

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS**  
**QUÍMICA E BIOLÓGICA**

**HUGO SANTANA**

Potencial biotecnológico de microalgas verdes (Chlorophyta)  
cultiváveis em sistemas a base de vinhaça e gás carbônico

Brasília, DF  
2020

**HUGO SANTANA**

**Potencial biotecnológico de microalgas verdes (Chlorophyta)  
cultiváveis em sistemas a base de vinhaça e gás carbônico**

Tese de doutoramento apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do grau de doutor em Tecnologias Química e Biológica.

Orientador: Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo  
Brasil  
Universidade de Brasília  
EMBRAPA Sede

Co-orientador: Dra. Leticia Jungmann Cançado  
EMBRAPA Agroenergia

Brasília, DF  
2020

## Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese do (a) aluno (a) **Hugo Santana**, matrícula nº **16/0098734**, intitulada ***“Potencial biotecnológico de microalgas verdes (Chlorophyta) cultiváveis em sistemas a base de vinhaça e gás carbônico”***, apresentada no (a) Sala Cana de Açúcar / Embrapa da Universidade de Brasília (UnB) em 28 de fevereiro de 2020.

Prof. Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil  
Presidente de Banca (Embrapa Agroenergia)

Dr. João Ricardo Moreira de Almeida  
Membro Titular (Embrapa Agroenergia)

Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira  
Membro Titular (Embrapa Agroenergia)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Itânia Pinheiro Soares  
Membro Titular (Embrapa)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Simone Mendonça  
Membro Suplente (Embrapa)

Em 28 de fevereiro de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de Brasília e todos os professores com os quais pude aprender durante todos esses anos, sendo de grande importância para a minha formação.

À Embrapa Agroenergia por ter cedido a sua estrutura e recursos necessários para a execução deste trabalho. Foi uma oportunidade única.

À CAPES e à professora Raquel Minardi pela bolsa concedida durante o período do doutorado.

Aos membros da banca por terem aceitado avaliar este trabalho. A contribuição dada ao trabalho por meio de sugestões e de abertura de horizontes é imensurável.

Agradeço à minha família por todo o apoio dado durante este período, mesmo a distância.

Aos amigos que fiz na Embrapa e que me auxiliaram diretamente ou não, com boas conversas durante aquela pausa para o café. Especialmente Samira, Carol Assunção, Patrícia, Elias, Vivianny, Aparecido e Tallyta.

Ao Félix e à Dona Zélia, por todo o apoio dado nos momentos de dificuldade.

À Letícia, minha co-orientadora, que assumiu a supervisão do trabalho no meio do caminho. Agradeço pelo empenho e pela paciência durante esse período. Foi uma experiência muito enriquecedora.

Ao Bruno, que me concedeu mais essa oportunidade de continuar sob sua orientação. Mesmo a distância, a sua colaboração foi importantíssima para que eu pudesse chegar ao final de mais etapa.

## RESUMO

Microalgas são cultivadas há vários anos para produção ácidos graxos poli-insaturados e carotenoides, utilizados como suplementos na alimentação humana e animal, assim como intermediários para indústria farmacêutica e cosmética. Não obstante, há um considerável e crescente interesse na utilização de microalgas como potenciais fontes para biocombustíveis, uma vez que estas podem acumular grandes quantidades de óleos e carboidratos. O principal desafio para a produção de microalgas em larga escala, no entanto, ainda é determinar sistemas de cultivo capazes de competir economicamente com combustíveis fósseis ou biocombustíveis tradicionais. O etanol de cana é produzido em larga escala no Brasil gerando grandes quantidades de resíduos, como vinhaça e CO<sub>2</sub>, que poderiam ser potencialmente aproveitados para a produção de biomassa algal de forma custo-eficiente em uma estratégia de biorrefinaria. Neste estudo, as cepas de microalgas verdes nativas *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40, selecionadas para crescimento em vinhaça e CO<sub>2</sub> foram avaliadas quanto ao seu potencial de produção de ácidos graxos, carboidratos e energia. Os dados obtidos mostraram resultados promissores para a utilização da biomassa gerada por esses microrganismos como matéria-prima para biodiesel e bioetanol. Adicionalmente, a avaliação do cultivo em meio a base de vinhaça de outra cepa nativa, *Chlorella sorokiniana*|LBA#39, revelou uma produtividade média de biomassa 25% superior àquela obtida para *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40. Subsequentemente, a cepa *C. sorokiniana*|LBA#39 foi submetida a testes de transformação genética por eletroporação utilizando a proteína fluorescente verde (*eGFP*) como gene

repórter. Objetivou-se desenvolver um método eficiente de transformação desta microalga que permitisse seu futuro melhoramento genético por técnicas de biotecnologia avançada, bem como seu uso como plataforma de expressão de proteínas heterólogas. Embora tenham sido obtidos eventos transformantes, estes apresentaram-se instáveis sugerindo que a expressão do transgene foi obtida de forma apenas transiente. Finalmente, de modo a garantir a preservação a longo prazo destes recursos genéticos promissores, foram padronizados protocolos de criopreservação específicos utilizando como agentes crioprotetores glicerol, polietilenoglicol e dimetilsulfóxido em diferentes concentrações. Em conclusão, este estudo amplia o conhecimento sobre o potencial biotecnológico de microalgas verdes nativas e destaca o uso destas para a produção de biomassa com valor agregado de forma integrada à cadeia sucro-energética.

**Palavras-chave:** *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Micractinium*, biocombustíveis, biorrefinaria, transformação genética, criopreservação

## ABSTRACT

Microalgae are cultivated for many years in order to produce polyunsaturated fatty acids and carotenoids. These molecules are used as supplements in human and animal diet, as well as intermediates in pharmaceutical and cosmetic industries. Regardless, there is a considerable and growing interest in the use of microalgae as potential source for biofuels, since these microorganisms can accumulate large amounts of oils and carbohydrates. The main challenge for production of microalgae in large scale, however, is to establish cultivation systems capable of compete economically with fossil fuels or traditional biofuels. In Brazil, the large-scale production of ethanol from sugarcane generates high amounts of residues, such as vinasse and CO<sub>2</sub>. These residues could be potentially used for the production of algal biomass in a cost-effective manner, adopting a biorefinery strategy. In this study, the native green microalgae strains *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 and *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40, selected for growth in vinasse and CO<sub>2</sub> were evaluated for its production potential of fatty acids, carbohydrates and energy. The obtained data showed promising results for the use of the biomass obtained with the cultivation of these microorganisms as feedstock for biodiesel and bioethanol production. In addition, the evaluation of the cultivation in vinasse-based medium of another native strain, *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39, showed an average biomass productivity 25% higher than that observed for *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 and *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40. Subsequently, the strain *C. sorokiniana*|LBA#39 was submitted to genetic transformation tests by electroporation using the green fluorescent protein (eGFP) as reporter gene. The objective was to develop an efficient transformation method for this strain to allow

its genetical enhancement using advanced biotechnology. Also, to allow its use as a platform for heterologous protein expression. Despite the observation of transformation events, they were unstable, suggesting that the expression of the transgene was obtained in a transient state. Finally, as strategy to guarantee the long-term preservation of these promising genetic resources, specific cryopreservation protocols were standardized using distinct concentrations of the cryoprotectants agents glycerol, polyethylene glycol and dimethyl sulfoxide. In conclusion, this study expands the knowledge about the biotechnological potential of native green microalgae and highlight its use for value-added biomass production integrated to the sucroenergetic industrial chain.

**Keywords:** Chlorella, Chlamydomonas, Micractinium, biofuels, biorefinery, genetic transformation, cryopreservation

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Mercado para produtos derivados de algas.	12
<b>Figura 2.</b>	Sistema hipotético de biorrefinaria integrando a indústria sucroalcooleira e a produção de microalgas	27
<b>Figura 3.</b>	Representação morfológica da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> .	31
<b>Figura 4.</b>	Mapa do plasmídeo pChlamy_4 - eGFP, utilizado para a transformação da cepa <i>Chlorella sorokiniana</i>  LBA#39.	53
<b>Figura 5.</b>	Esquema do cassete de expressão do vetor pChlamy_4-eGFP.	54
<b>Figura 6.</b>	Representação do processo de seleção de cepas da CMMAABio com potencial de crescimento em vinhaça para a produção de bioprodutos.	58
<b>Figura 7.</b>	Representação do planejamento adotado para o cultivo de microalgas em vinhaça com o uso de fotobiorreatores de placa plana e as atividades realizadas com durante e após o cultivo.	60
<b>Figura 8.</b>	Perfil de carboidratos da biomassa obtida com o cultivo de microalgas em fotobiorreator de placa plana.	65
<b>Figura 9.</b>	Representação simplificada dos procedimentos adotados por FERNANDES (2017) para o estabelecimento de protocolos de criopreservação para cepas de microalgas da CMMAABio.	76
<b>Figura 10.</b>	Relação entre filogenia da cepa, morfologia e o método ótimo de criopreservação.	78
<b>Figura 11.</b>	Planejamento adotado para a determinação do tipo de metabolismo realizado pela microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> Embrapa LBA#39.	81
<b>Figura 12.</b>	Rendimento de biomassa das cepas de microalga cultivadas em vinhaça diluída.	82
<b>Figura 13.</b>	Determinação do tipo de metabolismo da cepa <i>Chlorella sorokiniana</i>  LBA39 em vinhaça <i>in natura</i> .	84

<b>Figura 14.</b>	Curvas de crescimento da cepa <i>Chlorella sorokiniana</i>  LBA#39 em meio BG11.	87
<b>Figura 15.</b>	Determinação da concentração mínima inibitória de crescimento da cepa <i>Chlorella sorokiniana</i> Embrapa LBA39 em meio BG11 na presença dos antibióticos Zeocina, Higromicina, G418 e Kanamicina.	89
<b>Figura 16.</b>	Determinação da concentração mínima inibitória de crescimento da cepa <i>Chlorella sorokiniana</i> Embrapa LBA#39 em meio ágar-BG11 na presença do antibiótico Zeocina.	90
<b>Figura 17.</b>	Resultado da dupla digestão dos vetores com as enzimas BamHI e EcoRI.	94
<b>Figura 18.</b>	Resultado da PCR das colônias de <i>E. coli</i> EPI300 transformadas com a construção pClamy_4 – eGFP.	96
<b>Figura 19.</b>	Planejamento adotado para determinação da quantidade de plasmídio mais adequada para a obtenção de transformantes de <i>Chlorella sorokiniana</i> Embrapa LBA#39 por eletroporação.	98
<b>Figura 20.</b>	Número de unidades formadoras de colônias obtidas após a eletroporação em diferentes condições.	99
<b>Figura 21.</b>	Planejamento adotado para determinação da concentração de Zeocina mais adequada para a obtenção de transformantes de <i>Chlorella sorokiniana</i> Embrapa LBA#39 por eletroporação.	100
<b>Figura 22.</b>	Representação de colônias da cepa <i>Chlorella sorokiniana</i> Embrapa LBA#39 possivelmente transformadas com o vetor pChlamy_4-eGFP.	102
<b>Figura 23.</b>	Planejamento adotado para determinação da melhor fase de crescimento para realização da eletroporação da <i>Chlorella sorokiniana</i> Embrapa LBA#39.	104
<b>Figura 24.</b>	Número de colônias da cepa <i>Chlorella sorokiniana</i>  LBA#39 obtidas após a eletroporação com o plasmídio pChlamy_4-eGFP sob diferentes parâmetros	105

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Comparação do percentual de acumulação de óleo entre diferentes espécies de microalgas.	14
<b>Tabela 2.</b>	Potencial de produção de bioetanol a partir da biomassa obtida de diferentes espécies de microalgas.	17
<b>Tabela 3.</b>	Produtividade de biomassa e carboidratos em diferentes espécies de microalgas.	19
<b>Tabela 4.</b>	Métodos utilizados para a transformação genética de <i>Chlorella</i> spp.	34
<b>Tabela 5.</b>	Produtividade e estimativa anual de produção de bioprodutos derivados de microalgas cultivadas em fotobiorreatores de placa plana.	62
<b>Tabela 6.</b>	Perfil de FAME (Biodiesel) das cepas <i>Micractinium</i> sp. Embrapa LBA#32 e <i>Chlamydomonas biconvexa</i> Embrapa LBA#40.	68
<b>Tabela 7.</b>	Características dos ácidos graxos que compõem a biomassa das cepas <i>Micractinium</i> sp. Embrapa LBA#32 e <i>Chlamydomonas biconvexa</i> Embrapa LBA#40 cultivadas em diferentes meios de cultivo.	70
<b>Tabela 8.</b>	Identificação molecular das cepas estudadas para determinação da condição ótima de criopreservação, incluindo o percentual de identidade, número de acesso e o nome de identificação da cepa com base no marcador nuITS2.	75
<b>Tabela 9.</b>	Determinação da concentração mínima inibitória de crescimento da cepa <i>Chlorella sorokiniana</i> Embrapa LBA39 em meio ágar-BG11 na presença do antibióticos Zeocina.	92

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

$\beta$	Beta
$\omega$ -3	Ômega 3
$\omega$ -6	Ômega 6
$\mu$ F	Microfarad
$\mu$ g.mL <sup>-1</sup>	Micrograma por mililitro
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrômetro
$\mu$ Em <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	Microeinsteins por segundo por metro quadrado
°C	Graus Celsius
ACP	Agente crioprotetor
ANOVA	Análise de variância
<i>ble</i>	Gene de resistência à bleomicina e Zeocina
C5	Açúcar com cinco carbonos
C6	Açúcar com seis carbonos
Ca	Cálcio
CAT	Cloranfenicol acetil transferase
Células.mL <sup>-1</sup>	Células por mililitro
CMMAABio	Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias
Cl	Cloro
CN	Número de Cetano
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleíco

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eGFP	Proteína verde fluorescente otimizada
em	Emissão de fluroescência
em <sub>max</sub>	Máxima emissão de fluorescência
EUA	Estados Unidos da América
ex	Excitação da molécula
ex <sub>max</sub>	Excitação máxima da molécula
g	Gramma
g.L <sup>-1</sup>	Gramma por litro
g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	Gramma por litro por dia
GFP	Proteína verde fluorescente
GUS	β-glucuronidase
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
hGH	Hormônio de crescimento humano
K	Potássio
kV	Quilovolts
L.h <sup>-1</sup>	Litros por hora
Lfb-N	Lobo N da lactoferrina bovina
M	Molar
merA	Mercúrio redutase
mg	Miligrama
mM	Milimolar
ms	Milissegundo
MSR	Metodologia de superfície de resposta
N	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio

NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetro
nr	Nitrato redutase
P	Fósforo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pezT	Toxina PezT de <i>Streptococcus mitis</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
ptmE	Glucosamina 1-P guanilil transferase
RCF	Força centrífuga relativa
Rpm	Rotação por minuto
SCP	Proteína unicelular
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
STE	Cloreto de Sódio, Tris-Cl e EDTA
TE	Tris, EDTA
UFC	Unidade Formadora de Colônia
V	Volt
vgb	Globina de <i>Vitreoscilla</i> sp.
yoeB	Toxina yoeB de <i>Escherichia coli</i>

# SUMÁRIO

## 1. Introdução

1.1.	Microalgas – Visão geral	9
1.2.	Potencial biotecnológico e aplicação comercial	10
1.2.1.	Biodiesel	13
1.2.2.	Bioetanol	16
1.2.3.	Uso de microalgas em biorrefinarias	22
1.3.	Produção de proteínas recombinantes em modelo microalgal	28
1.3.1.	Microalgas utilizadas para a produção de proteínas heterólogas	30

## 2. Objetivos

2.1.	Objetivo geral	37
2.1.1.	Objetivos específicos	37

## 3. Materiais e métodos

3.1.	Cepas	38
3.1.1.	Origem e identificação	38
3.1.2.	Criopreservação e árvore filogenética	39
3.2.	Condições de cultivo	39
3.2.1.	Preparo do inóculo	39
3.2.2.	Preparo de meios a base de vinhaça	40
3.2.3.	Determinação do rendimento de biomassa em vinhaça	41
3.2.4.	Determinação do tipo de metabolismo da microalga em vinhaça	41
3.2.5.	Determinação dos níveis de açúcares após o cultivo de microalgas em vinhaça	42
3.2.6.	Determinação do peso seco da biomassa	42

3.3.	Caracterização da biomassa microalgal cultivada em diferentes formulações de meio a base de vinhaça	43
3.3.1.	Teor e perfil de ácidos graxos	43
3.3.2.	Teor e perfil de carboidratos	44
3.3.3.	Poder Calorífico	44
3.4.	Determinação do perfil de crescimento em meio BG11	44
3.5.	Avaliação da resistência a antibióticos	45
3.6.	Transformação com pChlamy_4-eGFP	46
3.6.1.	Preparo da construção gênica e transformação de E. coli EPI300	46
3.6.2.	Extração de DNA plasmidiano em pequena escala (Miniprep)	48
3.6.3.	Extração de DNA plasmidiano em grande escala (Maxiprep)	49
3.6.4.	PCR e eletroforese	51
3.6.5.	Eletroporação da microalga C. sorokiniana Embrapa LBA#39	55
3.6.6.	PCR de colônias	56
3.6.7.	Microscopia de fluorescência	56
<b>4. Resultados e discussão</b>		
4.1.	Caracterização da composição da biomassa algal produzida em sistemas a base de vinhaça e gás carbônico	57
4.2.	Criopreservação de microalgas cultiváveis em sistemas a base de vinhaça e gás carbônico	73
4.3.	Transformação genética de microalgas verdes cultiváveis em vinhaça	79
<b>5. Conclusões</b>		108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		110
ANEXOS		121

## 1. Introdução

### 1.1. Microalgas – visão geral

Microalgas é um termo utilizado para a designação de um grupo polifilético de microrganismos eucarióticos fotossintetizantes, unicelulares ou com arranjo em colônias simples. Não obstante, as cianobactérias, que são microrganismos procarióticos fotossintetizantes, também são frequentemente incluídas nesta classificação (MATA, 2010; GONG e JIANG, 2011; LARKUM, 2012). Devido a sua diversidade genética e plasticidade adaptativa, estes organismos são encontrados em teoricamente todos os ecossistemas úmidos, habitando corpos aquosos dulcícolas ou salinos. Existem cerca de 8 mil espécies de microalgas descritas, distribuídas por todos os ecossistemas terrestres. No entanto, há a estimativa de que existam mais de 5 mil espécies ainda sem descrição, especialmente em áreas tropicais e subtropicais (HADI, 2016). O filo Chlorophyta, é constituído por espécies de algas verdes unicelulares, multicelulares, coloniais, filamentosas ou parenquimatosas que possuem clorofila *a* e *b*, além de pigmentos acessórios do tipo Xantofilas (principalmente luteína) e carotenos e parede celular celulósica (HADI, 2016).

As microalgas, em especial as clorófitas, produzem uma variedade de biomoléculas com potencial aplicação industrial, como aminoácidos, carboidratos, pigmentos e lipídios, os quais variam de espécie para espécie, tanto em teor quanto em características (SPOLAORE, 2006). Espécies como *Haematococcus pluvialis* são boas produtoras de astaxantina (1,5 - 3% do peso seco), um carotenoide de coloração avermelhada que possui alto valor agregado e apresenta diversas atividades terapêuticas. Por outro lado, espécies do gênero *Chlorella* acumulam um teor elevado de proteínas, o qual pode chegar até a 70%

do seu peso seco, sendo utilizadas para nutrição humana e animal (MATA, 2010).

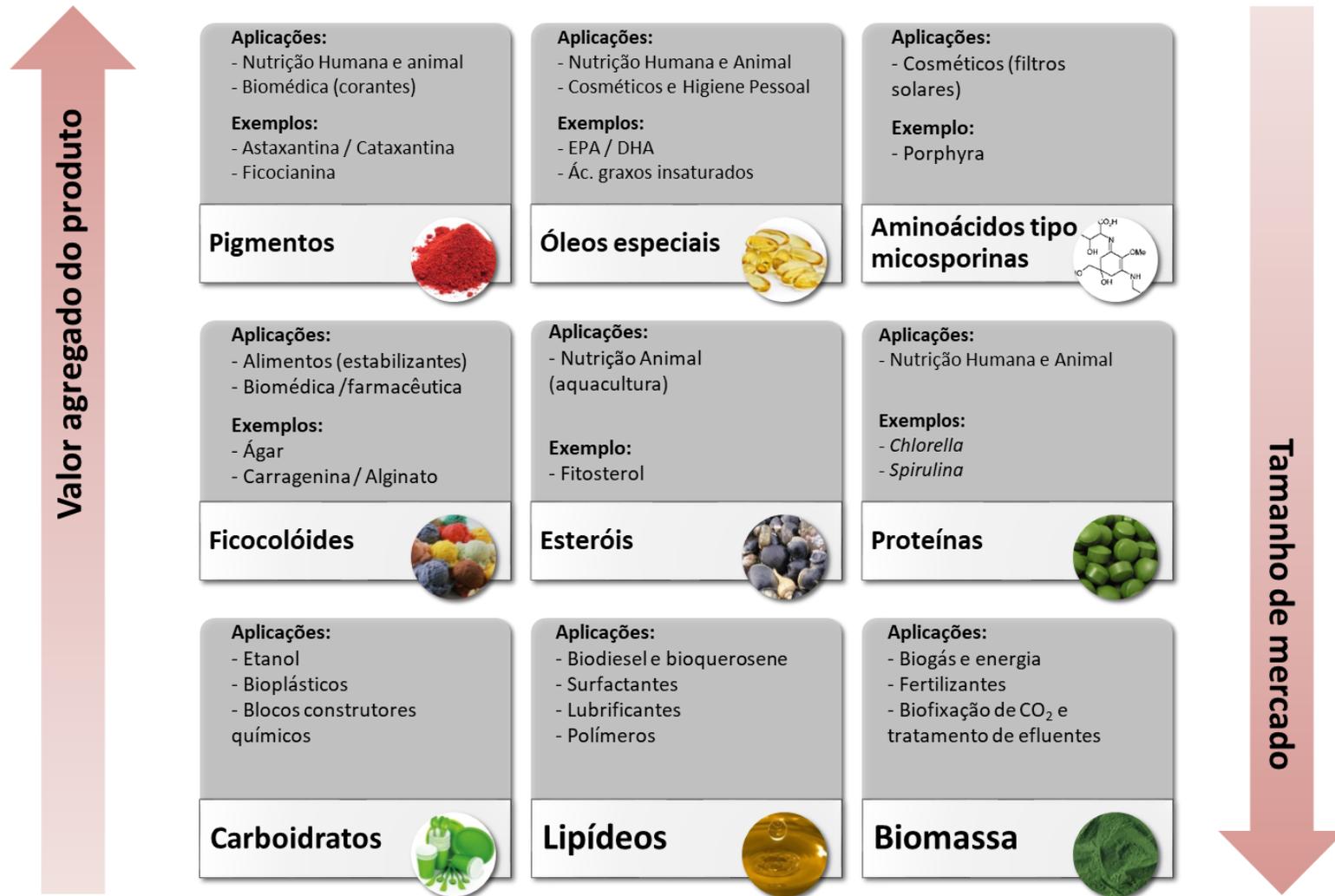
De maneira geral, as microalgas verdes apresentam requerimentos nutricionais relativamente simples para o seu crescimento, sendo eles a presença de fontes de nitrogênio, fósforo e potássio, uma fonte de carbono, que pode ser o gás carbônico (CO<sub>2</sub>), no caso de espécies fotoautotróficas, ou uma fonte de carbono orgânica (ex. glicose), para as espécies que apresentam metabolismo mixotrófico ou fotoheterotrófico, e luz (FENTON e Ó HUALLACHÁIN, 2012). Esses requisitos nutricionais para crescimento podem ser supridos de diversas maneiras, dentre as quais pode-se citar o uso de fertilizantes (fontes de N, P e K) ou mesmo águas residuais (efluentes agroindustriais, esgoto) (CAI, 2013).

