Georgakakis (2011), as cepas de microalgas em cultivo mixotrófico requerem menor intensidade luminosa para o seu crescimento. Desta maneira, caso seja utilizada iluminação artificial, os gastos com este parâmetro serão menores no sistema mixotrófico, quando comparado com o fotoautotrófico (GARCIA et al., 2005).

Guoce et al. (2011) comparam o crescimento de uma cepa do gênero *Anabaena* Bory de Saint-Vincent ex Bornet & Flahault nos sistemas mixotrófico e fotoautotrófico e a fonte de carbono foi a glicose. No cultivo mixotrófico foi observada a necessidade de menor intensidade luminosa e o sistema apresentou maior taxa de crescimento, resultando em uma produtividade de biomassa 1,5 a 2,0 vezes superiores ao crescimento fotoautotrófico.

Bonini e Bastos (2012) estudaram o cultivo mixotrófico e heterotrófico de *Chlorella vulgaris*, tendo como fonte de carbono a glicose. Estes autores observaram que a velocidade específica de crescimento foi maior no cultivo heterotrófico, demonstrando que há variação entre as cepas e os métodos de cultivo adotados.

Quando se utiliza meios de cultivo a base de resíduos, em geral, a turbidez tende a aumentar, o que desfavorece o cultivo de microalgas fotoautototróficas estritas. Como necessitam de menor intensidade luminosa, o crescimento de cepas mixotróficas nestes meios tende a ser melhor (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011)

Há vários trabalhos que exploram o potencial de cepas mixotróficas de microalgas para o tratamento de resíduos. Córdoba et al. (2008) cultivaram uma cepa de *Chlorella zofingiensis* em meio a base de resíduo da indústria de azeite de oliva e concluíram que o meio foi eficaz para a produção de biomassa desta microalga.

Mezzomo et al. (2010) cultivaram *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) em um meio à base de dejetos suíno, com objetivo de produzir biomassa e também diminuir o potencial poluidor destes resíduos. Eles concluíram que este sistema de cultivo mixotrófico foi eficiente para diminuir a Demanda Química de Oxigênio e a concentração de fósforo do resíduo, bem como para produção adicional de biomassa. Para tratar resíduos da produção de frango, cepas rústicas de *Chlorella minutissima* Fott & Nováková, *Chlorella sorokiniana* e *Scenedesmus bijuga* (Turpin) Lagerheim mostraram-se capazes de consumir tanto compostos orgânicos como inorgânicos presentes nesses resíduos (SINGH; REYNOLDS; DAS, 2011). Destaca-se que esta é uma vantagem das cepas mixotróficas em comparação com as fotoautotróficas, incapazes de oxidar compostos orgânicos.

Os cultivos mixotróficos tendem a apresentar produtividade de biomassa bem superior ao fotoautotrófico (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; YANG et al., 2014). Em muitas cepas, a produtividade do mixotrófico é também superior ao heterotrófico (CHEN; CHEN; GONG, 1997). Esta alta produtividade ocorre devido a vários fatores: (1) ausência de fotoinibição; (2) diminuição dos danos causados por excesso de oxigênio no meio de cultivo; (3) altas taxas metabólicas, com entrada de energia tanto por meio da oxidação da fonte orgânica de carbono quanto da luz; (4) consumo conjunto de dióxido de carbono e substrato orgânico como fontes de carbono.

Li et al. (2014) analisaram o crescimento de uma cepa de *Chlorella sorokiniana* em condições fotoautotrófica, heterotrófica e mixotrófica, tendo a

glicose como fonte de carbono. O cultivo mixotrófico apresentou os melhores resultados, sendo que a biomassa seca final foi 2,4 e 5,2 vezes maior do que os cultivos heterotróficos e fotoautotróficos, respectivamente. Girard et al. (2014) estudaram o cultivo de *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing em condições fotoautotrófica, heterotrófica e mixotrófica, utilizando soro de leite como fonte de carbono. O melhor crescimento ocorreu no cultivo mixotrófico, o qual apresentou taxa de crescimento específico de 1,083 por dia. Comparando-se com o cultivo heterotrófico, o mixotrófico apresenta as vantagens de fixar gás carbônico (DEVI; SUBHASH; MOHAN, 2012) e permitir a produção de substâncias com metabolismo induzido pela luz, principalmente os pigmentos (CHEN; CHEN; GONG, 1997). No entanto, este sistema apresenta como principal desvantagem a dificuldade operacional.