## **1.2. Potencial biotecnológico e aplicação comercial**

As microalgas apresentam diversas vantagens potenciais em relação a matérias-primas tradicionais, como: (a) a alta taxa de crescimento e produtividade por área; (b) a demanda reduzida por água potável quando comparada aos cultivos agrícolas tradicionais; (c) a não dependência de áreas férteis de solo, o que reduz a competição com culturas destinadas a produção de alimentos; (d) a capacidade de crescer em diversas fontes aquosas, como água do mar e águas residuais. Isto permite associar o cultivo de microalgas a outros sistemas de produção industrial já existentes agregando valor a efluentes e resíduos; e (e) podem ser fontes de biomoléculas que apresentam alto valor agregado (LI, 2008; PARMAR, 2011; GHASEMI, 2012). Apesar disso, diversos desafios técnicos associados ao escalonamento da produção, controle de

predadores/competidores, custos do meio de cultivo e colheita da biomassa algal ainda precisam ser superados para a produção de microalgas em larga-escala.

Assim, atualmente, a produção mundial de microalgas ainda é pequena, sendo utilizada pela indústria principalmente para a produção de cosméticos e produtos para higiene pessoal e para a nutrição humana e animal. Predomina a produção em pequena e média escala em países como China, Índia, Japão, Austrália e EUA. As principais espécies cultivadas são *Chlorella vulgaris* e *Arthrospira* (Spirulina) *platensis*, utilizadas para alimentação humana, além de *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, utilizadas para produção de carotenóides de alto valor, respectivamente,  $\beta$ -caroteno e astaxantina (SPOLAORE et al., 2006; BENEMANN, 2011). A espécie *Cryptothecodinium cohnii* e os gêneros *Shizochytrium* e *Ulchennia* são utilizados, em menor escala, para produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), por exemplo, do tipo ômega-3 ( $\omega$ -3) (SPOLAORE et al., 2006). Não obstante, a expectativa é que os avanços tecnológicos na área de produção massal de algas permitam o aumento da produção no futuro próximo, permitindo acesso a outros mercados de maior tamanho e menor valor agregado, como a indústria de químicos, materiais e biocombustíveis (Figura 1) (BRASIL e GARCIA, 2016).



**Figura 1** - Mercado para produtos derivados de algas (Brasil & Garcia, 2016).

### 1.2.1. Biodiesel

O diesel é o principal combustível derivado de petróleo utilizado no mundo. Segundo a Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP), o consumo desse combustível foi de aproximadamente 4,61 bilhões de litros por dia no ano de 2018, representando 29,38 % da demanda de combustíveis baseados em petróleo (OPEP, 2019). Projeções indicam que para o ano de 2035 a demanda cresça para 4,96 bilhões de litros por dia, representando 28,39% da produção total de combustíveis fósseis na matriz energética mundial (OPEP, 2019). O uso do biodiesel tem se mostrado uma alternativa sustentável ao diesel fóssil, contribuindo para reduzir as emissões de gases de efeito estufa relacionados ao seu uso. O Biodiesel é utilizado principalmente no Brasil, Europa e Estados Unidos, mas sua demanda potencial ultrapassa a disponibilidade atual de óleos vegetais e gordura animal (MATA, 2010; GHASEMI, 2012).

Neste contexto, as microalgas têm se apresentado como uma alternativa promissora para que a produção de biodiesel seja viável a longo prazo. Algumas espécies como *Nannochloropsis* sp., *Botryococcus braunii*, *Schizochytrium* sp. conseguem acumular lipídios de reserva em uma proporção que pode corresponder a cerca de 70% da massa seca total da biomassa (Tabela 1). Este valor é consideravelmente superior ao teor de lipídios que pode ser obtido pelas outras culturas oleaginosas atualmente disponíveis, como a soja e a palma de óleo (Tabela 1).

**Tabela 1** - Comparação do percentual de acúmulo de óleo entre diferentes espécies de microalgas. Adaptado de (CHISTI, 2007).

<b>Microalga</b>	<b>Teor de óleo (% peso seco)</b>
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47
<i>Scenedesmus obliquus</i>	35-55
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31–68
<i>Chlorella</i> sp.	28–32
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Isochrysis</i> sp.	25–33
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Nannochloris</i> sp.	20–35
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16-40
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37
<i>Tetraselmis sueica</i>	15–23

No entanto, não apenas a produtividade de óleo da espécie selecionada importa. O perfil de ácidos graxos produzidos pela microalga apresenta papel fundamental na qualidade do biodiesel produzido ao final do processo, uma vez que o poder calorífico deste combustível é dependente da sua composição (AMARO, 2011). Em geral, o biodiesel é produzido a partir da transesterificação de ácidos graxos contendo entre 12 e 22 átomos de carbono, podendo ser ou não saturados (VASUDEVAN e FU, 2010). Diferentes espécies de microalgas são capazes de produzir ácidos graxos que apresentam essas características, no entanto o perfil geral dos ácidos graxos produzidos irá depender das condições de cultivo, da composição do meio, assim como a fase de crescimento da microalga cultivada (AMARO, 2011). Sendo assim, se faz necessária a caracterização do ciclo de crescimento, do requerimento nutricional e do perfil de ácidos graxos das microalgas utilizadas para a produção de óleo, de maneira que a otimização do processo seja possível, garantindo uma elevada produtividade de lipídios aplicáveis à produção de biodiesel.

### 1.2.2. Bioetanol

O bioetanol é um combustível gerado a partir de biomassa, o que inclui plantas e microrganismos, e que, comparado a combustíveis fósseis, emite menos ozônio, benzeno, dióxido de carbono e outros poluentes (LEE, 2011). Esse combustível é derivado principalmente de culturas ricas em sacarose e amido, como a cana-de-açúcar e o milho, respectivamente. No entanto, a utilização de culturas alimentares para a produção de bioetanol pode apresentar algumas limitações, assim como o biodiesel, os quais incluem a necessidade de grandes áreas agricultáveis e grande volume de água (HO, 2013).

Apesar da maior parte dos estudos sobre microalgas focar na produção de biodiesel, algumas espécies de microalgas apresentam alto teor de carboidratos fermentescíveis. Adicionalmente, as características de alta velocidade de crescimento, ausência de lignina e possibilidade de aumento de produtividade por manipulação genética, tornam esse grupo de microrganismos potenciais fontes de biomassa para a produção de bioetanol (HO, 2013; SIMAS-RODRIGUES, 2015). A tabela 2 sumariza o potencial de produção de bioetanol de algumas espécies de microalgas. Espécies como *Chlamydomonas reinhardtii* e *Chlorella vulgaris* são ricas em amido e glicose, carboidratos facilmente fermentescíveis utilizados em processos fermentativos bem estabelecidos, sendo, portanto, candidatas promissoras para a produção de etanol.

**Tabela 2** - Potencial de produção de bioetanol a partir da biomassa obtida de diferentes espécies de microalgas. Modificado de SIMAS-RODRIGUES (2015).

<b>Espécie/Cepa</b>	<b>Teor total de carboidratos</b>	<b>Teor específico de carboidratos</b>	<b>Rendimento de bioetanol</b>
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	59,7%	Amido 43,6% Glicose 44,7%	235 mg etanol.g <sup>-1</sup> de biomassa
<i>Scenedesmus obliquus</i> CNW-W	51,8%	Glicose 41,6%	99,8% (rendimento teórico)
<i>Chlorella vulgaris</i> FSP-E	50,39%	Amido 31,25% Glicose 46,92%	92,3% (rendimento teórico)
<i>Chlorococcum infusionum</i>	32,52%	Amido 11,32% Glicose 15,22%	26,1%
<i>Chlorococcum humicola</i>	32,52%	Amido 11,32% Glicose 15,22%	52% (g etanol. g <sup>-1</sup> de biomassa)
<i>Tetraselmis subcordiformis</i>	-	Amido 62,1%	-

No entanto, não apenas o teor de carboidratos da biomassa microalgal é relevante para a produção de etanol. A produtividade também é de fundamental importância para que a utilização da biomassa microalgal seja viável. Na tabela 3 é possível verificar que diferentes cepas de microalgas apresentam uma variação considerável em termos de produtividade. A exemplo, a cepa *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11B apesar de apresentar um teor de carboidratos de 55%, apresenta baixa produtividade quando comparada à cepa *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90, que produz  $0,304 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  de amido, o que influencia diretamente o potencial de produção do bioetanol a partir desta biomassa. Desta maneira, a utilização de uma cepa que associe alta produtividade e alto teor de carboidratos é essencial para a viabilização da utilização da biomassa microalgal com a finalidade de produção de etanol.

**Tabela 3** – Produtividade de biomassa e carboidratos em diferentes espécies de microalgas. Adaptado de CHEN (2013).

<b>Espécie/Cepa</b>	<b>Tempo de cultivo (dias)</b>	<b>Produção de biomassa (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Produtividade de biomassa (g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Produtividade de carboidratos (g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11B	14	0,52	0,037	0,021
<i>Chlorella vulgaris</i> P12	N.D.	N.D.	0,485	0,199 (amido)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	4	2,40	0,507	0,304
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3	1,45	0,484	0,257
<i>Tetraselmis subcordiformis</i>	N.D.	N.D.	N.D.	0,255 (amido)
<i>Scenedesmus obliquus</i> CNW-N	5	4,03	0,821	0,383
<i>Chlorella vulgaris</i>	6	1,70	0,254	0,112
<i>Chlorella vulgaris</i> FSP-E	5,25	7,30	1,363	0,687

N.D. – Não disponível

Para a produção de bioetanol ocorrer a partir da utilização de biomassa microalgal, se faz necessária a quebra do carboidrato algal por sacarificação ou hidrólise, processos que objetivam liberar os monômeros que constituem os carboidratos presentes na biomassa. Este processo pode ser realizado por via química ou enzimática (CHEN, 2013). Para a via química, normalmente é utilizada a hidrólise ácida. Este processo apresenta a vantagem de ser rápido e mais barato que a via enzimática, além de apresentar uma elevada taxa de recuperação dos açúcares, porém apresenta um maior custo relacionado ao tratamento dos resíduos gerados e há a geração de coprodutos que podem inibir o processo fermentativo subsequente (SIMAS-RODRIGUES, 2015). Na via enzimática, são utilizadas enzimas específicas para a liberação dos monômeros de carboidratos. Sendo assim, o coquetel enzimático utilizado deve ser adequado para a composição da biomassa a ser processada. Esta característica associada quantidade de enzima necessária eleva o custo do processo, apesar de utilizar menos energia que o processo químico (CHEN, 2013; SIMAS-RODRIGUES, 2015).

A etapa seguinte do processo envolve o uso do processo fermentativo. Neste processo são utilizadas bactérias, fungos ou leveduras etanogênicas podem ser utilizados, resultando na produção do bioetanol. Dentre os organismos utilizados, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é considerada a mais eficiente para a realização desta bioconversão, sendo capaz de produzir etanol a partir de diversos açúcares (MARKOU, 2012). Uma alternativa para a simplificação do processo é a utilização de uma via fermentativa que envolve o uso da própria biomassa microalgal para o processo de sacarificação e de fermentação. Este processo pode ser alcançado de duas maneiras, sendo elas

através do uso das vias Embden-Meyerhof-Parnas (glicólise) e pentose fosfato, que é realizada em condições anaeróbicas e no escuro (SIMAS-RODRIGUES, 2015). Uma outra estratégia envolve a utilização de microrganismos geneticamente modificados, nos quais são inseridas vias que podem redirecionar o CO<sub>2</sub> fixado para a síntese do etanol (RAZEGHIFARD, 2013).

### **1.2.3. Uso de microalgas em biorrefinarias**

O principal desafio para a produção comercial de microalgas ainda é determinar sistemas práticos de cultivo em larga escala e métodos de produção de biocombustíveis a partir da biomassa algal, capazes de competir economicamente com combustíveis fósseis ou biocombustíveis tradicionais. Neste contexto, o fato de as microalgas gerarem uma grande diversidade de biomoléculas com valor agregado, tais como lipídios, carboidratos, proteínas e pigmentos, oferece a oportunidade de utilização da biomassa completa destes microrganismos para geração concomitante de vários produtos (Figura 1) em uma abordagem de biorrefinaria surge como uma potencial alternativa para o alcance da viabilidade econômica a produção (STEPHENS, 2010; ADARMEVEGA, 2012; YEN, 2013). Adicionalmente, a utilização de águas residuais como fontes de nutrientes pode contribuir com a redução dos custos de produção desses bioprodutos (RAZZAK, 2013).

No Brasil, um dos principais resíduos gerados pela agroindústria é a vinhaça. A vinhaça é um resíduo líquido proveniente da destilação de uma solução alcoólica chamada vinho, obtida do processo de fermentação para a obtenção do etanol. Para cada litro de etanol produzido são gerados entre 10 e 15 litros de vinhaça, o que equivale a uma produção de mais de 300 bilhões de litros por ano no Brasil. Atualmente, a vinhaça vem sendo utilizada principalmente na fertirrigação de canaviais. Porém, o uso de grandes quantidades deste resíduo nos solos tem gerado consequências como a lixiviação de elementos químicos e carreamento para águas subterrâneas e poluição de aquíferos (BARBOSA e WIJFFELS, 2016). Portanto, o aproveitamento da vinhaça como fonte de nutrientes para o crescimento de

microalgas seria uma alternativa à sua aplicação no solo, além de agregar valor a este resíduo. De fato, estudos da composição química da vinhaça reforçam o potencial de utilização deste resíduo como base para o cultivo de microalgas (CENCIANI, 2011; OLIVEIRA, 2012). Embora a composição da vinhaça possa variar de acordo com o processo de fermentação, esta sempre apresenta grandes quantidades de água, matéria orgânica e minerais, majoritariamente K, N e sulfatos, seguidos de menores quantidades de P, Ca e Cl (BARROCAL, 2010; CENCIANI, 2011). Além disso, foi demonstrado que é possível obter alto rendimento de biomassa de cianobactérias do gênero *Arthrospira* (*Spirulina*) em cultivos suplementados com vinhaça derivada da produção de etanol a partir de cana-de-açúcar ou beterraba (ANDRADE e COSTA, 2007; BARROCAL, 2010).

O CO<sub>2</sub> também é um resíduo gerado em quantidades consideráveis na indústria canavieira, tanto na fermentação alcoólica quanto na queima do bagaço. Devido à preocupação atual com a sustentabilidade ambiental, este não pode ser descartado diretamente na atmosfera por contribuir para o efeito estufa e o aquecimento global. Durante o cultivo em sistemas foto-autotróficos, as microalgas utilizam o CO<sub>2</sub> atmosférico em seu metabolismo, fixando-o em moléculas orgânicas (cada kg de biomassa algal corresponde a fixação de cerca de 1,83 kg de CO<sub>2</sub>) (CHISTI, 2008; LARKUM, 2012). Em condições naturais, elas assimilam o CO<sub>2</sub> do ar atmosférico, que contém em média 0,036% de volume deste gás, porém a maioria das linhagens pode tolerar e utilizar níveis substancialmente maiores, normalmente até 15% em volume. Assim, o direcionamento do CO<sub>2</sub> emitido pela indústria canavieira para sistemas de cultivos de microalgas poderia permitir o eficiente sequestro de carbono na biomassa gerada, tendo em vista a grande eficiência fotossintética destes

microrganismos. De fato, estudos indicam que a integração de sistemas de produção de microalgas com a indústria sucro-energética gera impactos positivos significativos no ciclo de vida de ambos os processos (OLIVEIRA, 2012).

Neste contexto, a integração do processo de cultivo de microalgas ao complexo sucro-energético por meio do aproveitamento da vinhaça e do CO<sub>2</sub> da usina para a produção de biomassa algal se destaca como um modelo promissor. Adicionalmente, a produção de outros bioprodutos de alto valor a partir das microalgas cultivadas potencialmente viabilizaria economicamente a cadeia e complementar o modelo de biorrefinaria. Por exemplo, carotenoides e outros pigmentos lipossolúveis abundantes em algumas espécies de microalgas, como a luteína e o  $\beta$ -caroteno, possuem alto valor como nutracêuticos anti-oxidantes. Diversos polímeros de natureza polissacarídica também podem ser encontrados na estrutura celular das microalgas ou ainda serem secretados para o meio circundante (exopolímeros), como alginato, ágar, furcellarano e carrageano. Além do uso como aditivos de alimentos, estes e outros carboidratos complexos derivados de microalgas podem ser convertidos em açúcares C5 e C6 relativamente incomuns e passíveis de serem aproveitados como intermediários para a produção de 1,2 propanodiol, ácido levulínico e outros derivados de interesse para a indústria química e farmacêutica (Foley et al., 2011). Além disso, algumas espécies de microalgas acumulam quantidades consideráveis de amido e possuem uma parede celular rica em celulose e pobre em lignina e hemicelulose o que facilitaria a utilização da biomassa, após a extração de lipídeos, na produção de etanol (CHISTI e YAN, 2011). Assim, hipoteticamente, o cultivo de microalgas acoplado a uma

biorrefinaria sucro-energética poderia permitir a produção de diversos produtos, como etanol, açúcar, energia ou mesmo enzimas recombinantes de interesse industrial, como celulasas e beta-glicosidades (Figura 2).

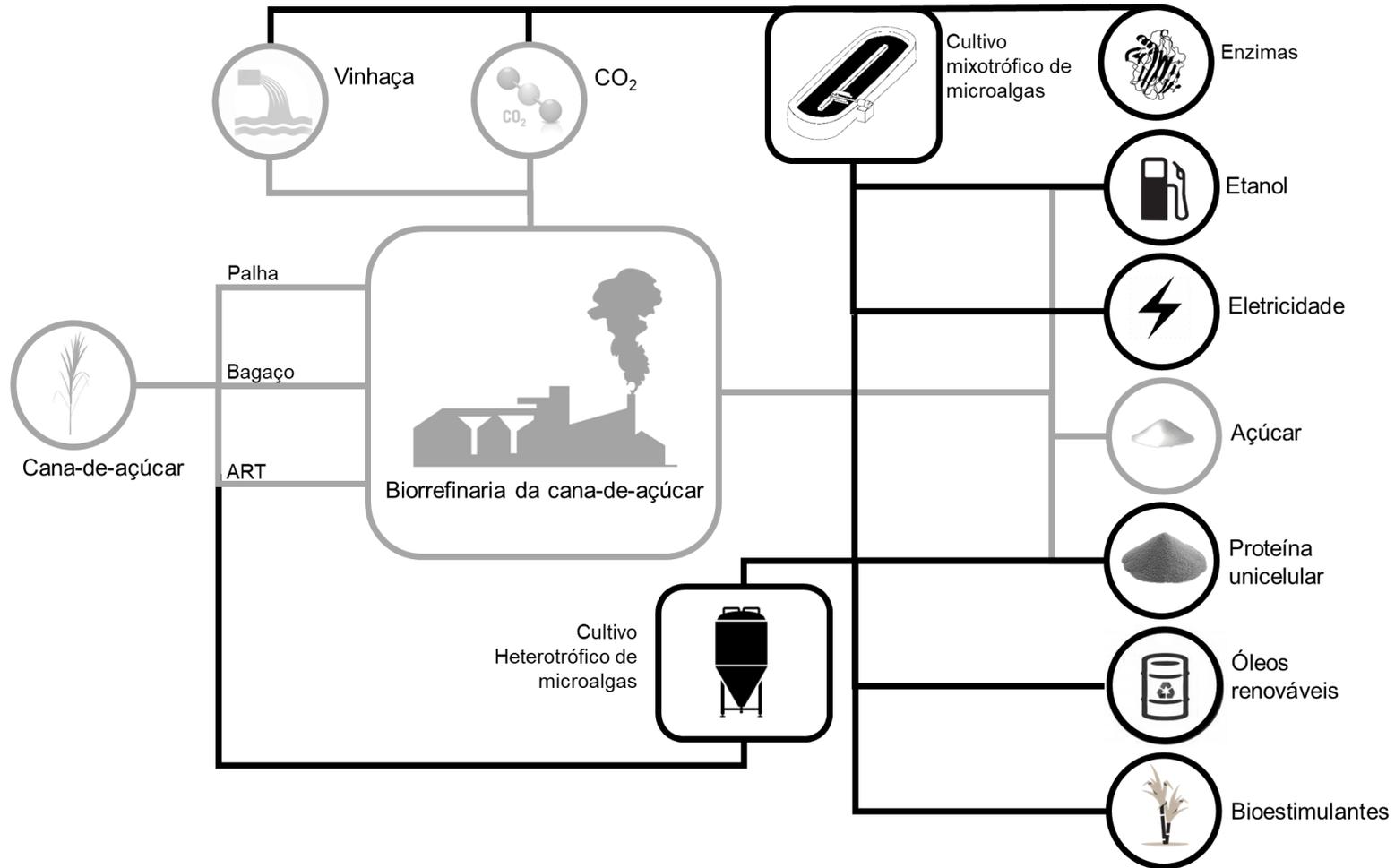
Além dessas aplicações, a integração da produção de biomassa microalgal na indústria sucro-energética pode ser associada à produção de proteína unicelular (*single cell protein* - SCP) e bioestimulantes a partir desses microrganismos.

Na indústria sucroenergética, a produção de proteína unicelular faz parte da cadeia produtiva e objetiva a viabilização técnico-econômica da mesma. A SCP é derivada da biomassa de levedura produzida durante o processo de fermentação do caldo da cana-de-açúcar e é rica em proteínas, além de apresentar em sua composição ácidos graxos, aminoácidos, carboidratos, ácidos nucléicos, vitaminas e minerais (SUMAN, 2015). Este bioproduto é utilizado principalmente na suplementação da alimentação animal, um mercado que possui grande demanda para uma fonte proteica barata (JONES, 2020).

Assim como a SCP produzida a partir de leveduras, a SPC derivada de microalgas apresenta características favoráveis à aplicação na nutrição animal. Espécies como *Chlorella* sp. e *Spirulina* sp. produzem biomassa com características similares, ricas em proteínas, sendo utilizadas como suplemento alimentar em diversas partes do mundo (SUMAN, 2015). Desta maneira, a integração da produção de biomassa microalgal em um sistema de biorrefinaria associado a indústria sucro-energética pode viabilizar a expansão do mercado alcançado por esta indústria, utilizando apenas a vinhaça como substrato.

É bem estabelecido que bioestimulantes favorecem o crescimento e o desenvolvimento de plantas, afetando a produtividade de diversos cultivares.

São produtos baseados principalmente em materiais naturais que influem em processos metabólicos das plantas, sendo uma das suas principais fontes primárias microrganismos diversos, como bactérias, cianobactérias e algas marinhas (YAKHIN, 2017). Além destes, microalgas também apresentam bons resultados quando utilizados com essa finalidade. Como apontado por KIM (2018), o uso de *Chlorella fusca* em plantações de cebolinha de espinafre resultaram num maior crescimento e numa melhoria da qualidade dos cultivares. KIM (2018) também indicou o potencial de utilização desses microrganismos para melhoria de cultivares de arroz, berinjela, beterraba, tomate e pimenta. Apesar da indisponibilidade de dados na literatura, a utilização da biomassa microalgal cultivada dentro do sistema de biorrefinaria proposto pode contribuir para o favorecimento da própria cadeia produtiva através de um possível aumento na produtividade dos cultivares.



**Figura 2** – Sistema hipotético de biorrefinaria integrando a indústria sucro-energética e a produção de microalgas. Adaptado de BRASIL, SILVA e SIQUEIRA (2017). A rota relacionada à produção de microalgas é apresentada em preto. A rota de produção relacionada à cana-de-açúcar é apresentada em cinza. ART – Açúcares redutores totais.

### 1.3. Produção de proteínas recombinantes em modelo microalgal

Nos últimos anos, a demanda pela produção de proteínas recombinantes tem crescido de maneira significativa em todo mundo, tendo movimentado, em 2016, um mercado de US\$ 340,3 milhões, com expectativa de crescimento de 6,6% ao ano até 2023 (INSIGHTS, 2018). Essas moléculas possuem aplicações em áreas como farmacêutica, alimentação, pesquisa, tratamento de resíduos e indústria, e são produzidas a partir da aplicação da tecnologia do DNA recombinante em organismos diversos (YAN, 2016).

Atualmente, a produção de proteínas recombinantes é realizada principalmente em leveduras, bactérias e células de mamíferos. Sistemas de expressão baseados em bactérias são os mais amplamente utilizados, sendo que a bactéria *Escherichia coli* é o organismo preferencial neste tipo de aplicação devido a ampla disponibilidade de ferramentas genéticas, o rápido crescimento e a simplicidade de cultivo. Apesar disso, existem limitações para a produção de proteínas recombinantes em bactérias, os quais incluem a incapacidade de processar íntrons, o acúmulo de proteínas no espaço intracelular, o que pode ser tóxico ao organismo, a não realização de algumas modificações pós-traducionais, como a glicosilação, afetando o rendimento final da produção ou as características das proteínas, levando a alterações em suas funções biológicas (GOMES, 2016; VIEIRA GOMES, 2018).

Para contornar os problemas observados, o uso de hospedeiros eucarióticos, como leveduras e células de mamíferos, é uma opção mais adequada para a expressão de qualquer tipo de proteína recombinante, especialmente as que necessitam de modificações pós-traducionais para que apresentem as suas funções biológicas de maneira inalterada. No caso de

leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), características como a velocidade de crescimento, a alta densidade celular alcançada e a disponibilidade de ferramentas genéticas, fazem com que esse grupo de organismos tenham características favoráveis à expressão em células procarióticas, com a vantagem de serem capazes de realizar modificações pós-traducionais nas proteínas. Por outro lado, proteínas produzidas por leveduras podem ser hiperglicosadas e as modificações pós-tradicionais podem ser diferentes daquelas adequadas à proteína (GOMES, 2016; SHARIFI-SIRCHI e JALALI-JAVARAN, 2016).

Células de mamíferos podem ser usadas para produzir proteínas heterólogas contornando os problemas observados em leveduras. Elas são consideradas um modelo adequado para expressão de proteínas complexas, porém, apresentam um longo tempo de geração e um alto requerimento nutricional, fazendo com que o custo de produção de proteínas recombinantes seja muito elevado (YANG, 2016).

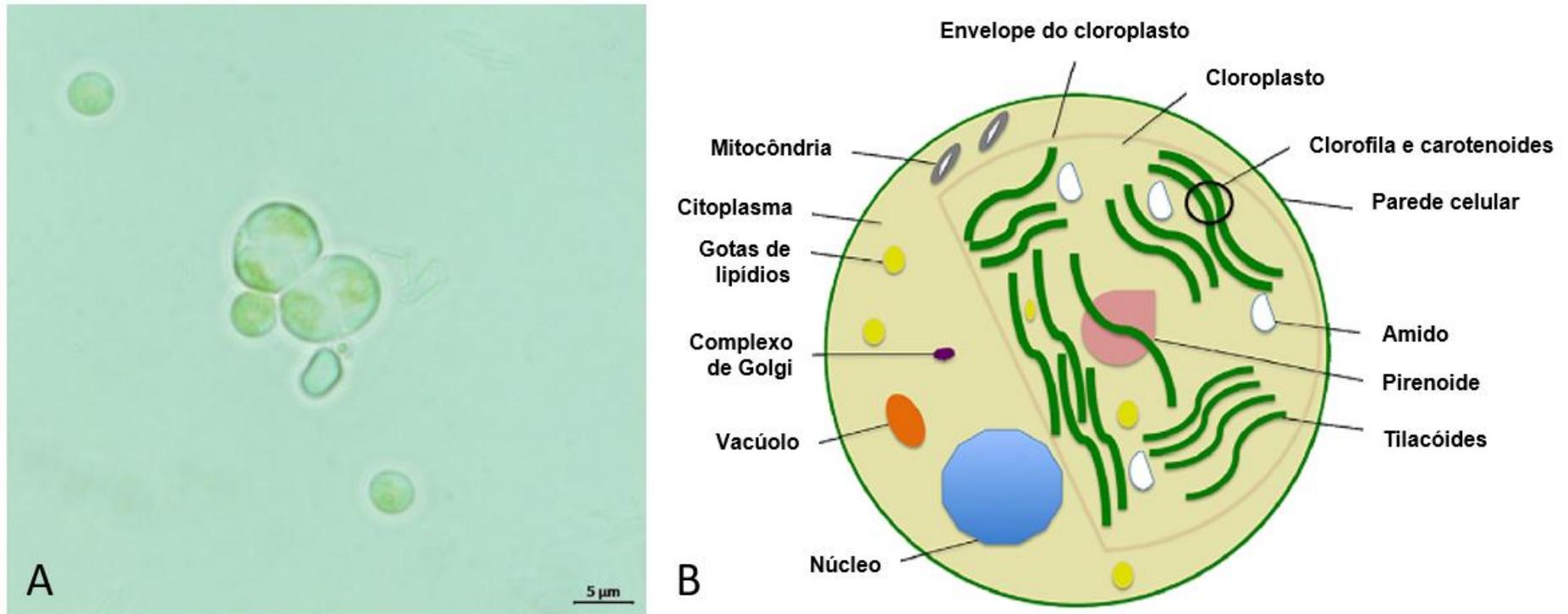
Apesar do uso de microalgas como plataforma de expressão ainda estar em seu início, existe crescente interesse em utilizar esse grupo de organismos com esse fim por ser um sistema de expressão seguro, de relativo baixo-custo e facilmente escalonável comparativamente a microrganismos heterotróficos, células de insetos ou de mamíferos. Porém existem obstáculos que precisam ser superados para que o uso dessa plataforma seja possível. Dentre eles, pode-se citar a disponibilidade limitada de ferramentas moleculares, a ausência de procedimentos padrões para a transformação genética, além do baixo nível de expressão de proteínas recombinantes a partir do genoma nuclear, o que está

associado a diversos fatores, tal como o silenciamento gênico e a atividade de proteases (SURZYCKI, 2009; GONG, 2011; AKBARI, 2014).

### **1.3.1. Microalgas utilizadas para a produção de proteínas heterólogas**

Microalgas do gênero *Chlorella* estão dentre as mais estudadas para a produção de biocombustíveis e biomassa para alimentação. Isto se deve ao fato dos organismos desse gênero serem capazes de crescer rapidamente e acumular um teor elevado de carboidratos, vitaminas, proteínas e lipídios, se destacando especialmente nestes últimos elementos, os quais podem chegar a compor 50% do biomassa seca dessas espécies (MALCATA, 2011; KUMAR e DAS, 2012). Até o momento, existem aproximadamente 20 espécies do gênero *Chlorella* caracterizadas bioquimicamente, e cerca de 100 cepas descritas na literatura (LIZZUL, 2018).

Espécies do gênero *Chlorella* apresentam morfologia muito similar àquela observada a outros representantes das classes Trebouxiophyceae e Chlorophyceae. São células majoritariamente esféricas, não-móveis, com tamanho entre 5-10  $\mu\text{m}$ , que podem ou não se associarem em colônias, apresentando parede celular fina, cloroplasto único com a presença de pirenoide, estrutura para armazenamento de amido (Figura 3). A reprodução se dá de forma assexuada via autósporos na qual as células-filha são geradas no interior das célula-mãe, sendo posteriormente liberadas seguindo um padrão de liberação típico da espécie, que pode variar desde a ruptura total da parede celular da célula-mãe até a um rompimento oblíquo ou horizontal da mesma (LUO, 2006; LUO, 2010; BOCK, 2011).



**Figura 3** - Microalga *Chlorella sorokiniana*. A - Observação em microscópio óptico (Zeiss) com ampliação de 1000x da cepa *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39. B – Representação esquemática da ultraestrutura do gênero *Chlorella* (SAFI, 2014).

A espécie *C. sorokiniana* apresenta morfologia compatível com os demais representantes da família. Em condições normais, o seu tamanho é de 3-5  $\mu\text{m}$ , mas pode se apresentar maior, a depender das condições de cultivo. Esta microalga possui alta capacidade de adaptação, cresce em uma faixa ampla de temperatura e pH, sob alta intensidade luminosa, além de ser capaz de crescer de maneira mixotrófica no meio de cultivo (KUMAR, 2014; JUNTILA, 2015). Características que tem atraído a atenção para *C. sorokiniana* são a sua capacidade elevada de acúmulo lipídios e proteínas, que podem representar, respectivamente, 20% e 40% do peso seco de sua biomassa em condições de cultivo basais (KUMAR, 2014; ZUORRO, 2018), podendo o teor desses componentes representarem mais de 50% da biomassa, a depender das condições de cultivo utilizadas (HUNT, 2010; LI, 2014).

Nos últimos anos, com o crescente interesse na utilização de microalgas do gênero *Chlorella* em diversos setores, houve um aumento significativo no número de estudos voltados para a expressão de proteínas heterólogas nesse grupo. No entanto, a baixa disponibilidade de informações genômicas para microalgas desse gênero e fatores como a baixa expressão e a instabilidade dos transformantes gerados, ainda são fatores limitantes para o uso efetivo deste modelo de expressão para a produção de proteínas heterólogas (AKBARI, 2014). Para contornar isto, vários trabalhos voltados para a compreensão e identificação dos elementos regulatórios que promovam a expressão gênica e metodologias eficientes de entrega do DNA exógeno em *Chlorella* spp. têm sido realizados.

Como pode ser verificado na tabela 4, ao longo dos anos foi possível estabelecer uma série de protocolos de transformação genética de microalgas do gênero *Chlorella* utilizando diferentes técnicas que também são aplicáveis a outros grupos de microrganismos. O uso dessas técnicas permitiu a obtenção de transformantes estáveis em todos os métodos disponíveis, no entanto a eletroporação tem se mostrado como o método mais adequado para esta finalidade, tanto pela simplicidade quanto por permitir a obtenção de um grande número de transformantes em um tempo reduzido.

Apesar de protocolos de transformação genética para microalgas do gênero *Chlorella* estarem disponíveis, a avaliação da viabilidade de utilização dos mesmos, assim como a sua adequação, se faz necessária devido às diferenças genéticas e morfológicas existentes nesse grupo de microrganismos. Isto se deve ao fato apontado por BAUDELET (2017), o qual mostra que, devido à dificuldade em se realizar a identificação de microalgas do gênero *Chlorella*, baseada inicialmente em similaridades morfológicas, diversas espécies foram erroneamente classificadas como pertencentes ao mesmo.

A classificação taxonômica correta, apesar de insuficiente, é importante para a definição de protocolos adequados para a realização da transformação gênica. Como a composição da parede celular, estrutura que influencia diretamente a penetração do DNA exógeno na célula (COLL, 2006), apresenta uma forte associação com a relação taxonômica entre os microrganismos desse grupo (DARIENKO, 2010), a análise dessa relação pode simplificar o estabelecimento de protocolos de transformação gênica para organismos distintos.

**Tabela 4** – Métodos utilizados para a transformação genética de *Chlorella* spp.

Espécie/Cepa	Método	Condição da célula	Gene	Expressão	Referência
<i>C. vulgaris</i> UTEX-26	Eletroporação	Protoplasto	GFP	-	KUMAR (2018)
<i>C. pyrenoidosa</i> FACHB9	Eletroporação	Íntegra	PtME	Estável	RUN (2016)
<i>C. pyrenoidosa</i> FACHB9	Eletroporação	Íntegra	AtNADK3	Estável	FAN (2015)
<i>C. vulgaris</i>	Eletroporação	Íntegra	Lfb-N	Estável	KOO (2013)
<i>C. vulgaris</i>	Eletroporação	Íntegra	CAT	Estável	NIU (2011)
<i>Chlorella</i> sp. MACC/C95	Eletroporação	Íntegra	GUS	Transiente	WANG (2007)
<i>C. vulgaris</i>	Eletroporação	Íntegra	GUS	Transiente	CHOW e TUNG (1999)
<i>C. sorokiniana</i> ATCC-22521; <i>C. vulgaris</i> C-27	PEG	Íntegra	hGH	Transiente	HAWKINS e NAKAMURA (1999)
<i>C. vulgaris</i> CBS 15-2075	PEG	Protoplasto	eGFP	Estável	YANG (2015)
<i>Chlorella</i> sp. DT	PEG	Protoplasto	merA	Estável	HUANG (2006)
<i>Chlorella</i> sp. SRM02	Agrobacterium	Íntegra	GUS	Estável	SANITHA (2014)
<i>C. vulgaris</i> CGMCC 6951	Agrobacterium	Íntegra	vgb	-	MA e LIN (2014)
<i>C. vulgaris</i> UMT-M1	Agrobacterium	Protoplasto	yoeB, pezT, GFP	Estável	NG (2016)
<i>C. vulgaris</i> 211/21b; <i>C. salina</i> 211/25	Biobalística	Íntegra	GUS	Estável	TALEBI (2013)
<i>C. sorokiniana</i>	Biobalística	Íntegra	nr	Estável	DAWSON (1997)

Além das espécies do gênero *Chlorella*, microalgas do gênero *Chlamydomonas* estão entre as mais estudadas em trabalhos voltados para a produção de biocombustíveis, sendo a *Chlamydomonas reinhardtii* a espécie considerada como o modelo em estudos voltados para a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos (SCRANTON, 2015). Como características gerais, representantes do gênero apresentam ciclo reprodutivo complexo, com fases de reprodução sexuada e assexuada representadas por haploides e diploides, bastante definidas. Estas células, durante a sua fase assexual (Zoósporo) apresenta forma oval, com dois flagelos em sua base posterior, medindo aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . Estas células passam por um processo de divisão mitótica, liberando 4-8 células biflageladas envolvidas na fase sexuada da reprodução, os gametas tipo compatível + e -. Os dois gametas opostos se conectam, perdem a sua parede celular e se fundem formando um zigoto, o qual se desenvolve em forma dormente chamada zigosporo. Em condições favoráveis, esta fase se divide por meiose dando origem a quatro células haploides com mobilidade, que são liberadas no meio após o rompimento da parede do zigosporo (ROCHAIX, 1995; BAUDELET, 2017).

As características reprodutivas de microalgas do gênero *Chlamydomonas* permitem que sejam utilizadas técnicas clássicas de melhoramento, que envolvem o cruzamento dos tipos reprodutivos de diferentes linhagens celulares ou a indução da fase de zigosporo da cepa estudada. No entanto, a desvantagem da utilização desta técnica é a ocorrência de mutações aleatórias, que podem ser minimizadas ao serem realizados cruzamentos com a cepa selvagem (MUSSGNUG, 2015).

Para a transformação genética de *C. reinhardtii*, técnicas diversas podem ser aplicadas. No entanto, diferentemente do que ocorre com cepas do gênero *Chlorella*, a transformação é obtida de maneira mais eficiente com o uso de biobalística, tanto para a transformação de nuclear, mitocondrial ou plastidial (MUSSGNUM, 2015). Apesar de *C. reinhardtii* ser a espécie de microalga que possui a maior quantidade de informações genômicas e metabólicas disponíveis atualmente, em trabalhos voltados para o melhoramento genético desta espécie para a produção de biocombustíveis, a expressão de proteínas recombinantes foi limitada pela ausência de promotores endógenos fortes para a expressão das características de interesse (SCRANTON, 2015; BARAHIMIPOUR, 2016).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o potencial de aplicação biotecnológica de cepas de microalgas nativas da biodiversidade brasileira visando a produção de biocombustíveis e energia em um contexto de biorrefinaria.

#### **2.1.1. Objetivos específicos**

- Caracterizar o teor e perfil de carboidratos e lipídeos de cepas de microalgas verdes cultivadas em vinhaça e gás carbônico visando à produção de biocombustíveis e energia;
- Desenvolver método de criopreservação para cepas de microalgas verdes capazes de crescer em vinhaça e gás carbônico;
- Desenvolver método de transformação genética para cepas de microalgas verdes capazes de crescer em vinhaça e gás carbônico;

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Cepas

##### 3.1.1. Origem e identificação

Foram utilizadas culturas axênicas das microalgas verdes (Chlorophyta), *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32, *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40 provenientes da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicadas a Agroenergia e Biorrefinarias da Embrapa (Brasília/DF – Brasil) para caracterização de crescimento em diferentes condições de cultivo. Para a manutenção de culturas, as amostras foram mantidas em meio BG11 (RIPPKA, 1979) ou BBM – Bold's Basal Medium (NICHOLS e BOLD, 1965) sob ciclo de iluminação 12h claro/12h escuro, com intensidade luminosa de  $108 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , a 25°C.

As cepas foram identificadas utilizando o marcador molecular ITS2 conforme descrito por HADI (2016). Brevemente, após a extração do DNA, foi realizada a PCR das amostras utilizando os *primers* fw\_ITS1 e rv\_ITS4 e o produto da reação, visualizado em gel de agarose - ver seção 3.6.4 - foi selecionado para sequenciamento direto. As sequências foram determinadas bidirecionalmente utilizando o sequenciador automatizado de DNA ABI 3130 (Life Technologies). Utilizando o software Geneious 9, as sequências obtidas foram editadas e alinhadas utilizando o ClustalW utilizando parâmetros padrões. Foi realizada então a anotação da sequência utilizando o ITS2 database, conforme apresentado por MERGET (2012). As sequências nuITS2 anotadas foram submetidas ao “*Basic Local Alignment Search Tool*” (BLASTn) para comparação com as sequências depositadas no GenBank. Em seguida, foi realizada a predição da estrutura secundária da sequência nuITS2

(KOETSCHAN, 2012) e, utilizando o software 4SALE v. 1.7 (SEIBEL, 2006), a determinação da ocorrência de mudanças de base compensatórias (CBCs) em comparação à estrutura secundária da sequência de maior similaridade no ITS2 BLAST tool (MERGET, 2012).

### **3.1.2. Criopreservação e análise filogenética**

As cepas Embrapa|LBA#06, Embrapa|LBA#17, Embrapa|LBA#32, Embrapa|LBA#35, Embrapa|LBA#36, Embrapa|LBA#39, Embrapa|LBA#40, Embrapa|LBA#48, Embrapa|LBA#51, Embrapa|LBA#54, Embrapa|LBA#59, Embrapa|LBA#61, Embrapa|LBA#73, Embrapa|LBA#77 e Embrapa|LBA#85 foram avaliadas para determinação da melhor condição para criopreservação, conforme descrito em FERNANDES (2019).

Para estabelecimento da correlação entre o tipo de criopreservante, a morfologia e a relação taxonômica, as cepas foram identificadas utilizando o marcador nuITS2 (Seção 3.1.1) e as sequências de nucleotídeos obtidos com o sequenciamento foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética utilizando o método GTR (*General Time Reversible*). Para a análise, o modelo GTR com sítios invariáveis (I) e o parâmetro de forma da distribuição gamma (G) (GTR+G+I) foi utilizado, com valor de bootstrap de 1000 replicatas.

## **3.2. Condições de cultivo**

### **3.2.1. Preparo do inóculo**

Para o preparo do inóculo, amostras das cepas *Micractinium sp.* Embrapa|LBA#32, *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40 foram inoculadas em frascos do tipo Erlenmeyer

com meio BBM (NICHOLS e BOLD, 1965) ou BG11 (RIPPKA, 1979) e cultivadas durante 7 dias, a  $26 \pm 1$  °C sob aeração ( $5 \text{ L.h}^{-1}$  de ar atmosférico), em regime de iluminação 12 horas claro/12 horas escuro, com intensidade luminosa de  $108 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Ao final do crescimento do inóculo, foi realizada a inoculação do material em frascos erlenmeyer, em triplicata, com absorbância inicial do cultivo a 680 nm (Spectramax M5) em 0.01.

### 3.2.2. Preparo de meios a base de vinhaça

Para determinação do perfil de crescimento das cepas de microalgas em vinhaça, foi utilizada a vinhaça de cana-de-açúcar obtida da Jalles Machado (Goianésia/GO/Brasil) processada como descrito a seguir. Foram utilizadas três formulações de vinhaça: vinhaça *in natura*, vinhaça diluída a 50% em água destilada e vinhaça clarificada.

Vinhaça *in natura* - vinhaça obtida da usina foi centrifugada a 48000 RCF durante 10 minutos para a remoção de sólidos suspensos e detritos.

Vinhaça diluída a 50% em água destilada - referida apenas como **vinhaça diluída**, foi preparada a partir da diluição da vinhaça *in natura* em água destilada na proporção 1:1.