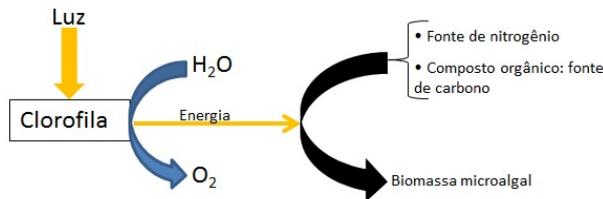
Além do tipo e concentração da fonte de carbono, o cultivo mixotrófico é influenciado pela: luminosidade, temperatura, presença de microrganismos contaminantes e pH (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Embora alguns autores afirmem que o cultivo mixotrófico resulte em menor variação de pH (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004), para determinadas cepas é necessário controlar este parâmetro a fim de conseguir melhor produtividade. Liang, Sarkany e Cui (2009) citaram que apesar de existirem várias cepas mixotróficas na natureza, poucas são capazes de crescer nestas condições no laboratório. Entre as cepas que apresentam esta capacidade destacam-se: *Haematococcus pluvialis* Flotow, *C. protothecoides*, *Ochromonas minima* Thronsen, e *Nannochloropsis* sp.

Metabolismo Fotoheterotrófico

Outra forma de metabolismo que pode estar presente nas microalgas é o fotoheterotrófico e, neste, a luz é a fonte de energia e o composto orgânico é a fonte de carbono (Figura 5). Na prática, para se diferenciar o metabolismo mixotrófico ou fotoheterotrófico é necessário identificar quais

são os parâmetros limitantes do crescimento microalgal: no mixotrófico o crescimento melhora caso ocorra aumento da fonte de carbono orgânica ou da oferta de luz; enquanto no fotoheterotrófico o crescimento melhora apenas se ambos os parâmetros são otimizados simultaneamente (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Figura 5 - Diagrama representando o metabolismo fotoheterotrófico.



Fonte: Chojnacka e Marquez-Rocha (2004).

Os metabolismos fotoheterotrófico e mixotrófico também podem ser diferenciados em relação ao consumo de dióxido de carbono. No cultivo fotoheterotrófico a única fonte de carbono é a orgânica, portanto não há consumo de gás carbônico, que é consumido no mixotrófico devido a reação da fotossíntese nesse metabolismo (YEH; CHEN; CHANG, 2012).

Algumas microalgas heterotróficas necessitam de luz para ativar algumas de suas enzimas, no entanto, nota-se que são necessários apenas pulsos de luz, que ativam enzimas de rotas não relacionadas diretamente ao metabolismo energético, não as caracterizando como fotoheterotróficas (CHOJNACKA, MARQUEZ-ROCHA, 2004).

O sistema de cultivo fotoheterotrófico foi estudado por Yeh, Chen e Chang (2012), utilizando uma cepa de *Chlorella vulgaris*. Nesse estudo, o acetato foi indicado como fonte potencial, a fim de otimizar os custos, embora entre as diferentes fontes de carbono testadas, a glicose tenha apresentado as melhores taxas de crescimento.

Conclusões

A produção em grande escala de microalgas deve ser considerada como uma tecnologia emergente e, como tal, ainda são necessários estudos e desenvolvimento tecnológicos para torná-la competitiva com os sistemas de produção já existentes. A variabilidade metabólica das microalgas é um fator importante a ser considerado na viabilização da produção em grande escala destes microrganismos. É importante determinar qual o metabolismo predominante da cepa que se deseja cultivar, pois desta maneira, pode-se projetar o sistema de produção, bem como, o meio de cultivo mais adequado.

Além da variação natural, é possível recorrer à manipulação genética das microalgas, o que pode facilitar ainda mais sua produção. Para tanto, são necessários avanços nos estudos genéticos destes microrganismos.