Vinhaça clarificada – preparada a partir da adição de cal hidratada ( $\text{CaOH}_2$ ) à vinhaça *in natura* ( $3 \text{ g.L}^{-1}$ ). A mistura foi mantida em repouso durante 40 minutos, centrifugada a 4800 RCF por 10 minutos e o sobrenadante coletado para uso.

Todos os meios a base de vinhaça foram esterilizados em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos e armazenados a  $4^\circ\text{C}$  até serem utilizados.

As características físico-químicas acerca dos meios formulados a base de vinhaça estão descritas em SANTANA (2017).

### **3.2.3. Determinação do rendimento de biomassa em vinhaça**

As cepas *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32, *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40, selecionadas para crescimento em vinhaça conforme SANTANA (2017), foram cultivadas em vinhaça, a partir de um inóculo preparado em meio BBM (seção 3.2.1.), sob aeração ( $5 \text{ L.h}^{-1}$ ) e regime de iluminação com 12 horas de claro e 12 horas de escuro (intensidade de luz de  $108 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Com absorbância inicial de 0,01 a 680 nm (volume 250 mL), as cepas foram cultivadas durante 8 dias a  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ao final do cultivo, 10 mL do cultivo foi colhida por centrifugação (4800 RCF por 10 minutos) e as amostras tiveram o seu peso seco determinado.

### **3.2.4. Determinação do tipo de metabolismo microalgal em vinhaça**

Para se determinar o tipo de metabolismo realizado pela *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39, a partir do inóculo cultivado em meio BBM (seção 3.2.1), foi iniciado um cultivo (absorbância de 0,1 a 680 nm; volume. 150 mL) em meio a base de vinhaça sob quatro condições que se estendeu por 8 dias.

- 1) Vinhaça *in natura*, cultivo axênico, pH 4,5, regime de iluminação de 12/12 h ( $108 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$ );
- 2) Vinhaça *in natura*, cultivo axênico, pH 4,5, sem regime de iluminação;
- 3) Vinhaça *in natura*, cultivo não-axênico, pH 4,5, regime de iluminação de 12/12 h ( $108 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$ );

4) Vinhaça *in natura*, cultivo não-axênico, pH 4,5, sem regime de iluminação.

Todos os frascos foram mantidos a  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e sob aeração ( $5\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Alíquotas de 10 mL das amostras cultivadas foram colhidas no início e ao oitavo dia de cultivo, sendo as amostras colhida por centrifugação (4800 RCF por 10 minutos) para determinação do seu peso seco (*pellet*) e o teor de açúcares no meio de cultivo (sobrenadante). Realizado em triplicata (n=3).

### **3.2.5. Determinação dos níveis de açúcares após o cultivo de microalgas em vinhaça**

Para avaliar a presença de açúcares redutores (glicose, frutose) e sacarose nas amostras cultivadas em vinhaça, foi realizada a cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent 1260 Infinity Binary LC System) utilizando uma coluna adequada para a detecção de carboidratos e ácidos orgânicos (Biorad Aminex HPX-87H). A análise foi realizada com a temperatura da coluna a  $45^{\circ}\text{C}$  utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.005 M como fase móvel. A taxa de fluxo do eluente foi de 0,6 mL/min.

### **3.2.6. Determinação do peso seco da biomassa**

Para a determinação do peso seco dos cultivos, amostras de 10 mL dos cultivos de microalgas foram coletados, centrifugados (10700 RCF por 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado com de três ciclos de ressuspensão em água destilada e centrifugação a 10700 RCF. A biomassa lavada obtida foi seca em estufa de secagem a  $105^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceu durante a noite, e então foi pesado.

### **3.3. Caracterização da biomassa microalgal cultivada em diferentes formulações de meio a base de vinhaça**

A biomassa obtida pelo cultivo das cepas *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40 a partir do cultivo durante 3 dias em fotobiorreatores de placa plana utilizando BBM, vinhaça clarificada e vinhaça diluída em água a 50%, sob regime de iluminação de 12 horas claro ( $216 \mu\text{Em}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e 12 horas de escuro ( $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e aeração com ar atmosférico ( $64 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ) e suplementação com 5% de gás carbônico, foi caracterizada para a sua composição e teor de ácidos graxos, e o teor e composição de carboidratos.

#### **3.3.1. Teor e perfil de ácidos graxos**

O teor e o perfil de ácidos graxos foram determinados com o uso da metodologia proposta por VAN WYCHEN e LAURENS (2013b). Em triplicata, 10 mg de biomassa algal liofilizada foi tratada com 0,2 mL de clorofórmio: metanol (2:1) e 0,3 mL de HCl 0,6M em metanol, sendo a amostra aquecida em bloco seco a  $85^\circ \text{C}$  por 1 hora para obtenção dos ácidos graxos transesterificados. Em seguida, foi utilizado 1 mL de hexano para extração dos ésteres metílicos de ácido graxo (FAME), sendo em seguida separados por cromatografia gasosa acoplado a detector de ionização de chama e uma coluna capilar de sílica fundida ( $100 \text{ m} \times 250 \mu\text{m} \times 0.2 \mu\text{m}$ , Supelco SP). A determinação dos ácidos graxos presentes na biomassa foi feita pela comparação dos tempos de retenção e da área de pico de padrões de ésteres metílicos (Sigma-Aldrich).

### **3.3.2. Teor e perfil de carboidratos**

A quantificação dos carboidratos totais e estruturais foi feita de acordo com a metodologia proposta por VAN WYCHEN e LAURENS (2013a). Foram utilizados 25 mg das amostras de biomassa algal liofilizadas.

Para o perfil de carboidratos, as amostras foram hidrolisadas (VAN WYCHEN e LAURENS, 2013a) e o material obtido teve o seu perfil determinado com base na metodologia proposta por BASUMALLICK e ROHRER (2012). Esta análise foi feita com uso de cromatografia de troca iônica HPAE-PAD (Dionex ICS 500+), com a Dionex Carbo Pac SA10-4  $\mu\text{m}$ , 4 x 250 mm usando a pré-coluna, com o detector PAD. A determinação dos carboidratos foi feita pela comparação dos tempos de retenção de padrões analíticos com aqueles das amostras e a quantificação realizada pela comparação da área do pico àquelas obtidas com padrões analíticos.

### **3.3.3. Poder Calorífico**

Para avaliação do potencial energético da biomassa obtida a partir do cultivo das microalgas, foi realizada a determinação do poder calorífico das amostras com base no protocolo descrito por ASTM (2013), sendo utilizado o calorímetro automatizado IKA C-2000.

## **3.4. Determinação do perfil de crescimento em meio BG11**

Para determinação do perfil de crescimento em meio BG11, foi realizada a inoculação dos frascos com o inóculo previamente cultivado (seção 3.2.1.). O cultivo foi ajustado para uma densidade óptica inicial de 0,01A a 680 nm em volume de 600 mL. O cultivo foi realizado durante 15 dias, a  $26 \pm 1$  °C sob

aeração (5 L por hora de ar atmosférico), em regime de iluminação 12 horas claro/12 horas escuro, com intensidade luminosa de  $216 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Neste período foram coletadas, diariamente, alíquotas de 1 mL para contagem de células, realizada em citômetro de fluxo (Merck-Millipore, Guava 5HT), e para determinação da densidade óptica do cultivo a 680 nm (Spectramax M5). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

### 3.5. Avaliação da resistência a antibióticos

A cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 foi avaliada quanto a susceptibilidade/resistência aos antibióticos Zeocina, Higromicina e Kanamicina, comumente utilizados para seleção de transformantes (NODA, 2017). Para se determinar a concentração mínima para inibição do crescimento da cepa *C. sorokiniana* LBA#39, a mesma foi cultivada em meio BG11 durante 7 dias, com ciclo de iluminação de 12 horas claro/12 horas escuro, a  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  com intensidade luminosa de  $108 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Após o cultivo, alíquotas foram coletadas e o número de células foi determinado em câmara de Neubauer. Alíquotas contendo  $1 \times 10^7$  células foram coletadas, centrifugadas a 1350 RCF por 10 minutos, tiveram o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido em 200  $\mu\text{L}$  de meio BG11 contendo diferentes concentrações dos antibióticos Zeocina (1, 3, 6, 12, 25, 50  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), Higromicina (50, 100, 200, 300, 400, 600  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), G418 (25, 50, 100, 200, 300, 400  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) e Kanamicina (50, 100, 200, 400, 600, 800  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ). As alíquotas, em triplicata, foram cultivadas em microplacas de 96 poços estéreis por 30 dias, com ciclo de iluminação de 12 horas claro/12 horas escuro com intensidade luminosa de  $108 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Para determinação da concentração inibitória em meio ágar-BG11, o mesmo número de células foi semeado em placas de petri contendo meio ágar-BG11 com diferentes concentrações dos antibióticos Zeocina (6,12, 25, 30, 40, 50, 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e G418 (12,5, 25, 50, 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As placas, em triplicata, foram cultivadas por 30 dias, com ciclo de iluminação de 12 horas claro/12 horas escuro com intensidade luminosa de  $108 \mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.6. Transformação com o plasmídio pChlamy\_4-eGFP**

#### **3.6.1. Preparo da construção gênica e transformação de *Escherichia coli* EPI300**

*Escherichia coli* EPI300 eletrocompetentes foram transformadas com os vetores pDTSmart-eGFP e pChlamy\_4 (Thermo Fisher) para produção de DNA plasmidiano para uso em posterior eletroporação da cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39. Para isto, 500 ng dos vetores foram adicionados, separadamente, a tubos contendo 50  $\mu\text{L}$  de bactéria eletrocompetente.

Após a realização da incubação por 1 minuto, foi realizada a eletroporação em cubetas de 0,1 cm (Biorad), utilizando o eletroporador Eppendorf 2510, nas seguintes condições: Voltagem – 1,8 kV, Capacitância – 25  $\mu\text{F}$  e resistência – 200 ohms. Após o pulso, foi realizada a adição de 1 mL de meio SOC (Tripton 20  $\text{g.L}^{-1}$ , Extrato de levedura 5  $\text{g.L}^{-1}$ , NaCl 0,5  $\text{g.L}^{-1}$ ) e em seguida foi realizada a incubação de 1 hora a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , em baixa agitação. Ao final, 100  $\mu\text{L}$  do material foi semeado em placas contendo meio ágar-LB (Extrato de levedura 10  $\text{g.L}^{-1}$ , peptona 10  $\text{g.L}^{-1}$ , NaCl 5  $\text{g.L}^{-1}$ , Ágar 15  $\text{g.L}^{-1}$ ), sendo cultivadas durante a noite a  $37^\circ\text{C}$ .

Após o cultivo, as colônias foram transferidas para tubos contendo 5 mL de meio LB (Extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, peptona 10 g.L<sup>-1</sup>, NaCl 5 g.L<sup>-1</sup>) com ampicilina 100 µg.mL<sup>-1</sup> e cultivadas durante a noite a 37 °C, com agitação (200 rpm). Ao final do cultivo, foi realizada uma minipreparação plasmidial - *miniprep* (seção 3.6.2.), o material extraído foi purificado utilizando o Genejet *PCR Purification kit* (Thermo Scientific), quantificado em Nanodrop e em seguida foi realizada uma dupla digestão dos plasmídios extraídos com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI, com o tampão BamHI, de acordo com a recomendação do fabricante (Thermo-Scientific). Foi realizada a confirmação dos plasmídeos por eletroforese (seção 3.6.4.) a partir da análise do tamanho dos fragmentos gerados fragmento pós-digestão (3440 pb e 100 pb do pChlamy\_4 vazio e 2056 pb e 725 pb do pIDTSmart-eGFP).

Selecionados os clones, foi realizado um inóculo em 100 mL de meio LB (cultivo a 37 °C, 200 rpm, durante a noite) e uma midiprep foi realizada com o Genejet *Plasmid Midiprep kit* (Thermo Scientific). Após quantificação foi realizada uma nova digestão de 3µg de cada um dos plasmídeos com as enzimas BamHI e EcoRI, que em seguida foi analisado por eletroforese. Para extração dos fragmentos de interesse (3440 pb do pChlamy\_4-vazio e 725 pb do pIDTSmart-eGFP), foi utilizado o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Em seguida, foi realizada a quantificação em Nanodrop e a clonagem entre os dois fragmentos foi realizada utilizando o kit *LigaFast™ Rapid DNA Ligation System* contendo a enzima T4 Ligase e o *2x Rapid Ligation Buffer* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Após a ligação, foi realizada a

transformação da *E. coli* EPI300 com a construção pChlamy\_4-eGFP, conforme descrito anteriormente.

Após o cultivo, foi realizado um PCR de colônia (PCR realizada a partir de uma solução contendo 50  $\mu$ L de água-miliQ e a colônia bacteriana aquecida a 96 °C) utilizando os *primers* pChlamy\_4-fw e pChlamy\_4-rv para confirmar as colônias transformadas com a construção pChlamy\_4-eGFP.

### 3.6.2. Extração de DNA plasmidiano em pequena escala (Miniprep)

Para se realizar a miniprep, 1 mL do cultivo bacteriano foi centrifugado a 13000 rpm por 1 minuto a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 500  $\mu$ L de STE gelado (NaCl 100 mM, Tris-Cl 10mM, EDTA 1 mM) a cada tubo para ressuspensão do *pellet*. Foi realizada uma nova centrifugação (13000 rpm, 1 minuto, 4 °C), o sobrenadante foi descartado por aspiração e o *pellet* ressuspenso em 250 $\mu$ L de solução I (Glicose 50 mM, Tris-Cl 25 mM, EDTA 10mM), sendo adicionado em seguida 250 $\mu$ L da Solução II (NaOH 0,2M, SDS 2%).

Após homogeneização por inversão e incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, 350 $\mu$ L da Solução III (Acetato de potássio 3 M, Ácido acético glacial 2M) foram adicionados e a solução incubada por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação (13000 rpm, 2 minutos, 4 °C), o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 0,7 volume de isopropanol a ele foi adicionado.

Realizada a homogeneização e incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, uma nova centrifugação (13000 rpm, 10 minutos, 4 °C) foi feita, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido em 500  $\mu$ L de etanol 70%. Os tubos foram centrifugados (13000 rpm, 5 minutos, 4 °C), o sobrenadante

descartado, o *pellet* seco em evaporador a vácuo, sendo posteriormente ressuspensão em 30 $\mu$ L de TE (Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM). Ao final, quantificou-se o DNA em Nanodrop e realizou-se a confirmação da presença do plasmídeo por eletroforese em gel de agarose 1% (Seção 3.6.4.).

### 3.6.3. Extração de DNA plasmidiano em grande escala (Maxiprep)

Após a confirmação dos transformantes, foi realizada uma Maxiprep para se obter o plasmídeo pChlamy\_4-eGFP. Para isto, foi realizado o cultivo da *E. coli* EPI300 transformada com o plasmídeo pChlamy\_4-eGFP em meio ágar-LB com ampicilina 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, a 37 °C, durante a noite.

Após este período, as colônias selecionadas foram inoculadas em 5mL de meio LB com ampicilina 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> e cultivadas a 37°C, sob agitação (200 rpm), overnight. Em seguida, a partir do cultivo anterior, foram inoculados 5 mL em 500 mL de meio LB com ampicilina 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, sendo cultivado a 37 °C, sob agitação (200 rpm).

Passado este tempo, foi realizada a colheita do cultivo por centrifugação a 4700 rpm, por 10 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi então ressuspensionado em 25 mL de solução L (NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM, EDTA 10 mM, RNase A 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e transferido para dois tubos Falcon de 50 mL (12,5 mL por tubo). Foi realizada uma nova centrifugação (4700 rpm, por 10 minutos, a 4 °C), o *pellet* foi descartado e 3,125 mL da solução 1 (Glicose 50 mM, Tris-Cl 25 mM, EDTA 10 mM) foram utilizados para a ressuspensão do *pellet* em cada tubo.

Realizada a ressuspensão, 3,125 mL da solução contendo 0,0125 g de lisozima foram adicionados à solução, que foi mantida no gelo por 25 minutos.

Foram então adicionados 12,5 mL da solução 2 (NaOH 0,2 M, SDS 2%) a cada frasco, sendo invertido até que a solução se tornasse clara. Após 10 minutos de incubação no gelo, 9,37 mL da solução 3 (Acetato de potássio 3 M, ácido acético glacial 2 M), foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente, sendo centrifugados em seguida a 10000 rpm, por 60 minutos, a 4 °C. Recuperou-se o sobrenadante, adicionou-se igual volume de isopropanol gelado e homogeneizou-se a solução, que permaneceu em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Foi realizada uma nova centrifugação a 10000 rpm, por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco em bancada. Em seguida, o mesmo foi ressuspensão em 1 mL de TE (Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM) e tratado com RNase (20 µg.mL<sup>-1</sup>) por 30 minutos a 37 °C.

Após a incubação, foram adicionados 100 mM NaCl e 1,5% de SDS. Realizada a homogeneização do material e adicionado igual volume de clorofane (25 fenol:24 clorofórmio:1 álcool isoamílico), que foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi coletado e o processo foi repetido com clorofil (24 Clorofórmio: 1 álcool isoamílico). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, e o DNA foi precipitado com a adição de 100 µL de acetato de amônia 7,5 M. Após inverter o tubo por 10 segundos, 1 mL de etanol absoluto gelado foi adicionado e a solução incubada em gelo por 10 minutos. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação por 30 minutos, a 18000 rpm, 4 °C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspensão em 1 mL de etanol 70% e uma nova centrifugação (18000 rpm, 10 min, 4 °C) foi realizada. O processo foi repetido por mais uma vez. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensão em 100µL de TE. Ao final, quantificou-se o DNA

em Nanodrop e realizou-se a confirmação da presença do plasmídeo por eletroforese em gel de agarose 1% (Seção 3.6.4.).

#### 3.6.4. PCR e eletroforese

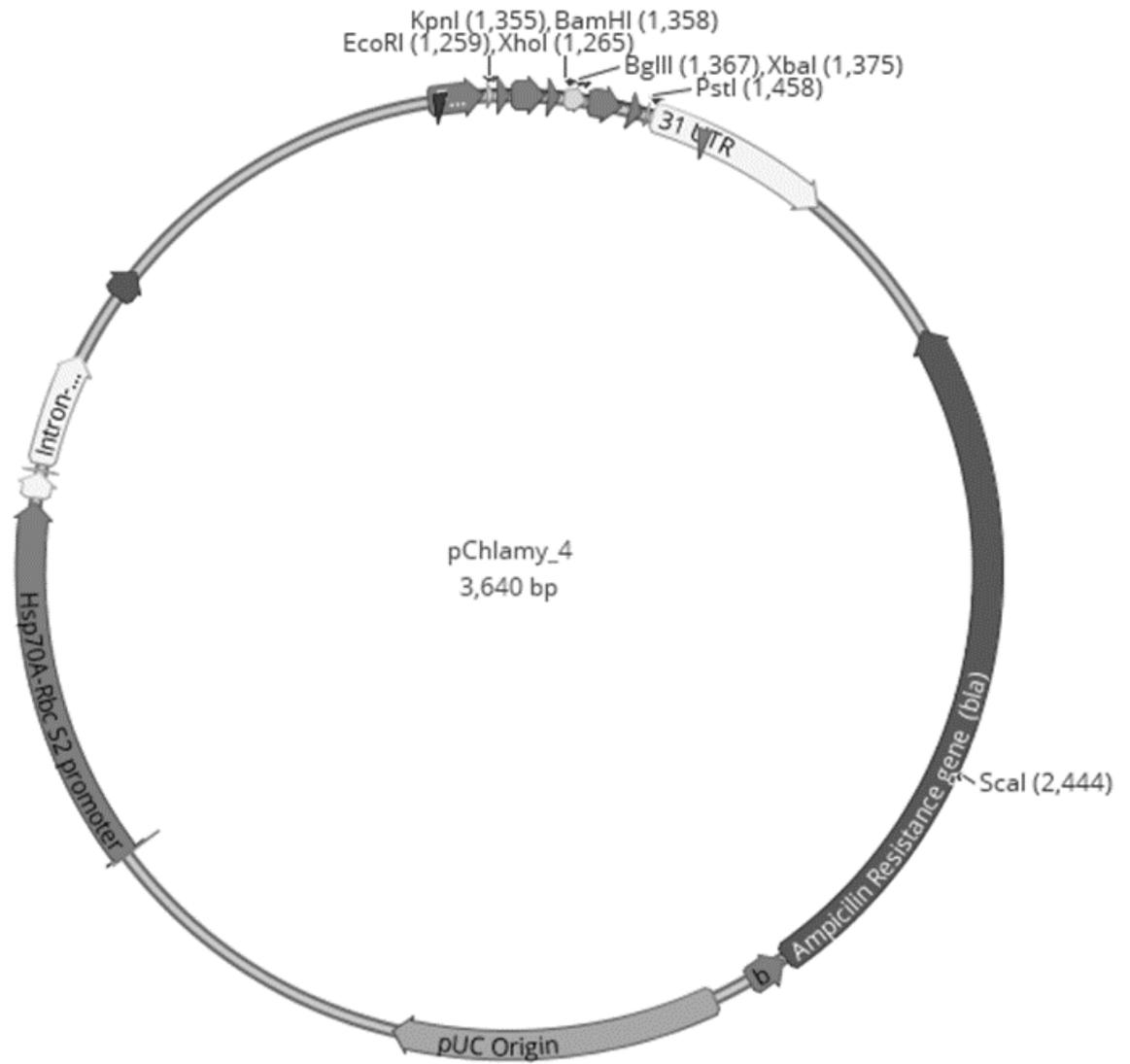
Para amplificação da região ITS2 por PCR, foram utilizados os *primers* fw\_ITS1 (5'-AGGAGAAGTCGTAACAAGGT-3') e rv\_ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Os *primers* foram desenhados para amplificar a região ITS1-5.8S-ITS4, que abarca os marcadores ITS1, ITS2, 5.8S e ITS4. Após a amplificação, a sequência é anotada e a região relacionada ao marcador ITS2 é processado conforme apresentado na seção 3.1.1.

Para detecção do gene inserido no plasmídeo pChlamy\_4, foi realizada a PCR para amplificação do fragmento com os *primers* pChlamy\_4-fw (5'-TGAAGCAGACCCTGAACT-3') e pChlamy\_4-rv (5'-AGAGCAGTATCTTCCATCCA-3'). Os *primers* foram desenhados para amplificar a região entre o peptídeo 2A e o início da região 3'-UTR do plasmídeo, abrangendo o Sítio Múltiplo de Clonagem (MCS), permitindo assim a amplificação de qualquer gene inserido na construção do plasmídeo pChlamy\_4 (Figuras 4 e 5).

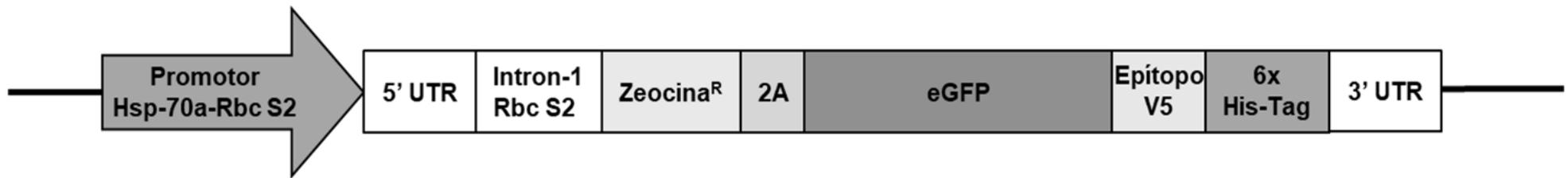
A reação de PCR foi realizada em volume de 25  $\mu$ L em um mix composto por 14,5  $\mu$ L de água miliQ, 5  $\mu$ L de GoTaq 5X PCR buffer, 1,5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  25 mM, 0,75  $\mu$ L BSA (albumina sérica bovina) 10 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,5  $\mu$ L dNTPs 10 mM, 0,25  $\mu$ L de GoTaq DNA polymerase (5 U. $\mu$ L<sup>-1</sup>) (Promega, USA), 0,25  $\mu$ L de cada par de *primers* (10  $\mu$ M) e 2,0  $\mu$ l de amostra de DNA (50–100 ng/ $\mu$ L).

Foram utilizadas as seguintes condições para a reação: desnaturação inicial a 96 °C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação - desnaturação a 96 °C

por 1 minuto, anelamento a 52 °C (fw\_ITS1 e rv\_ITS4) ou 59 °C (pChalmy\_4-fw e pChlamy\_4-rv) por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto) e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Para análise do resultado, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e os resultados foram visualizados em luz ultravioleta.



**Figura 4** - Mapa do plasmídeo pChlamy\_4 - eFFGFP, utilizado para a transformação da cepa *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39.



**Figura 5** – Esquema do cassete de expressão do vetor pChlamy\_4-eGFP.

### 3.6.5. Eletroporação da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39

Para executar a transformação da *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 com o plasmídeo pChlamy\_4-eGFP (Figura 3), um pré-inóculo foi cultivado em meio BG11, pH 7.1 por 7 dias em ciclo de iluminação 12 horas claro/12 h escuro a 25°C. A partir deste cultivo, foram realizados novos inóculos em meio BG11 (DO<sub>680</sub> inicial de 0,01). Após 3 e 6 dias de cultivo foi realizada a contagem do número de células em câmara de Neubauer. Com o resultado da contagem, foi coletado volume suficiente para se obter  $3 \times 10^7$  células. A colheita foi realizada por centrifugação a 1350 RCF por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 45 µL de tampão osmótico (Manitol 0,2 M, Sorbitol 0,2 M) gelado ao *pellet* celular. Após 40 minutos de incubação no gelo, foram adicionados 45 µL de tampão de eletroporação (Manitol 0,2 M, Sorbitol 0,2 M, KCl 0,08 M, CaCl<sub>2</sub> 0,005 M, Hepes 0,01 M - pH 7.2) gelado à suspensão, assim como plasmídeo pChlamy\_4-eGFP em diferentes concentrações (1, 5 e 10 µg). A solução foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2cm (Bio-rad) gelada e mantida no gelo por 10 minutos. Após esse período foram realizadas eletroporações nas seguintes voltagens: 200 V, 300 V, 400 V, 600 V, 800 V, 900 V e 1000 V. Foram aplicados os seguintes tempos de eletroporação: 1,5 ms, 2,5 ms, 3,5 ms. Para controle do processo, foi preparada uma amostra onde a eletroporação não foi executada, mas o plasmídeo foi adicionado à solução (referida como 0 V).

Após a eletroporação, as células foram mantidas no gelo por 10 minutos e em seguida transferidas para um microtubo de 1,5 mL contendo 1 mL de meio BG11. As células foram mantidas no escuro a 25°C por 24 horas, sendo colhidas logo após por centrifugação (1350 RCF por 10 minutos) e ressuspensas em

400  $\mu\text{L}$  de meio BG11. Em triplicata, 100  $\mu\text{L}$  ( $10^7$  células) foram semeados em meio BG11-ágar contendo diferentes concentrações de Zeocina (30, 40 e 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Como controle, o mesmo volume foi semeado em placa contendo meio BG-11 ágar sem antibiótico. As placas foram cultivadas durante 30 dias a 25 °C, com ciclo de iluminação de 12 horas claro/12 horas escuro (Protocolo adaptado de KUMAR (2018)).

### **3.6.6. PCR de colônias de microalgas**

Para confirmação da presença do plasmídeo pChlamy\_4-eGFP nas colônias de microalgas, foi realizada a PCR direta das colônias que apresentaram crescimento em placa. Para isto, com um palito estéril, parte da colônia foi coletada e transferida para um microtubo contendo 10  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril. O tubo foi então aquecido a 96 °C durante 10 minutos em termobloco para lisar as células. A partir desta solução foi realizada a PCR para detecção do plasmídeo, conforme descrito na seção 3.6.4.

### **3.6.7. Microscopia de fluorescência**

Para verificar a expressão do gene eGFP nas colônias de microalgas transformadas, foi utilizado um estereomicroscópio de fluorescência (Leica M205) para visualização das colônias. A confirmação da expressão do gene eGFP ( $\text{ex}_{\text{max}}$ : 488 nm/ $\text{em}_{\text{max}}$ :509 nm) foi realizada através da utilização do filtro GFP (ex 470/40, em 525/50). Para confirmação da colônia de microalga, foi utilizado o filtro TXRL (ex 480/40, em >610), que permite a visualização apenas da fluorescência emitida pela clorofila A ( $\text{em}_{\text{max}}$  666 nm) e clorofila B ( $\text{em}_{\text{max}}$  644 nm) (DU, 1998; DIXON, 2005), presentes na microalga.

## 4. Resultados e Discussão

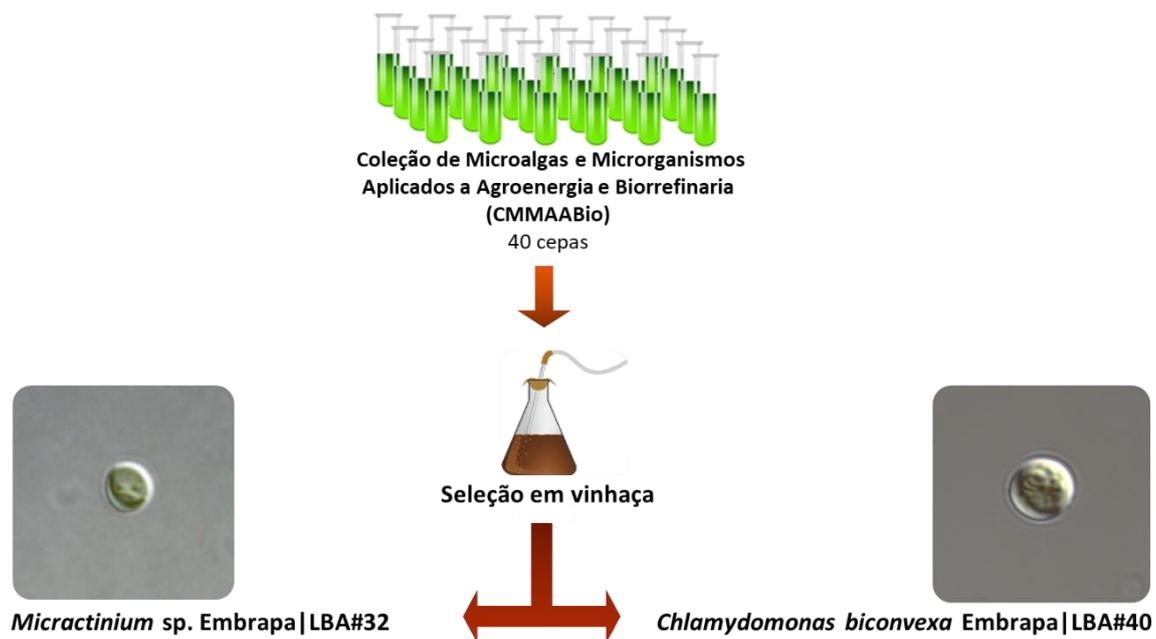
### 4.1. Caracterização da composição da biomassa algal produzida em sistemas a base de vinhaça e gás carbônico

\*Os dados apresentados nesta seção foram publicados no artigo SANTANA, H.; CEREIJO, C. R.; TELES, V. C.; NASCIMENTO, R. C.; FERNANDES, M. S.; BRUNALE, P.; CAMPANHA, R. C.; SOARES, I. P.; SILVA, F. C. P.; SABAINI, P. S.; SIQUEIRA, F. G. BRASIL, B S A F. *Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization. Bioresource technology*, v. 228, p. 133-140, 2017.

Em sua dissertação de mestrado, SANTANA (2016) selecionou duas cepas de microalgas verdes (Chlorophyta) nativas do Brasil, *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40, devido à sua capacidade de atingir alta produtividade de biomassa quando cultivadas utilizando vinhaça e gás carbônico (Figura 6).

*C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 é uma cepa, que apresenta alternância de formas palmelóides e monadóides, isolada de canal de aplicação de vinhaça de usina de etanol de cana-de-açúcar (GO/Brasil). Já *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32, trata-se de uma espécie ainda não descrita de morfologia unicelular cocóide isolada de lagoa natural do bioma amazônico (PA/Brasil) (Hadi et al., 2016).

Os resultados obtidos indicaram que o cultivo desses microrganismos em um sistema de cultivo a base de vinhaça e CO<sub>2</sub> leva a um aumento da produtividade de biomassa em comparação ao observado no cultivo realizado no meio sintético BBM, tanto em cultivo em erlenmeyers quanto em fotobiorreatores. A caracterização bioquímica inicial da biomassa obtida a partir do cultivo em fotobiorreatores também indicou um aumento significativo na produção de proteínas, carboidratos e carotenoides, indicando o seu potencial para a produção de bioprodutos.

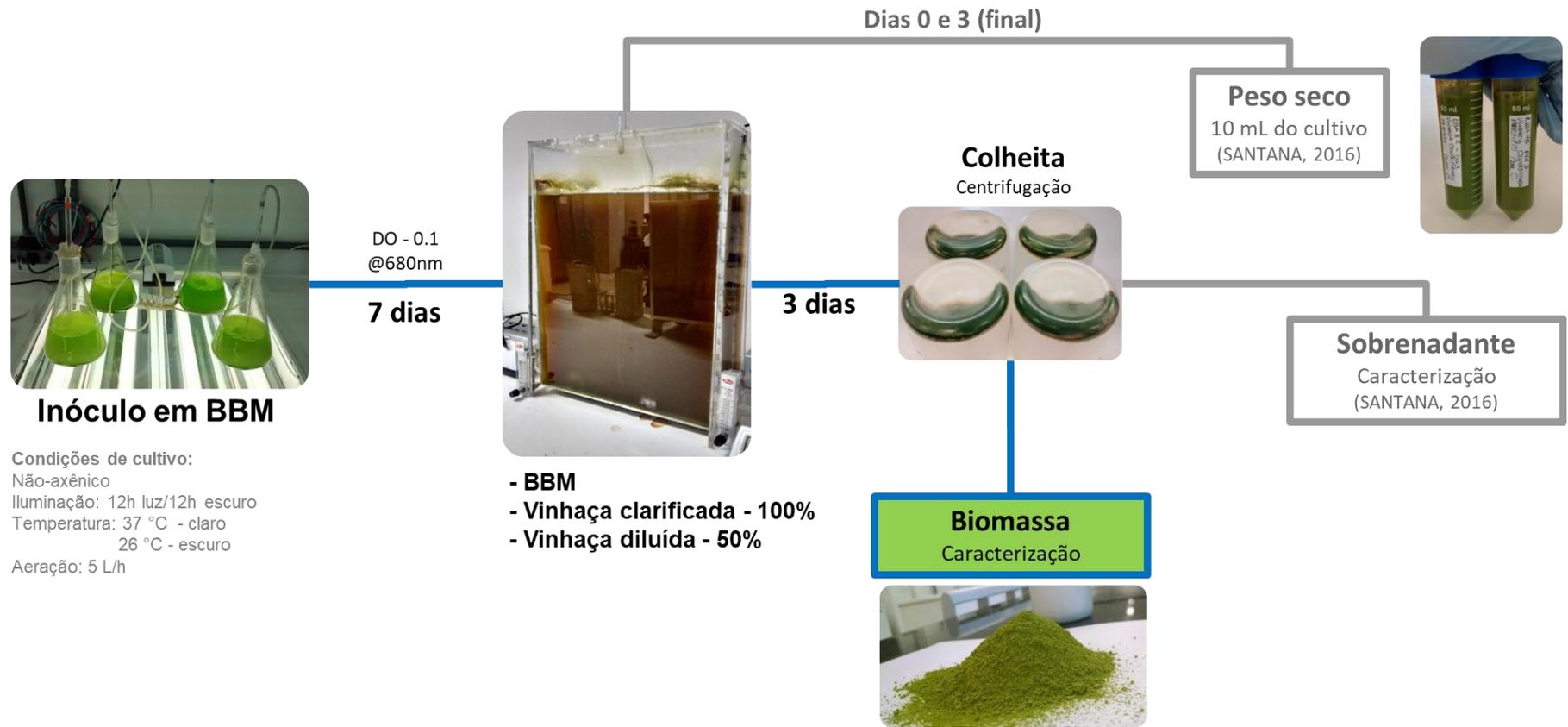


**Figura 6** - Representação do processo de seleção de cepas da CMMAABio com potencial de crescimento em vinhaça para a produção de bioprodutos.

As cepas selecionadas também tiveram o seu tipo de metabolismo determinado, sendo observado que ambas apresentam crescimento foto-heterotrófico, metabolizando o glicerol presente na vinhaça *in natura* de maneira dependente de luz.

Procedeu-se ainda a realização da caracterização bioquímica da vinhaça após o cultivo das cepas *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 em vinhaça. Os resultados indicaram que o cultivo de ambas as cepas nesse efluente leva à redução dos teores de nitrato e potássio na vinhaça, indicando um potencial de biorremediação a partir do cultivo desses microrganismos no mesmo.

No presente trabalho, avançou-se na caracterização da biomassa algal destas cepas com vistas a avaliar seu potencial energético. Para tanto, a biomassa das cepas *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 e *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 cultivadas em fotobiorreatores de placas planas *air lift* contendo 13 L de vinhaça diluída 50% em água ou vinhaça clarificada 100% como meio de cultivo, com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, sob aeração ( $64 \text{ L.h}^{-1}$  de ar atmosférico) e suplementação de 5% de  $\text{CO}_2$  foi analisada quanto ao teor e o perfil de carboidratos e ácidos graxos (Figura 7).



**Figura 7** – Representação do planejamento adotado para o cultivo de microalgas em vinhaça com o uso de fotobiorreatores de placa plana e as atividades realizadas com durante e após o cultivo.

A Tabela 5 indica que, apesar de o cultivo em vinhaça diluída a 50% e vinhaça clarificada favorecer a produtividade de biomassa em ambas as cepas, a análise da biomassa indica uma redução no teor de carboidratos em ambas as condições em comparação ao resultado obtido com o cultivo em meio BBM, possivelmente devido à composição dos meios de cultivos a base de vinhaça, que apresentam uma concentração elevada de compostos nitrogenados, conforme observado por SANTANA (2017). No entanto, esta característica não afetou negativamente a produtividade dessas moléculas em *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32, não sendo observadas diferenças significativas entre as condições avaliadas. Resultante da maior produtividade de biomassa obtida nos meios a base de vinhaça, isso é favorável para a utilização da vinhaça em substituição ao meio quimicamente definido BBM com a finalidade de produção de carboidratos. A cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 também apresentou aumento na produtividade de biomassa durante o cultivo. Porém, diferentemente do que ocorreu com a *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32, a composição e a produtividade de carboidratos não se mantiveram entre as diferentes condições, apresentando uma redução significativa de ambos os meios a base de vinhaça quando comparadas ao dado obtido com o meio padrão BBM (Tabela 5). Com esta produtividade de carboidratos, seria possível produzir em vinhaça diluída e vinhaça clarificada, respectivamente, 707,75 L de etanol.ano<sup>-1</sup> e 813,58 L de etanol.ano<sup>-1</sup> utilizando a *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 e 557,58 L de etanol.ano<sup>-1</sup> e 590,35 L de etanol.ano<sup>-1</sup> utilizando a *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 (Tabela 5).

**Tabela 5 – Produtividade e estimativa anual de produção de bioprodutos derivados de microalgas cultivadas em fotobiorreatores de placa plana.** As cepas *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40 foram cultivadas por 3 dias em BBM, vinhaça diluída a 50% e vinhaça clarificada. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de experimentos em triplicata (n=3). One-way ANOVA com o pós-teste de Tukey foi utilizado para avaliar as diferenças (p-valor < 0.05). Diferentes letras (a, b, c) indicam diferença estatisticamente significativa. A estimativa de produção anual foi feita considerando um volume de 200 m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> com 240 dias de trabalho por ano.

	<i>Micractinium</i> sp. Embrapa LBA#32			<i>Chlamydomonas biconvexa</i> Embrapa LBA#40		
	100% BBM	Vinhaça diluída a 50%	Vinhaça clarificada	100% BBM	Vinhaça diluída a 50%	Vinhaça clarificada
Teor de carboidratos (%)	28,21 ( $\pm$ 0,24)a	17,55 ( $\pm$ 0,03)b	21,79 ( $\pm$ 0,36)c	31,61 ( $\pm$ 0,18)a	13,50 ( $\pm$ 0,76)b	11,71 ( $\pm$ 0,14)c
Produtividade de carboidratos (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	28,50 ( $\pm$ 4,29)a	31,20 ( $\pm$ 1,05)a	35,87 ( $\pm$ 3,98)a	31,79 ( $\pm$ 4,88)a	24,58 ( $\pm$ 2,48)b	26,03 ( $\pm$ 1,22)b
Teor de ácidos graxos (%)	3,23 ( $\pm$ 0,55)a	2,21 ( $\pm$ 0,44)a	2,50 ( $\pm$ 1,30)a	2,06 ( $\pm$ 0,35)	1,58 ( $\pm$ 0,21) ac	1,26 ( $\pm$ 0,07)bc
Produtividade de ácidos graxos (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	3,22 ( $\pm$ 0,45)a	3,94 ( $\pm$ 0,90)a	3,99 ( $\pm$ 1,64)a	2,73 ( $\pm$ 0,64)a	2,88 ( $\pm$ 0,50)a	2,79 ( $\pm$ 0,26)a
Poder calorífico (cal.g <sup>-1</sup> )	5037,81 ( $\pm$ 16,25)a	5184,49 ( $\pm$ 36,85)b	5260,21 ( $\pm$ 44,65)b	5069,56 ( $\pm$ 34,53)a	5137,54 ( $\pm$ 17,86)bc	5114,23 ( $\pm$ 19,35)ac
<b>ESTIMATIVAS</b>						
Bioetanol (L.ano <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	646,55	707,75	813,58	716,91	557,58	590,35
Biodiesel (kg.ano <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	155,00	189,01	191,38	98,75	134,36	138,18

Estimativa de produção anual realizada considerando o volume de 200 m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> com 240 dias de trabalho por ano (CABANELAS, 2013).

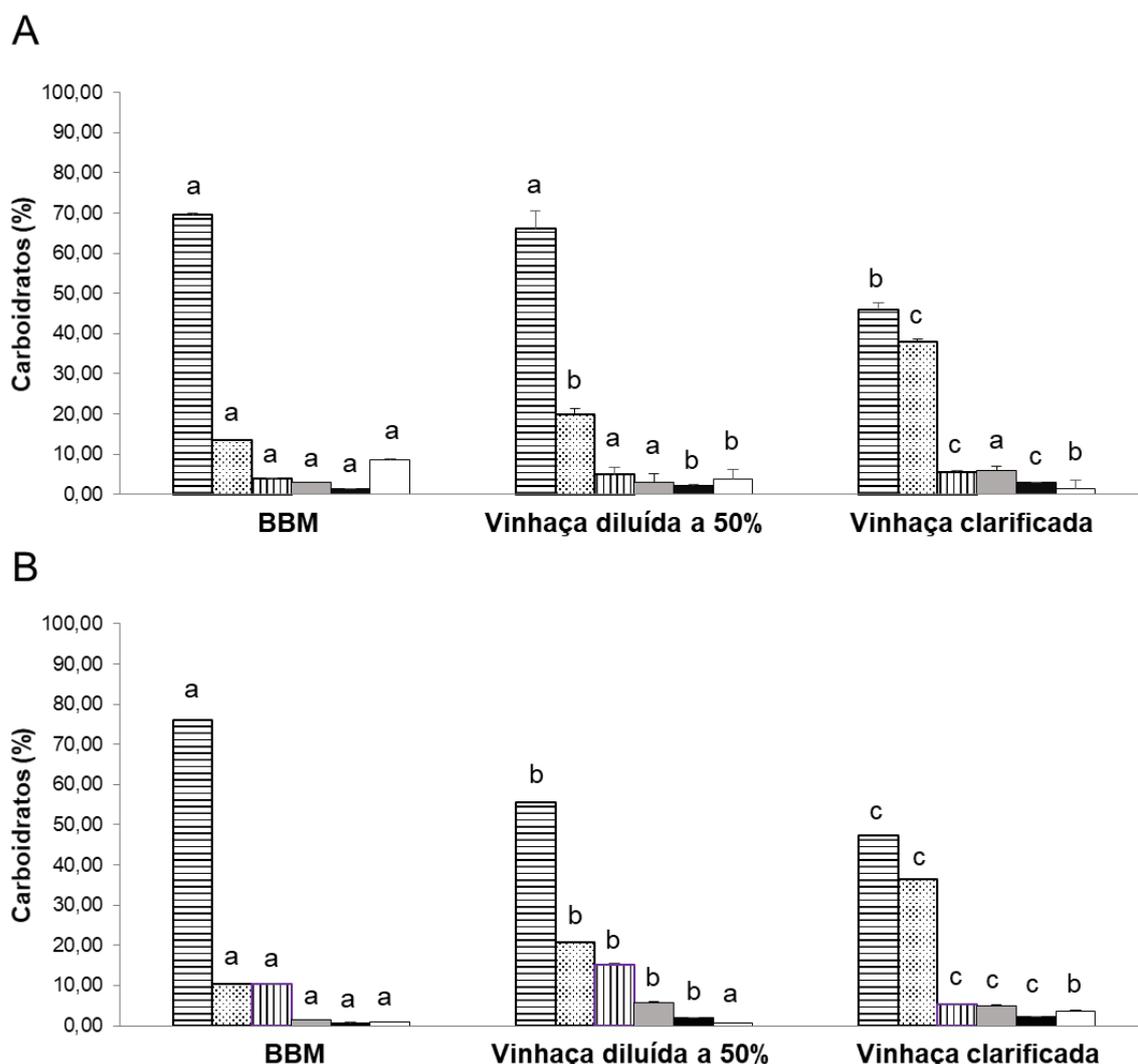
<sup>1</sup> Estimativa baseada na taxa de conversão de 0,6 L de bioetanol por kg de carboidratos totais (CABANELAS, 2013).