Embora nos últimos anos diversos estudos sobre o metabolismo não-fotoautotrófico das microalgas relatam resultados altamente promissores, ainda é necessário desenvolver ajustes tecnológicos para a implantação em escala industrial destas formas de cultivo.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado com recursos do Projeto Microalgas, uma parceria entre COPEL Geração e Transmissão, Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento do Agronegócio (FAPEAGRO). D.S. Andrade agradece a Fundação Araucária a bolsa de pesquisa (Proc. no 42306/2014).

Referências

- ADOLF, J. E.; STOECKER, D. K.; LAWRENCE, W. H. J. The balance of autotrophy and heterotrophy during mixotrophic growth of *Karlodinium micrum* (Dinophyceae). *Journal of Plankton Research*, Oxford, v. 28, n. 8, p. 737-751, 2006.
- APT, K. E.; ALLNUTT, C. T.; KYLE, D. J.; LIPPMEIER, J. C. Trophic conversion of obligate phototrophic algae through metabolic engineering. *C. Martek Biosciences Co.* US7939710 B1, 2011.
- AZMA, M.; MOHAMED, M. S.; MOHAMED, R.; RAHIM, R. A.; ARIFF, A. B. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, Filadelfia, v. 53, p. 187-195, 2011.
- BEEVI, U. S.; SUKUMARAN, R. Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load. *Bioresource Technology*, Essex, v. 165, p. 295-301, 2014.
- BEHRENS, P. W.; THOMPSON, J. M.; APT, K.; PTEIFER, J. W.; WYNN, J. P.; LIPPMEIER, J. C.; FICHTALI, J.; HANSEN, J. Method for the selection of low pH-tolerant, DHA producing microalgae. *C. Martek Biosciences Co.* US7745183 B2, 2010a.
- BEHRENS, P. W.; THOMPSON, J. M.; APT, K.; PTEIFER, J. W.; WYNN, J. P.; LIPPMEIER, J. C.; FICHTALI, J.; HANSEN, J. Production of DHA in microalgae in medim having modified amounts of potassium. *C. Martek Biosciences Co.* US7824892 B2, 2010b.
- BONINI, M. D. A.; BASTOS, R. G. Produção de biomassa de *Aphanothece microscopica* e *Chlorella vulgaris* por cultivo heterotrófico a partir de glicose. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 33, n. 2, p. 151-160, 2012.
- BRUTEMARK, A.; GRANÉLI, E. Role of mixotrophy and light for growth and survival of the toxic haptophyte *Prymnesium parvum*. *Harmful Algae*, Amsterdam, v. 10, p. 388-394, 2011.
- BUMBAK, F.; COOK, S.; ZACHLEDER, V.; HAUSER, S.; KOVAR, K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 91, n. 1, p. 31-46, 2011.
- CAMACHO, F. G.; RODRÍGUEZ, J. J. G.; MIRÓN, A. S.; BELARBARIA, E. H.; CHISTI, Y.; GRIMA, E. M. Photobioreactor scale-up for a shear-sensitive dinoflagellate microalga. *Process Biochemistry*, Vandoeuvre, v. 46, p. 936-944, 2011.
- CARVALHO, A. P.; MEIRELES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*, Madison, v. 22, n. 6, p. 1490-1506, 2006.
- CERÓN-GARCÍA, M. C.; MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; SÁNCHEZ-MIRÓN, A.; GARCÍA-CAMACHO, F.; MOLINA-GRIMA, E. A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source. *Applied Energy*, Västerås, v. 103, n. 10, p. 341-349, 2013.
- CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*, Cambridge, v. 4, p. 421-426, 1996.
- _____. Method for production of astaxanthin from the green microalgae *Chlorella* in dark-heterotrophic cultures. *C. University of Hong Kong*. United States US7063957 B2, 2004.
- CHEN, F.; CHEN, H.; GONG, X. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus lacustris* and rheological behaviour of the cell suspensions. *Bioresource Technology*, Essex, v. 62, p. 19-24, 1997.
- CHENG, Y.; ZHOU, W.; GAO, C.; LAN, K.; GAO, Y.; WU, Q. Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, London, v. 84, p. 777-781, 2009.

- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, Toronto, v. 3, n. 1, p. 21-34, 2004.
- CÓRDOBA, L. T.; BOCANERA, A. R. D.; LLORENTE, B. R.; HERNÁNDEZ, E. S.; ECHEGOYEN, F. B.; BORJA, R.; BEJINES, F. R.; MORCILLO, M. F. C. Batch culture growth of *Chlorella zofingiensis* on effluent derived from two-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid waste. *Electronic Journal of Biotechnology*, Valparaíso, v. 11, n. 0717-3458, p. 1-8, 2008.
- DEVI, M. P.; SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*, Oxford, v. 43, p. 276-283, 2012.
- ESPINOSA-GONZALEZ, I.; PARASHAR, A.; BRESSLER, D. C. Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production. *Bioresource Technology*, Essex, v. 155, n. 8, p. 170-176, 2014.
- FRANKLIN, S.; SOMANCHI, A.; ESPINA, K.; RUDENKO, G.; CHUA, P. Recombinant microalgae cells producing novel oils. I. Solayme, *Cessionária*. United States patent US7935515 B2 2011a.
- FRANKLIN, S.; SOMANCHI, A.; ESPINA, K.; RUDENKO, G.; CHUA, P. Renewable chemical production from novel fatty acid feed stocks. I. Solayme, *Cessionária*. United States Patente, US7883882 B2, 2011b.
- GARCIA, M. C. C.; MIRÓN, A. S.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M.; CAMACHO, F. G. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry*, Vandoeuvre, v. 40, p. 297-305, 2005.
- GIRARD, J.-M.; ROY, M.-L.; HAFSA, M. B.; GAGNON, J.; FAUCHEUX, N.; HEITZ, M.; TREMBLAY, R.; DESCHÊNES, J.-S. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research*, Oxford, v. 5, n. 7, p. 241-248, 2014.
- GRAVERHOLT, O.; ERIKSEN, N. Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 77, n. 1, p. 69-75, 2007.
- GUOCE, Y.; DINGJI, S.; ZHAOLING, C.; WEI, C.; FAN, O. Growth and physiological features of cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 in a glucose-mixotrophic culture. *Biotechnology and Bioengineering*, Berkeley, v. 19, n. 1, p. 108-115, 2011.
- ISLETEN-HOSOGLU, M.; GULTPE, I.; ELIBOL, M. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochemical Engineering Journal*, Filadelfia, v. 61, n. 1, p. 11-19, 2012.
- JEONG, H. J.; YOO, Y. D.; KIM, J. S.; SEONG, K. A.; KIM, T. H. Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean Science Journal*, Ansan, v. 45, n. 2, p. 65-91, 2010.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier. 1995. 839 p.
- LI, T.; ZHENG, Y.; YU, L.; CHEN, S. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, Oxford, v. 66, n. 1, p. 204-213, 2014.
- LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, Berkeley, v. 98, n. 4, p. 764-771, 2007.

- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 31, n. 7, p. 1043-1049, 2009.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y.; BLACKBURN, J. Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. *Bioresource Technology*, Essex, v. 101, n. 17, p. 6745-6750, 2010.
- MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. *Applied Energy*, Västerås, v. 88, n. 7, p. 3401-3389, 2011.
- MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A. G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P. O.; LAGO, M. C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.
- MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, Essex, v. 97, p. 841-846, 2006.
- MUTHURAJ, M.; KUMAR, V.; PALABHANVI, B.; DAS, D. Evaluation of indigenous microalgal isolate *Chlorella* sp. FC2 IITG as a cell factory for biodiesel production and scale up in outdoor conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Heidelberg, v. 41, n. 3, p. 499-511, 2014.
- OYLER, J. R. Two-stage process for producing oil from microalgae. United States Patent US7905930 B2, 2007.
- PALABHANVI, B.; KUMAR, V.; MUTHURAJ, M.; DAS, D. Preferential utilization of intracellular nutrients supports microalgal growth under nutrient starvation: multi-nutrient mechanistic model and experimental validation. *Bioresource Technology*, Essex, v. 173, n. 2, p. 245-255, 2014.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, Oxford, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.
- PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, Essex, v. 102, n. 1, p. 17-25, 2011.
- RAVELONANDRO, P. H.; RATIANARIVO, D. H.; JOANNIS-CASSAN, C.; ISAMBERT, A.; RAHERIMANDIMBY, M. Improvement of the growth of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* from Toliara (Madagascar): effect of agitation, salinity and CO₂ addition. *Food and Bioprocess Processing*, London, v. 89, n. 3, p. 206-216, 2011.
- SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; SYDNEY, E. B.; LE BIHAN, Y.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, Nashville, v. 37, n. 8, p. 6473-6490, 2012.
- SHEN, Y.; YUAN, W.; PEI, Z.; MAO, E. Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 160, p. 1674-1684, 2010.
- SHI, X. M.; ZHANG, X. W.; CHEN, F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*, Atlanta, v. 27, p. 312-318, 2000.
- SINGH, M.; REYNOLDS, D. L.; DAS, K. C. Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, Essex, v. 102, p. 841-848, 2011.
- TIAN-YUAN, Z.; YIN-HU, W.; LIN-LAN, Z.; XIAO-XIONG, W.; HONG-YING, H. Screening heterotrophic microalgal strains by using the Biolog method for biofuel production from organic wastewater. *Algal Research*, Oxford, v. 6, Part B, n. 1, p. 175-179, 2014.

- WANG, J.; YANG, H.; WANG, F. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Heidelberg, v. 172, n. 7, p. 3307-3329, 2014.
- WEI, A.; ZHANG, X.; WEI, D.; CHEN, G.; WU, Q.; YANG, S. T. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Berkley, v. 36, n. 11, p. 1383-1389, 2009.
- WENSEL, P.; HELMS, G.; HISCOX, B.; DAVIS, W. C.; KIRCHHOFF, H.; BULE, M.; YU, L.; CHEN, S. Isolation, characterization, and validation of oleaginous, multi-trophic, and haloalkaline-tolerant microalgae for two-stage cultivation. *Algal Research*, Oxford, v. 4, n. 0, p. 2-11, 2014.
- WU, Q.; XIONG, W. A method for producing biodiesel by two-stage culture of *Chlorella* from autotrophy to heterotrophy. T. University. United States Patent EP 2292782 A1, 2011.
- WU, Q.; XIONG, X. R. Method for producing biodiesel from alga. T. University. United States patent US20090298159 A1, 2008.
- WU, Z.; SHI, X. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. *Letters in Applied Microbiology*, Cardiff, v. 44, p. 13-18, 2007.
- XIONG, W.; LI, X.; XIANG, J.; WU, Q. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 78, n. 1, p. 29-36, 2008.
- XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, Valparaíso, v. 126, n. 2, p. 499-507, 2006.
- YANG, S.; LIU, G.; MENG, Y.; WANG, P.; ZHOU, S.; SHANG, H. Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource technology*, Essex, v. 172, n. 8, p. 180-185, 2014.
- YEH, K.-L.; CHANG, J.-S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, Essex, v. 105, n. 1, p. 120-127, 2012.
- YEH, K.-L.; CHEN, C.-Y.; CHANG, J.-S. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, Filadelfia, v. 64, n. 1, p. 1-7, 2012.
- ZHENG, Y.; YU, X.; LI, T.; XIONG, X.; CHEN, S. Induction of D-xylose uptake and expression of NAD(P)H-linked xylose reductase and NADP⁺-linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous microalga *Chlorella sorokiana*. *Biotechnology for Biofuels*, London, v. 7, n. 1, p. 125-133, 2014.
- ZHOU, W.; MIN, M.; LI, Y.; HU, B.; MA, X.; CHENG, Y.; LIU, Y.; CHEN, P.; RUAN, R. A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation. *Bioresource Technology*, Essex, v. 110, n. 1, p. 448-455, 2012.

Recebido em: 30 abr. 2014
Aceito em: 26 jan. 2015.