<sup>2</sup> Estimativa baseada na taxa de conversão de 1 kg de ácido graxo para 1 kg de biodiesel (CABANELAS, 2013).

Como apontado por CHEN (2013) e HO (2013), a disponibilidade de compostos nitrogenados no meio é de suma importância tanto para o acúmulo de carboidratos quanto de ácidos graxos. Isto pode ser verificado a partir dos resultados obtidos para exemplares dos gêneros *Chlorella* e *Chlamydomonas* cultivados em meio com restrição de nitrogênio. Nestas condições, foi possível alcançar percentuais de acúmulo de carboidratos de até 60% do peso seco da biomassa obtida. Como indicado por SANTANA (2016), a vinhaça apresenta um teor elevado de compostos nitrogenados, o que explicaria o aumento do teor de carboidratos observado quando o cultivo das cepas *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 foi realizado neste efluente. Além disso, a caracterização da vinhaça realizada por SANTANA (2016) indicou a presença de glicerol em sua composição. Este fator, como demonstrado por CABANELAS (2013), também pode favorecer a produção de carboidratos em condições não favoráveis, como é o caso do cultivo em vinhaça.

A avaliação do perfil de carboidratos da biomassa obtida com o cultivo das cepas *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 em vinhaça mostra que o principal carboidrato que compõe a biomassa de ambos os microrganismos em todas as condições testadas é a glicose (Figura 8). Isto era esperado, visto que os principais polissacarídeos que compõem a biomassa microalgal é o amido e a celulose. Por serem facilmente fermentáveis por outros microrganismos, esses polissacarídeos, compostos por monômeros de glicose em diferentes arranjos, são bons substratos para a produção de etanol. No entanto outros carboidratos também podem ser encontrados na biomassa microalgal, tais como a xilose, a manose, a galactose e o mio-inositol. O teor desses carboidratos nas células varia de acordo com as condições de cultivo em que as células são

submetidas, no entanto a xilose, a manose e a galactose apresentam menor potencial para uso na produção de etanol pois não são açúcares de uso preferencial durante a fermentação, o que pode afetar a viabilidade da produção de etanol (DEVOS e HUGENHOLTZ, 2004). Desta maneira, determinar as alterações que ocorrem em diferentes condições de cultivo é importante para estabelecer as melhores condições para obtenção de biomassa adequada à produção de etanol (CHOI, 2010; CHEN, 2013; HO, 2013).



**Figura 8** – Perfil de carboidratos da biomassa obtida com o cultivo de microalgas em fotobiorreator de placa plana. A biomassa das cepas *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 (A) e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40 (B) cultivada em BBM, vinhaça diluída a 50% e vinhaça clarificada tiveram o seu perfil de carboidratos determinado. Foi analisada a contribuição da glicose (▨), galactose (▩), manose (▧), ribose (■), mio-inositol (■) e Xilose + Arabinose (□). Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) e os resultados são representados como a média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi executada com ANOVA One-way utilizando o pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas se o p-valor < 0.05. Para cada carboidrato, diferentes letras (a, b, c) representam diferenças estatisticamente significativa.

É possível observar nas figuras 8A e 8B que, comparado ao perfil de carboidratos verificado na biomassa obtida com o cultivo no meio BBM, ambas as cepas apresentaram alterações significativas em seu perfil. Para a *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32, o teor de glicose, manose e ribose permaneceu constante na vinhaça diluída, com uma elevação nos níveis de galactose e mio-inositol, e redução dos níveis de xilose e arabinose. Por outro lado, na vinhaça clarificada houve alterações significativas principalmente no teor de glicose e galactose, com destaque para o aumento observado deste último (Figura 6A). Na *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40, quando o cultivo foi realizado em ambos os meios a base de vinhaça, houve uma alteração no perfil de carboidratos similar ao observado na biomassa da *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32, com a redução no teor de glicose e o aumento da presença de galactose em sua composição (Figura 8B). Apesar de ambos os açúcares serem fermentescíveis, a maior parte dos microrganismos não consegue metabolizar a galactose antes de ocorrer a depleção de glicose no meio, o que compromete a viabilidade da utilização do processo em larga escala (DE VOS e HUGENHOLTZ, 2004). Considerando as características de produção de carboidratos em vinhaça, se faz necessária a otimização do cultivo das microalgas neste efluente, tal como os níveis de oxigênio, pH e níveis de CO<sub>2</sub> para que a produção de etanol a partir da biomassa microalgal cultivada em vinhaça possa ser realizada.

A avaliação da produção de ácidos graxos mostrou que, assim como ocorre com o teor de carboidratos, o cultivo em vinhaça leva à redução do teor de ácidos graxos na biomassa das cepas *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 (Tabela 5). Como apontado por CHEN (2013) e

WANG (2013), assim como ocorre com os carboidratos, o acúmulo de ácidos graxos na biomassa das microalgas está inversamente relacionado à disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo. Em SANTANA (2016), foi possível verificar que tanto a vinhaça diluída quanto a vinhaça clarificada apresentam teor de compostos nitrogenados maior que o disponível no meio BBM, o que indica a associação entre este parâmetro e a redução do teor de ácidos graxos e carboidratos na biomassa microalgal.

Após a determinação do perfil de ácidos graxos da biomassa produzida, verificou-se que há uma variação considerável entre aquela observada na biomassa produzida em meio BBM e a biomassa obtida quando os meios a base de vinhaça foram utilizados (Tabela 6). Como apontado por RAMOS (2009), a composição de óleo gerado desempenha um importante papel em algumas características críticas do biodiesel, como o número de cetano (CN) e as propriedades de fluxo a frio. Essas características são influenciadas pela presença ou não de insaturações, e a extensão da cadeia lipídica, cuja proporção varia entre diferentes espécies ou mesmo entre cepas (cultivares, no caso de plantas) diferentes de um mesmo microrganismo. Em linhas gerais, quanto mais insaturada é uma cadeia lipídica (i.e. C18:2, C18:3) menor o CN do biodiesel gerado. A relação inversa também ocorre, o que resulta em um combustível de maior CN. Este parâmetro (CN) é amplamente utilizado para avaliação da qualidade do diesel, e está relacionado ao tempo de ignição e a qualidade da combustão do mesmo. Portanto, um CN mais elevado resulta em um combustível de maior qualidade (KNOTHE, 2003; RAMOS, 2009).

**Tabela 6** – Perfil de FAME (Biodiesel) das cepas *Micractinium sp.* Embrapa|LBA#32 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40. As cepas foram cultivadas durante três dias em fotobiorreatores de placa plana utilizando meio BBM (Bold's Basal Medium), vinhaça diluída a 50% ou vinhaça clarificada. N.D. = Não detectado. Os dados são representados como percentual (%) do teor do total de ácido graxos

FAME	Ácido graxo	<i>Micractinium sp.</i> Embrapa LBA#32			<i>C. biconvexa</i> Embrapa LBA#40		
		100% BBM	Vinhaça diluída a 50%	Vinhaça clarificada	100% BBM	Vinhaça diluída a 50%	Vinhaça clarificada
Metil hexanoato	C6:0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.04 (± 0.00)
Metil dodecanoato	C12:0	1.99 (± 0.01)	1.59 (± 0.04)	1.33 (± 0.03)	1.59 (± 0.01)	1.30 (± 0.02)	N.D.
Metil tridecanoato	C13:0	15.78 (± 0.58)	20.54 (± 0.41)	22.77 (± 0.48)	6.74 (± 0.41)	24.45 (± 1.31)	27.20 (± 0.83)
Metil miristato	C14:0	N.D.	2.14 (± 0.08)	2.18 (± 0.03)	N.D.	1.96 (± 0.02)	1.56 (± 0.02)
Metil miristoleato	C14:1(n5)	N.D.	N.D.	0.86 (± 0.02)	N.D.	N.D.	2.18 (± 0.01)
Metil pentadecanoato	C15:0	1.31 (± 0.01)	N.D.	N.D.	1.11 (± 0.01)	N.D.	1.67 (± 0.18)
Metil cis-10-pentadecanoato	C15:0	2.25 (± 0.01)	N.D.	N.D.	1.92 (± 0.02)	N.D.	2.61 (± 0.04)
Metil palmitato	C16:0	20.44 (± 0.14)	28.24 (± 0.28)	25.98 (± 0.18)	19.48 (± 0.17)	26.56 (± 0.43)	25.15 (± 0.46)
Metil palmitoleato	C16:1(n7)	0.99 (± 0.00)	1.66 (± 0.07)	1.35 (± 0.57)	3.35 (± 0.07)	1.39 (± 0.05)	1.51 (± 0.02)
Metil heptadecanoato	C17:0	6.04 (± 0.04)	3.68 (± 0.12)	N.D.	2.20 (± 0.02)	N.D.	N.D.
Metil cis-10-heptadecanoato	C17:0	N.D.	3.68 (± 0.12)	3.75 (± 0.04)	N.D.	3.13 (± 0.02)	2.65 (± 0.08)
Metil estearato	C18:0	1.73 (± 0.02)	4.19 (± 0.10)	2.40 (± 0.01)	1.49 (± 0.01)	3.31 (± 0.07)	3.02 (± 0.08)
Metil oleato	C18:1(n9)	2.46 (± 0.02)	8.24 (± 0.25)	5.60 (± 0.04)	9.39 (± 0.06)	10.99 (± 0.30)	8.51 (± 0.22)
Metil elaidato	C18:1(n9)	8.54 (± 0.06)	1.71 (± 0.08)	0.90 (± 0.00)	1.53 (± 0.01)	1.05 (± 0.01)	N.D.
Metil linoleato	C18:2(n6)	19.65 (± 0.14)	10.40 (± 0.15)	12.75 (± 0.03)	9.64 (± 0.06)	7.66 (± 0.16)	12.73 (± 0.64)
Metil linolelaidato	C18:2(n6)	N.D.	N.D.	0.87 (± 0.03)	N.D.	N.D.	N.D.
Metil linolenato	C18:3(n3)	15.28 (± 0.12)	4.11 (± 0.14)	2.46 (± 0.10)	15.42 (± 0.11)	5.17 (± 0.16)	2.20 (± 0.13)
Metil araquidato / Metil γ-linolenato	C20:0	N.D.	N.D.	N.D.	1.95 (± 0.03)	N.D.	N.D.
Metil heneicosanoato	C21:0	N.D.	N.D.	N.D.	0.90 (± 0.01)	N.D.	N.D.
Metil-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoato	C22:6(n3)	N.D.	1.56 (± 0.11)	1.60 (± 0.06)	N.D.	1.33 (± 0.05)	1.84 (± 0.06)
Metil tricosanoato	C23:0	N.D.	N.D.	2.47 (± 0.17)	N.D.	1.16 (± 0.02)	1.61 (± 0.61)
Metil tetracosanoato	C24:0	N.D.	N.D.	0.93 (± 0.03)	N.D.	N.D.	N.D.
Metil cis-15-tetracosanoato	C24:1(n9)	N.D.	0.92 (± 0.07)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
OUTROS (Não caracterizados)	-	3.55 (± 0.03)	7.33 (± 0.40)	11.79 (± 0.43)	23.3 (± 10.93)	10.54 (± 0.17)	4.51 (± 0.09)

Os resultados deste trabalho mostraram que a proporção entre o teor de ácidos graxos saturados e insaturados na biomassa produzida em BBM, para ambas as cepas, permanece numa proporção de aproximadamente 1:1 (Tabela 7), considerando apenas os ácidos graxos caracterizados. Quando o cultivo é feito em vinhaça, observa-se na distribuição dos perfis de ácidos graxos. Para ambas as cepas e ambos os meios de cultivo, a proporção entre saturados e insaturados passou a ser de aproximadamente 2,3:1 (Tabela 7). Esta característica é um indicativo de que o cultivo da *Micractinium sp.* Embrapa|LBA#32 e da *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 em vinhaça pode gerar um biodiesel de boa qualidade como produto final. Isto se deve ao fato de que cadeias carbônicas longas (13-21 C) e com alto grau de saturação resultam em uma heterogeneidade da queima do combustível e reduz a deposição de resíduos nas partes internas do motor (LÔBO, 2009). Outro parâmetro considerado é a estabilidade oxidativa do combustível. Isto está diretamente ligado ao grau de insaturação dos ácidos graxos. Quanto maior o grau, mais propenso à oxidação e à degradação térmica o combustível está. Isto torna necessária adição de estabilizantes ao combustível para que ele conserve as suas propriedades (LÔBO, 2009; GRIFFITHS, 2012). Apesar de os resultados obtidos indicarem que o biodiesel produzido a partir de ambas as cepas pode ser produzido com boa qualidade, ainda há a necessidade de se realizar a otimização do sistema de cultivo para que o acúmulo desses componentes seja possível em níveis que permitam a sua aplicabilidade em larga escala.

**Tabela 7** – Características dos ácidos graxos que compõem a biomassa das cepas *Micractinium sp.* Embrapa|LBA#32 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40 cultivadas em diferentes meios de cultivo. Os dados são representados como percentual (%) do teor do total de ácido graxos.

	<i>Micractinium sp.</i> Embrapa LBA#32			<i>C. Biconvexa</i> Embrapa LBA#40		
	100% BBM	Vinhaça diluída a 50%	Vinhaça clarificada	100% BBM	Vinhaça diluída a 50%	Vinhaça clarificada
<b>Saturados</b>	49,54	64,06	61,81	37,38	61,87	66,51
<b>Insaturados</b>	46,92	28,6	26,39	39,33	27,59	28,97
Mono (Cn1)	11,99	12,53	8,71	14,27	13,43	12,2
Poli (Cn2,3)	34,93	16,07	17,68	25,06	14,16	16,77
<b>Extensão da cadeia</b>						
Curta (< 6 C)	0	0	0	0	0	1,04
Média (6-12 C)	1,99	1,59	1,33	1,59	1,3	0
Longa (13-21 C)	94,47	88,59	81,87	75,12	85,67	90,99
Mito longa (>22 C)	0	2,48	5	0	2,49	3,45

Outro potencial de aplicação da biomassa microalgal é na produção de energia a partir da queima da biomassa gerada. Isto apresenta relevância especialmente para a manutenção da viabilidade econômica em um sistema de biorrefinaria como o da indústria suco-energética (Figura 2). A análise do potencial energético da biomassa obtida neste estudo (Tabela 5) mostra que o poder calorífico da biomassa microalgal é bastante similar ao do bagaço da cana-de-açúcar, que é usualmente utilizada para a produção de energia em plantas de produção de etanol (DIAS, 2011) e não variou significativamente entre os diferentes meios utilizados para produção da biomassa. Apesar desta característica, a biomassa microalgal apresenta como limitante o fato de apresentar aproximadamente 60% de água em sua composição, o que requer um gasto energético de ao menos 19% ( $\text{cal.g}^{-1}$ ) da energia obtida a partir da queima da biomassa. A viabilidade de utilização da biomassa microalgal com esta finalidade, no entanto, ainda requer uma análise tecno-econômica para que possa se determinar o potencial efetivo de geração energética a partir desta biomassa.

Cabe ressaltar que, embora o presente trabalho objetive avaliar o potencial de utilização da biomassa algal para produção de biocombustíveis e energia, a geração de outros coprodutos não deve ser negligenciada. De fato, estudos de SANTANA (2016) demonstram que a fração majoritária da biomassa de *Micractinium sp.* Embrapa|LBA#32 e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 é composta por proteínas, variando de 30,96% a 41,68%. Inclusive, os meios a base de vinhaça proporcionaram aumento tanto no teor quanto na produtividade de proteínas comparativamente ao meio BBM (SANTANA, 2016).

Há, portanto, oportunidades futuras para avaliação da biomassa algal produzida em vinhaça para nutrição animal, especialmente peixes e aves, assim como a utilização desta biomassa como insumo para promoção do crescimento de plantas.

#### 4.2. Criopreservação de microalgas cultiváveis em sistemas a base de vinhaça e gás carbônico

\*Os dados apresentados nesta seção foram publicados no artigo *FERNANDES, M. S.; CALSING, L. C. G.; NASCIMENTO, R. C.; SANTANA, H.; MORAIS, P. B.; DE CAPDEVILLE, G.; BRASIL, B. S. A. F. Customized cryopreservation protocols for chlorophytes based on cell morphology. Algal Research, v. 38, p. 101402, 2019.*

A manutenção de microalgas metabolicamente ativas durante longos períodos de tempo, por meio de subcultivos sucessivos, é um processo laborioso, caro e susceptível a contaminações microbianas e perdas de variabilidade por deriva genética. Por outro lado, a manutenção destes microrganismos mediante criopreservação é uma alternativa valiosa para evitar estes problemas, uma vez que os mantêm em um estado metabólico inativo, além de facilitar trabalhos subsequentes de transformação e melhoramento genético (ANDRADE e COLOZZI FILHO, 2014).

Todavia, o desenvolvimento e otimização de processos de criopreservação não é trivial, uma vez que comumente ocorre extensa lise celular decorrente da formação de cristais de gelo intracitoplasmáticos durante o congelamento e conseqüente perda da viabilidade. De modo a minimizar este fenômeno e incrementar a criovitalidade celular, diferentes substâncias químicas podem ser utilizadas como agentes crioprotetores (ACPs), como glicerol, dimetilsulfóxido, metano, polietilenoglicol, sorbitol, manitol e trealose (ROCHA, 2013). Além da substância crioprotetora utilizada, características como espécie, estrutura celular (morfologia), fase de crescimento/cultivo, teor de água da célula e taxa de resfriamento também podem afetar o sucesso da criopreservação (HUBALEK, 2003; AGUIAR, 2012).

Uma vez que as cepas *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 e *Micractinium* sp. Embrapa |LBA#32 foram selecionadas e caracterizadas quanto ao seu potencial

para produção de biomassa e energia em sistemas a base de vinhaça e CO<sub>2</sub> (Seção 4.1.), faz-se necessária a preservação a longo prazo destes recursos genéticos. No entanto, não há método universal disponível para preservação de microalgas, uma vez que a resposta de espécies distintas de algas aos agentes crioprotetores e protocolos de criogenia é bastante variável e imprevisível (TAYLOR e FLETCHER, 1998).

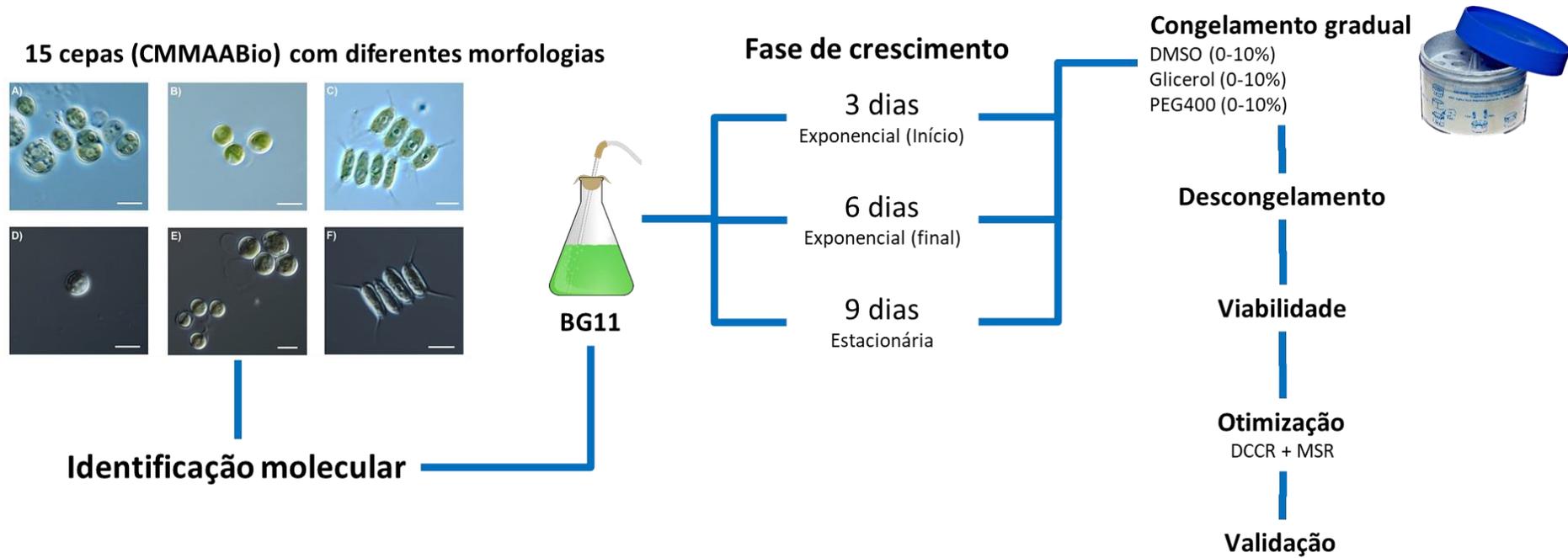
Deste modo, paralelamente a este trabalho de doutoramento, a equipe do Laboratório de Biotecnologia de Algas da Embrapa Agroenergia dedicou-se à padronizar protocolos de criopreservação para as cepas de microalgas disponíveis na Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicadas a Agroenergia e Biorrefinarias da Embrapa - CMMAABio (Brasília/DF – Brasil) (FERNANDES, 2017). A hipótese do referido trabalho postulava que fatores biológicos intrínsecos (morfologia celular e origem filogenética) desempenham um papel na definição de qual idade de cultura e tipo e concentração de agente crioprotetor devem ser utilizados para obter uma criopreservação bem-sucedida.

Para que isso fosse possível, foi realizada a seleção e identificação molecular por meio do sequenciamento da região de DNA nuclear Internal Transcribed Sequence 2 (ITS2) de 15 cepas da CMMAABio representativas das morfologias algais cenobial, cocóide e palmelóide, incluindo as cepas *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 (palmelóide) e *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 (cocóide) (Tabela 8). Estas cepas foram submetidas à criopreservação seguindo protocolos padronizados por FERNANDES (2017), conforme representado na Figura 9.

**Tabela 8** – Identificação molecular das cepas estudadas para determinação da condição ótima de criopreservação, incluindo o percentual de identidade, número de acesso e o nome de identificação da cepa com base no marcador *nulTS2*.

Morfologia	Cepa	Acesso no GenBank	Marcador molecular	Identificação	Similaridade	Maior similaridade (GenBank)
Cenobial	Embrapa LBA#35	<a href="#">KT308071</a>	<i>nulTS2</i>	<i>Desmodesmus spinosus</i>	99.6%	<a href="#">AB917128.1</a>
	Embrapa LBA#54	<a href="#">MF357034</a>	<i>nulTS2</i>	<i>Desmodesmus sp.</i>	98.0%	<a href="#">AM410658</a>
	Embrapa LBA#59	<a href="#">MF346374</a>	<i>nulTS2</i>	<i>Desmodesmus armatus*</i>	99.6%	<a href="#">KT159282</a>
	Embrapa LBA#73	<a href="#">MF346376</a>	<i>nulTS2</i>	<i>Desmodesmus sp.*</i>	88.1%	<a href="#">JX046425</a>
	Embrapa LBA#85	<a href="#">MF346378</a>	<i>nulTS2</i>	<i>Desmodesmus pleiomorphus</i>	100%	<a href="#">AY461362</a>
Cocóide	Embrapa LBA#32	<a href="#">KT308068</a>	<i>nulTS2</i>	<i>Micractinium sp.</i>	99.6%	<a href="#">FM205863.1</a>
	Embrapa LBA#36	<a href="#">KT308072</a>	<i>nulTS2</i>	<i>Desmodesmus sp.</i>	100%	<a href="#">EU502836.1</a>
	Embrapa LBA#39	<a href="#">KT308075</a>	<i>nulTS2</i>	<i>Chlorella sorokiniana</i>	100%	<a href="#">KJ676113.1</a>
	Embrapa LBA#61	<a href="#">MF346375</a>	<i>nulTS2</i>	Scenedesmaceae sp.	90,8%	<a href="#">JX046425</a>
	Embrapa LBA#77	<a href="#">MF346377</a>	<i>nulTS2</i>	<i>Desmodesmus sp.</i>	100%	<a href="#">MF346376</a>
Palmelóide	Embrapa LBA#06	<a href="#">KT445861</a>	<i>nulTS2</i>	Chlamydomonadales sp.	94.7%	<a href="#">KT308054</a>
	Embrapa LBA#17	<a href="#">KT308054</a>	<i>nulTS2</i>	Chlamydomonadales sp.	92.5%	<a href="#">AB983644.1</a>
	Embrapa LBA#40	<a href="#">KT308076</a>	<i>nulTS2</i>	<i>Chlamydomonas biconvexa*</i>	94.7%	<a href="#">MF162271</a>
	Embrapa LBA#48	<a href="#">MF346373</a>	<i>nulTS2</i>	Chlorococcaceae sp.	93.2%	<a href="#">KX147341</a>
	Embrapa LBA#51	<a href="#">KT308086</a>	<i>nulTS2</i>	Chlorococcaceae sp.	93.2%	<a href="#">KX147341</a>

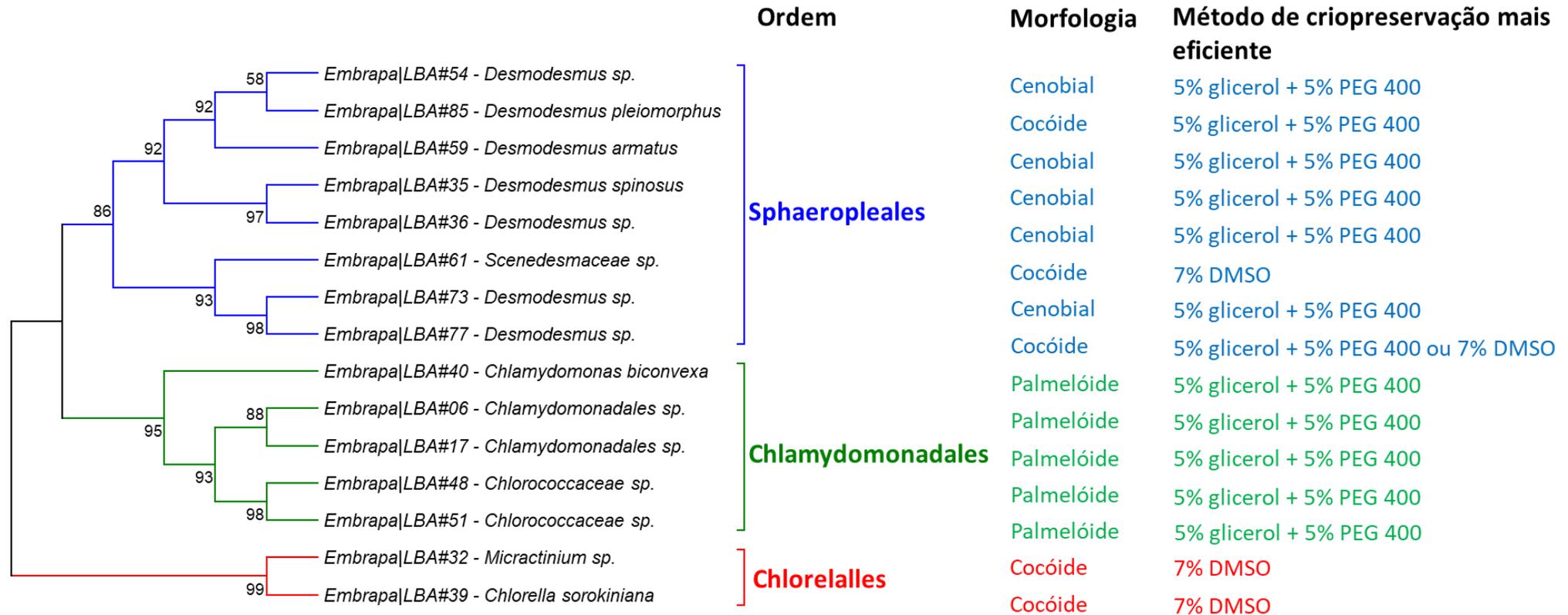
\* Confirmação morfológica



**Figura 9** – Representação simplificada dos procedimentos adotados por FERNANDES (2017) para o estabelecimento de protocolos de criopreservação para cepas de microalgas da CMMAABio. DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional. MSR - Metodologia de superfície de resposta.

Em seguida foi realizada análise filogenética utilizando método GTR (*General Time Reversible*), o que permitiu a comparação e verificação de alta correlação entre a filogenia e morfologia da cepa algal e o método de criopreservação mais eficiente identificado (Figura 10). Deste modo, o protocolo e agente crioprotetor mais adequado para cada tipo morfológico algal pode ser definido e padronizado para aplicação em as cepas que compõe a CMMAABio (Brasília/DF – Brasil).

Os resultados indicaram apesar de existir uma forte correlação com a ordem a qual os microrganismos pertencem, a morfologia da microalga apresenta uma maior influência na eficiência de criopreservação com cada um dos criopreservantes avaliados. Cepas que apresentam morfologia cenobial apresentam melhores taxas de recuperação quando criopreservados com o uso de 5% de glicerol + 5% de PEG 400, sendo observados resultados similares para cepas palmelóides. Por outro lado, cepas cocóide apresentam melhores resultados quando 7% de DMSO é utilizado.



**Figura 10** - Relação entre filogenia da cepa, morfologia e o método ótimo de criopreservação. A árvore filogenética foi construída utilizando o método GTR (*General Time Reversible*) do conjunto de dados de e135 posições alinhadas de 15 sequências de nucleotídeos de marcadores ITS2. Para a análise, o modelo GTR com sítios invariáveis (I) e o parâmetro de forma da distribuição gamma (G) (GTR+G+I) foi utilizado. O valor de bootstrap (1000 replicatas) é exibido próximo às ramificações.

### 4.3. Transformação genética de microalgas verdes cultiváveis em vinhaça

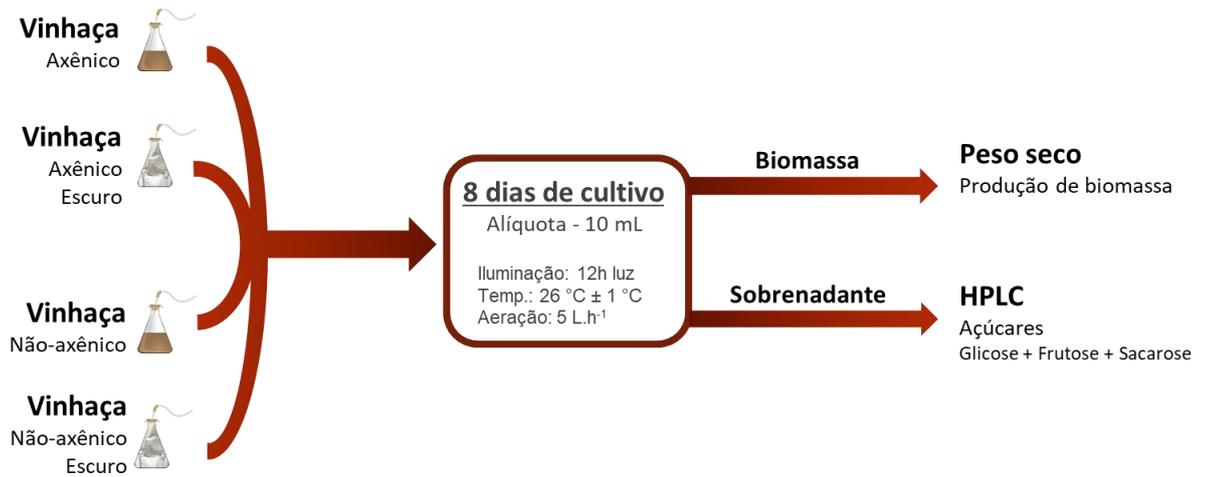
Embora os níveis de produtividade obtidos com o cultivo de *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 e *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 em meio a base de vinhaça e CO<sub>2</sub> sejam promissores (Seção 4.1), ainda são insuficientes para a sua viabilização comercial. Neste sentido, o estabelecimento de um programa de melhoramento genético por meio da utilização de técnicas de biotecnologia avançada poderia permitir alcance de maiores produtividades e/ou direcionamento para o acúmulo e produção de biomoléculas de interesse. Além disso, o estabelecimento de protocolos de transformação genética poderia permitir que estas cepas sejam utilizadas para a expressão de proteínas heterólogas, como a produção de enzimas celulases, o que poderia ser associado à produção de etanol de segunda geração em uma usina sucro-energética em um contexto de biorrefinaria (Figura 2).

Dentre as duas cepas capazes de crescer em vinhaça avaliadas (Seção 4.1), a cepa *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40 foi selecionada para os testes iniciais de transformação genética. Os motivos desta escolha foram a indisponibilidade de informações genéticas na literatura para o gênero *Micractinium* e a grande disponibilidade de ferramentas moleculares e estudos genéticos disponíveis para a espécie *Chlamydomonas reinhardtii*, protótipo do gênero. Todavia, as inúmeras tentativas de transformação genética de *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 por eletroporação, utilizando protocolos previamente descritos na literatura (RASALA, 2012) não apresentaram resultados positivos (dados não mostrados).

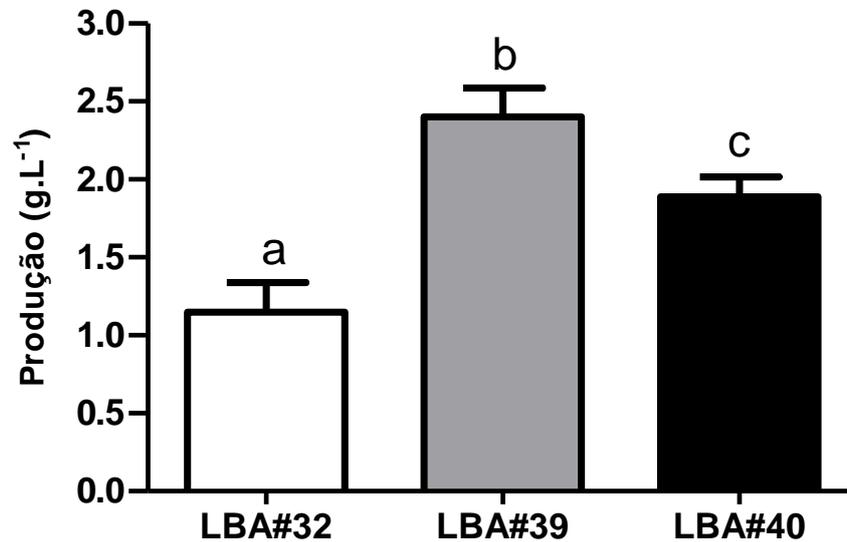
Tendo em vista o exposto acima, foi adotada uma nova estratégia de trabalho que objetivou a identificação dentre as cepas depositadas na CMMAABio de uma espécie cuja genética, ferramentas moleculares e protocolos de transformação fossem conhecidos. A cepa escolhida foi a *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39

que foi submetida à avaliação para a capacidade crescimento em vinhaça. Cabe ressaltar que a cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 também teve seu protocolo de criopreservação validado e padronizado anteriormente (Figura 10). Microalgas do gênero *Chlorella*, especialmente da espécie *C. sorokiniana*, estão dentre as mais estudadas para a produção de biocombustíveis e biomassa para alimentação. Isto se deve ao fato dos organismos desse gênero serem capazes de crescer rapidamente e acumular um teor elevado de carboidratos, lipídeos e proteínas, se destacando especialmente nestes últimos elementos, os quais podem chegar a compor 50% do biomassa seca dessas espécies (MALCATA, 2011; KUMAR e DAS, 2012).

O cultivo da cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 em vinhaça diluída em água a 50% durante 8 dias em erlenmeyer, com uso de ar atmosférico (Figura 11), mostrou que ao final do cultivo a produção de biomassa foi superior ao das demais cepas previamente avaliadas, apresentando uma produção de biomassa de 2,4 g.L<sup>-1</sup>, significativamente superior àquela observada para a *C. biconvexa* Embrapa|LBA#40 nas mesmas condições de cultivo (Figura 12). *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 apresentou produtividade de 300 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, também superior ao observado para as demais cepas quando o cultivo foi realizado em fotobiorreator (SANTANA, 2017).



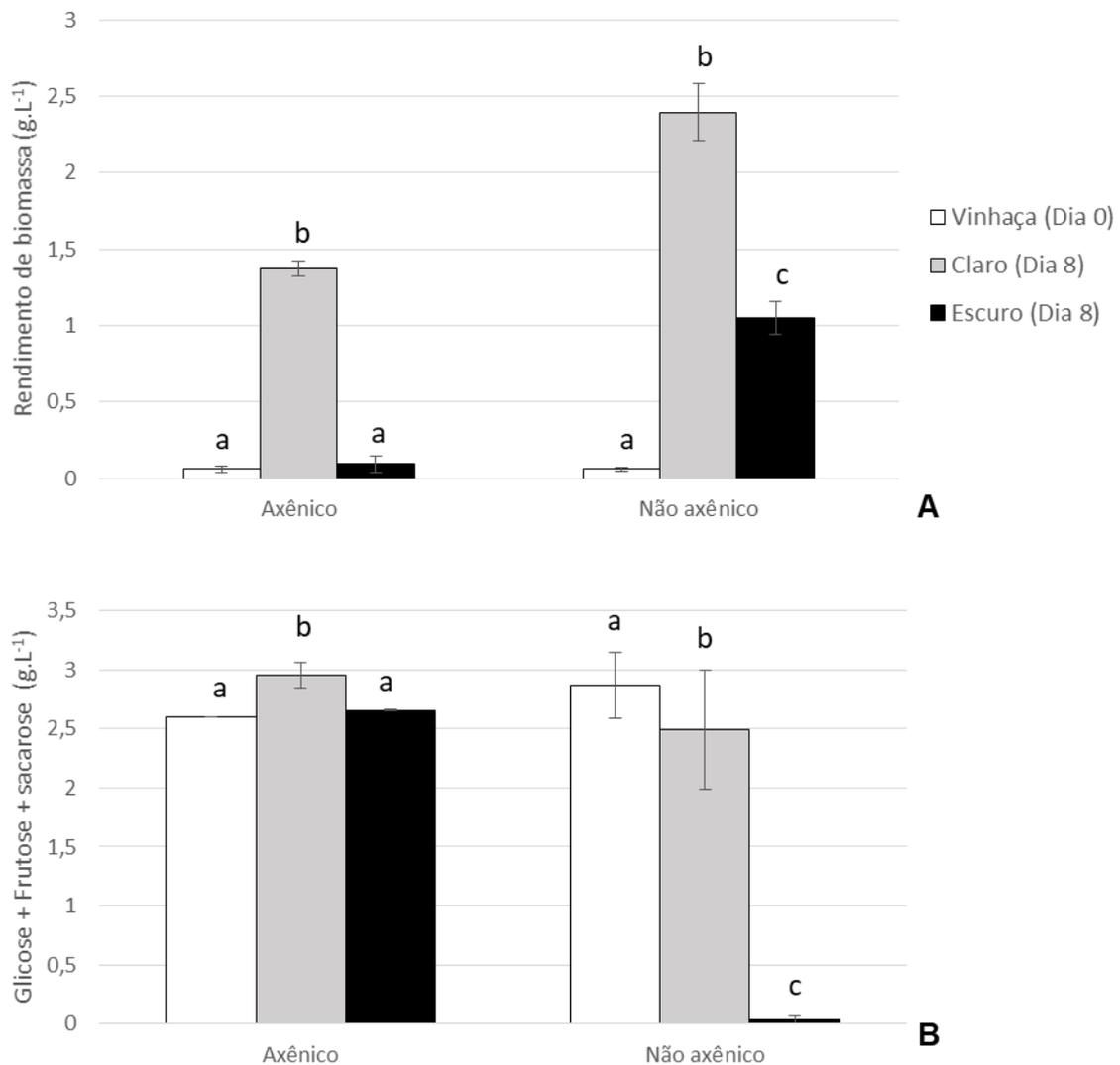
**Figura 11** – Planejamento adotado para a determinação do tipo de metabolismo realizado pela microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39.



**Figura 12** – Produção de biomassa das cepas de microalga cultivadas em vinhaça diluída em água a 50%. Os cultivos foram realizados sob regime de iluminação com 12 horas de claro/12h de escuro a  $26\pm 1^\circ\text{C}$  durante 8 dias. O experimento foi conduzido em triplicata ( $n = 3$ ), com os resultados sendo apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi executada com ANOVA One-way utilizando o pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significantes se o  $p$ -valor  $< 0.05$ . Diferentes letras (a, b, c) indicam diferenças significantes.

É reconhecido que a produção de biomassa microalgal pode ser aumentada caso o meio de cultivo seja rico em açúcares redutores, como a glicose, a exemplo da vinhaça, efluente resultante da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. Isso, no entanto, é dependente do tipo de metabolismo da microalga, que pode ser fotoautotrófico (luz-dependente), foto-heterotrófico (dependente de luz e carbono orgânico) ou mixotrófico (dependente de luz ou carbono orgânico). A cepa *Chlorella sorokiniana* Embrapa/LBA#39 é um microrganismo capaz de crescer neste efluente, no entanto o tipo de metabolismo da mesma ainda é desconhecido. De maneira a se determinar o tipo de metabolismo da *C. sorokiniana* Embrapa/LBA#39 em vinhaça, a mesma foi cultivada neste efluente em quatro condições: com iluminação e sem iluminação, em condições axênicas e não-axênicas. Nestas condições, foram avaliadas a produção de biomassa, determinada pela mensuração do peso seco dos dias inicial e final, e o metabolismo de açúcares redutores (AR) e sacarose em vinhaça, determinado a partir da análise do sobrenadante dos cultivos.

Os dados obtidos demonstraram que em condições axênicas houve aumento de biomassa apenas quando o cultivo foi realizado sob regime de iluminação (Figura 13A). Quando realizado em condições não-axênicas, em ambas as condições foi observado um aumento significativo no rendimento de biomassa. No entanto, em condições de iluminação o aumento foi 2,27 vezes maior que o observado quando realizado no escuro, indicando que o metabolismo desta cepa é dependente de luz. Nesta situação, o aumento de biomassa foi atribuído ao crescimento de contaminantes heterotróficos.



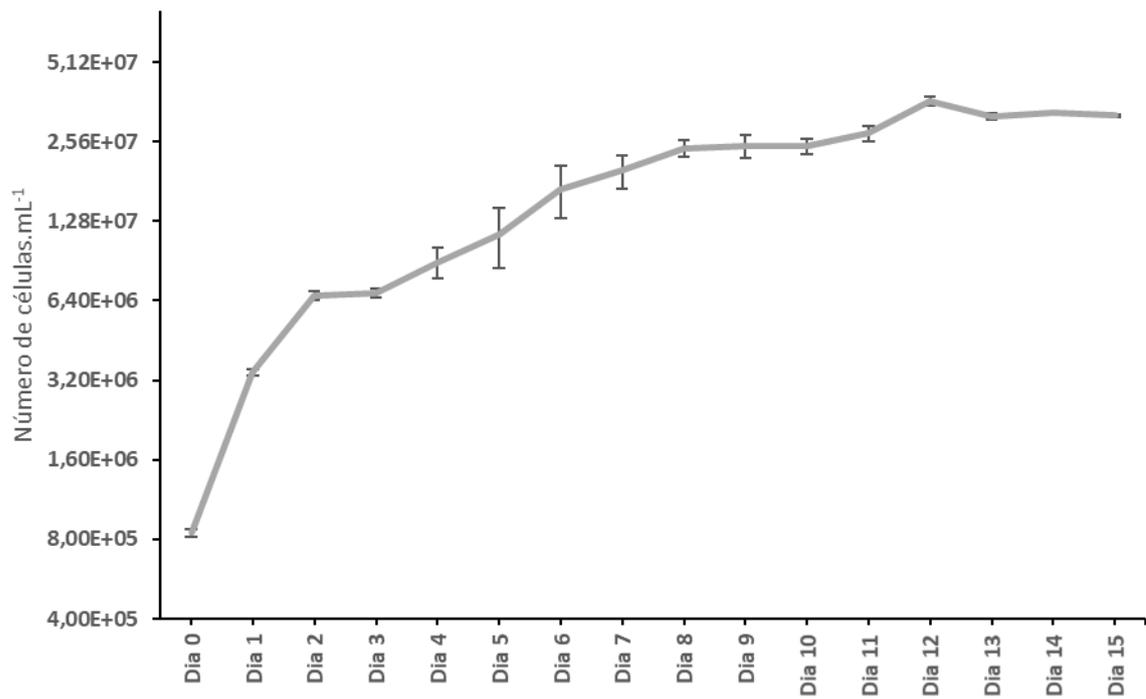
**Figura 13** – Determinação do tipo de metabolismo da cepa *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA39 em vinhaça *in natura*. O cultivo da cepa foi realizado durante 8 dias sob diferentes condições. 1) Meio axênico com ausência de iluminação; 2) meio axênico com regime de iluminação com 12 horas de claro/12h de escuro; 3) Meio não-axênico com ausência de iluminação; 4) meio não-axênico com regime de iluminação com 12 horas de claro/12h de escuro. Vinhaça - Dia 0 (□), Claro – Dia 8 (■) e Escuro – Dia 8 (■). Os cultivos foram realizados sob aeração, a 25±2°C. A determinação do perfil de crescimento da cepa foi feita com base em dois parâmetros: (A) peso seco e (B) açúcares (glicose + frutose + sacarose). O experimento foi conduzido em triplicata (n = 3), com os resultados sendo apresentados como média ± desvio padrão. A análise estatística foi executada com ANOVA One-way utilizando o pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas se o p-valor < 0.05. Diferentes letras (a, b, c) indicam diferenças significativas.

A determinação de açúcares nos cultivos, por sua vez, indicou que o metabolismo desta cepa é autotrófico (Figura 13B). Em condições axênicas não houve redução do teor de açúcares no meio de cultivo, diferente do observado quando realizado em condições não-axênicas. Nesta condição, foi observada a redução dos níveis de açúcares nos cultivos realizados no escuro, mas não quando realizado no claro. Este dado indicou que a cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 pode apresentar atividade antimicrobiana. Estas observações estão de acordo com as observações relatadas na literatura para outras espécies do gênero *Chlorella*, conforme relatado por (MAKRIDIS, 2006) e (ANNAMALAI, 2012). No entanto, novos estudos são necessários para confirmar esta observação e permitir a exploração do possível potencial antimicrobiano desta cepa.

Apesar de a *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39 apresentar crescimento em meio BBM (dados não mostrados), o uso de um meio de cultivo mais barato para a utilização em atividades que não estejam voltadas para a produtividade de biomassa e bioprodutos pode ser considerada para se manter as atividades laboratoriais mais acessíveis economicamente. Com este objetivo, o meio BG11 se mostra como uma opção atrativa para o cultivo desta cepa. Além de ser menos custoso, alguns relatos na literatura mostram que este meio de cultivo pode favorecer o crescimento de algumas espécies de microalgas do gênero *Chlorella*, resultando em um maior crescimento e em um maior acúmulo de biomoléculas de interesse quando comparado aos dados obtidos com meio BBM (SHARMA, 2016; PURKAYASTHA, 2017). No entanto, para *C. pyrenoidosa* e *C. minutíssima* foi observado o oposto, com um crescimento reduzido e outras biomoléculas quando comparado ao meio BBM (WANG, 2014).

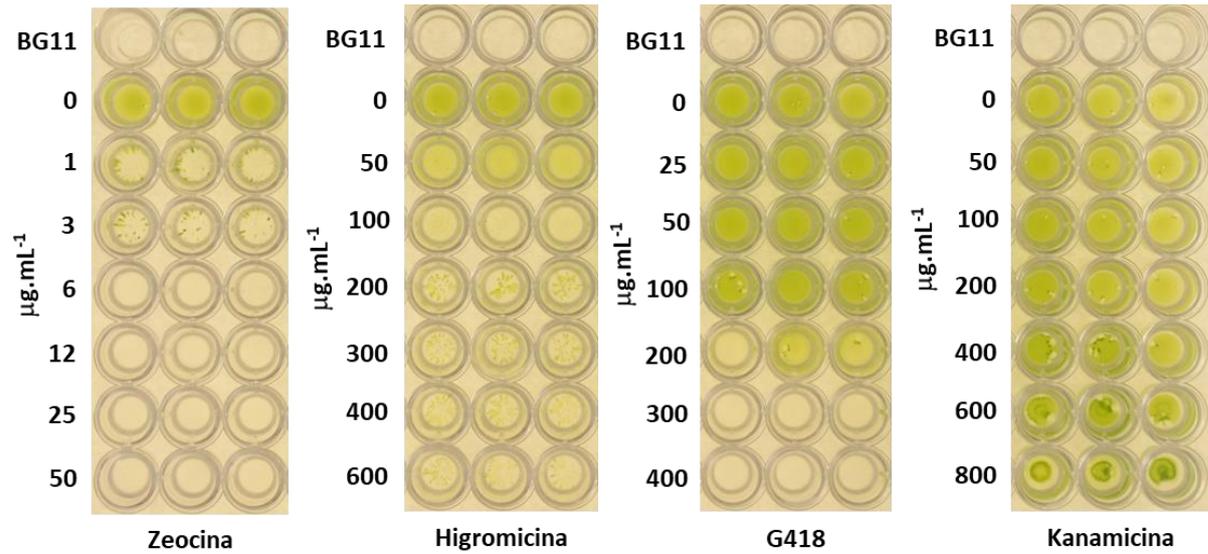
Devido à ausência de caracterização de *C. sorokiniana* Embrapa/LBA#39 em meio BG11, foi realizado o cultivo da cepa por 15 dias, durante os quais foi possível identificar as fases lag, log e estacionária de crescimento em meio BG11. De acordo com os dados obtidos, a cepa *C. sorokiniana* Embrapa/LBA#39 apresenta um aumento no número de células até o 8º dia, sendo que a partir do 6º dia o ritmo de crescimento apresenta uma considerável redução até atingir a fase estacionária no 8º dia da curva de crescimento (Figura 14). Os resultados obtidos estão de acordo com as observações de ILLMAN (2000), onde a *C. sorokiniana* estabiliza o seu crescimento no 8º dia de cultivo, apesar do início tardio da fase log, quando comparada a *C. sorokiniana* Embrapa/LBA#39.

Apesar de não realizada neste trabalho, RIBEIRO (2019) caracterizou a biomassa obtida pelo cultivo de *C. sorokiniana* Embrapa/LBA#39 em meio BG11. Os resultados mostraram que a biomassa obtida nessas condições de cultivo apresenta teor de ácidos graxos de 6,5 %, 22,41 % de carboidratos totais e 41,67 % de proteínas. Apesar de ainda ser baixo, o teor de ácidos graxos observado é superior àqueles observados para *Micractinium* sp. Embrapa/LBA#32 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa/LBA#40. Da mesma maneira, nestas condições de cultivo a biomassa de *C. sorokiniana* Embrapa/LBA#39 apresenta um teor de proteínas aumentado quando comparado ao observado para as demais cepas (SANTANA, 2017), o que pode indicar uma característica interessante para a expressão de proteínas heterólogas, além da sua versatilidade de crescimento em diferentes substratos.

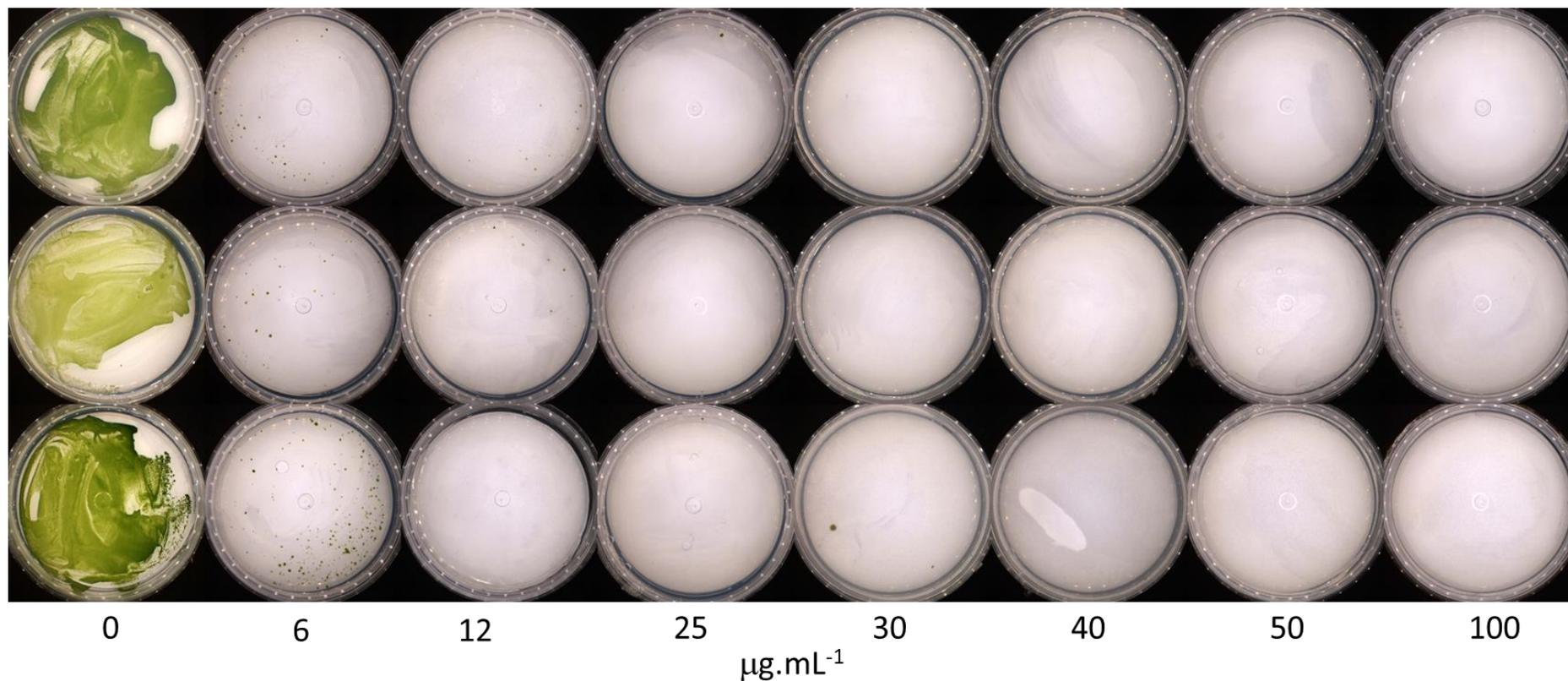


**Figura 14** - Curva de crescimento da cepa *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39 em meio BG11. O cultivo da cepa foi realizado durante 15 dias, sob regime de iluminação com 12 horas de claro/12h de escuro, sob aeração, a  $25\pm 2$  °C. A determinação do perfil de crescimento da cepa foi feita com base no número de células. O experimento foi conduzido em triplicata ( $n = 3$ ), com os resultados sendo apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Anteriormente à execução do processo de eletroporação, foi realizada a avaliação da susceptibilidade da cepa *C. sorokiniana* Embrapa/LBA#39 a diversos antibióticos. Diversos trabalhos mostram que microalgas apresentam uma grande variabilidade na sensibilidade a antibióticos (HUR, 2007; VAN DER GRINTEN, 2010; NODA, 2017) e que, devido a isto, a realização de triagem para determinação do perfil de resistência a antibióticos da cepa em uma etapa essencial para a seleção de transformantes e para a manutenção das culturas de maneira axênica. Dentre os antibióticos testados, a Zeocina foi o que se mostrou mais adequado para selecionar transformantes da cepa *C. sorokiniana* Embrapa/LBA#39 (Figura 15). Com este antibiótico, que atua através da desestabilização da dupla hélice de DNA em organismos eucarióticos e procarióticos, foi capaz de inibir de maneira eficiente o crescimento de  $10^7$  células dessa microalga com o uso de uma concentração inibitória mínima de apenas  $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , resultado similar ao observado para outras espécies do gênero *Chlorella*, como *C. ellipsoidea* e *C. pyrenoidosa*, que tiveram o seu crescimento inibido com o uso de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de Zeocina (LIU, 2013; XUE, 2016). Quando a avaliação foi realizada em meio BG11-agar, o resultado se mostrou um pouco diferente, com a concentração inibitória mínima passando a ser de  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 16). A tabela 9 sumariza o número médio de unidades formadoras de colônia observadas quando o teste de resistência ao antibiótico Zeocina foi realizado em meio ágar-BG11.



**Figura 15** – Determinação da concentração mínima inibitória de crescimento da cepa *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA39 em meio BG11 na presença dos antibióticos Zeocina (1, 3, 6, 12, 25 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), Higromicina (50, 100, 200, 300, 400, 600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), G418 (25, 50, 100, 200, 300 e 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e Kanamicina (50, 100, 200, 400, 600, 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Para controle, foi realizada a inoculação da cepa em meio sem presença de antibiótico (0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A inoculação foi realizada com  $5 \times 10^7$  células. $\text{mL}^{-1}$ , sendo cultivado durante 30 dias a  $25 \pm 2$  °C com ciclo de iluminação de 12 horas claro/12 horas escuro. Para validação dos resultados, o experimento foi realizado em triplicata.



**Figura 16** – Determinação da concentração mínima inibitória de crescimento da cepa *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39 em meio ágar-BG11 na presença do antibiótico Zeocina. Para controle, foi realizada a inoculação da cepa em meio sem presença de antibiótico. Foi realizado um inóculo com  $1 \times 10^7$  células, sendo cultivado durante 30 dias a  $25 \pm 2$  °C com ciclo de iluminação de 12 horas claro/12 horas escuro. Para validação dos resultados, o experimento foi realizado em triplicata.

A Higromicina, por sua vez, apresentou um efeito inibitório marginal na *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39, requerendo concentrações mais elevadas do antibiótico ( $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para se obter uma inibição parcial do crescimento (Figura 15). Este dado indica que a Higromicina não é o antibiótico mais adequado para a execução de testes de transformação nesta cepa, apesar de apresentar características inibitórias. De fato, como mostrado por CHA (2012), onde a concentração inibitória mínima (CIM) do crescimento de *C. vulgaris* com Higromicina foi de  $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ , e NG (2016), que encontrou um CIM em *C. vulgaris* de  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de Higromicina, é possível aferir que a susceptibilidade a antibióticos em espécies do mesmo gênero, até mesmo iguais, podem ser diferentes entre si, tornando este tipo de triagem algo imperativo antes da realização de qualquer experimento de transformação.

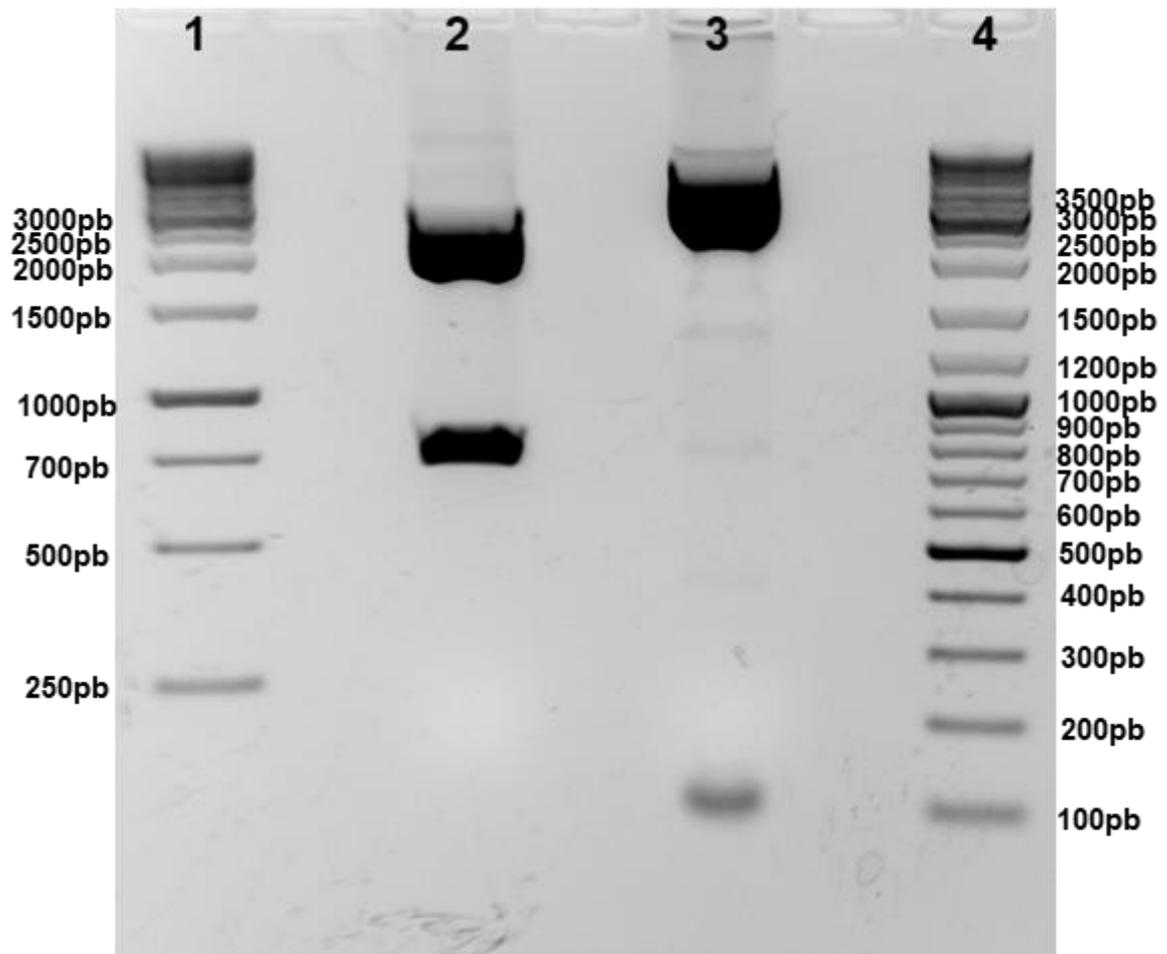
Divergência com dados obtidos para o gênero também ocorreram quando foi analisada a CIM da Kanamicina. Ela não foi capaz de inibir o crescimento da cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 em meio BG11 (Figura 15), apesar de relatos na literatura indicarem que concentrações baixas como  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  podem ser suficientes para inibir o crescimento de algumas espécies do gênero (NG, 2016). Não foram realizados testes de inibição com Kanamicina e Higromicina em meio BG11-ágar devido à ausência de inibição inicialmente observada em meio BG11.

**Tabela 9** – Determinação da concentração mínima inibitória de crescimento da cepa *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA39 em meio ágar-BG11 na presença do antibiótico Zeocina. Para controle, foi realizada a inoculação da cepa em meio sem presença de antibiótico. O cultivo foi realizado durante 30 dias a  $25 \pm 2$  °C com ciclo de iluminação de 12 horas claro/12 horas escuro. Para validação dos resultados, o experimento foi realizado em triplicata.

	[ ] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6	12	25	30	40	50	100
<b>Zeocina</b>	<b>Média</b>	140,33	10,67	0,67	0,67	0	0	0
	<b><math>\pm</math>desvio padrão</b>	$\pm 129,73$	$\pm 9,71$	$\pm 0,58$	$\pm 1,15$	$\pm 0$	$\pm 0$	$\pm 0$

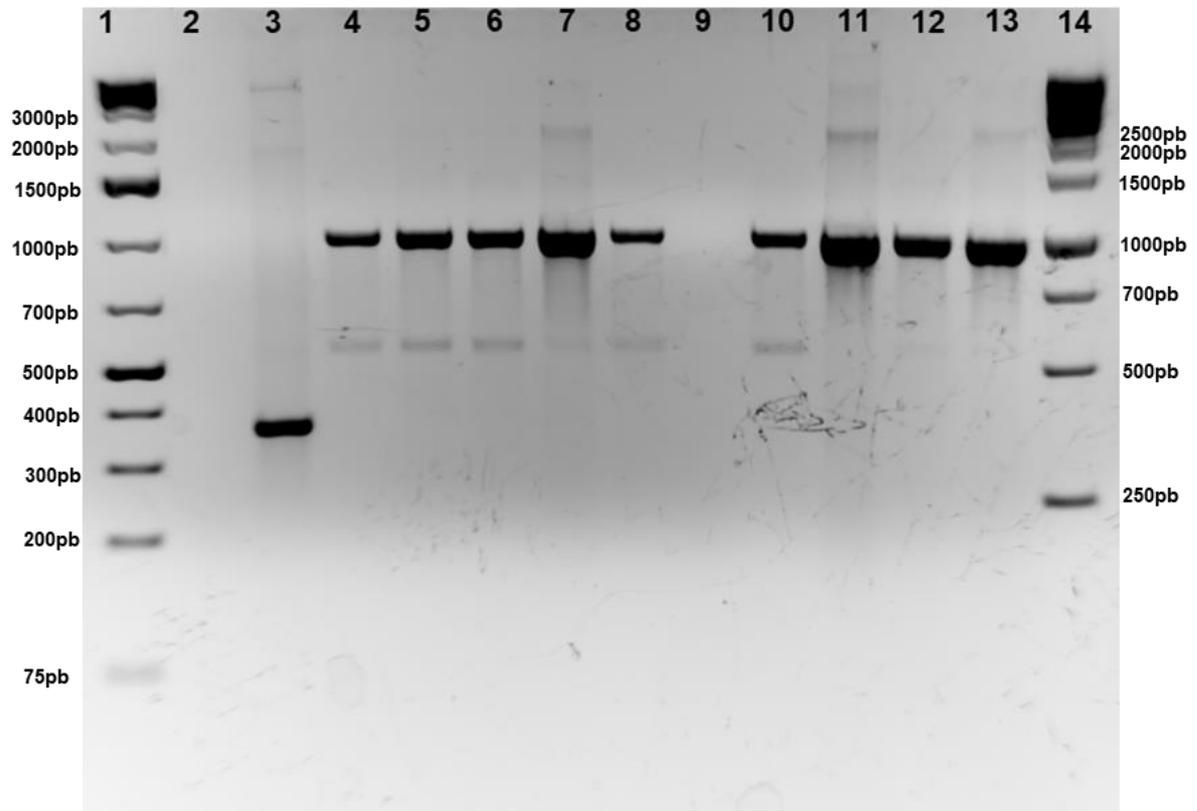
Para o estabelecimento do protocolo de transformação da cepa *C. sorokiniana* Embrapa/LBA#39, foi preparada a construção gênica pChlamy\_4-eGFP, que contém o gene repórter codificador para proteína fluorescente verde (eGFP) clonado a jusante do promotor HSp70A-Rbc S2 de *Chlamydomonas reinhardtii* presente no vetor comercial pChlamy\_4. Este vetor apresenta algumas características que favoreceram a sua escolha neste experimento. Primeiramente, é um vetor de expressão e clonagem, o que simplifica a obtenção de DNA para ser utilizado na transformação da microalga; apresenta o gene *ble*, que confere resistência à Zeocina, adequado para o uso com a cepa *C. sorokiniana* Embrapa/LBA#39; o promotor presente no cassete de expressão é auto induzível, de alta expressão, além de possuir elementos secundário como a 6x-his tag e peptídeo 2A, que favorecem a purificação do produto expresso e a obtenção de proteína com estrutura secundária mais próxima da adequada, respectivamente.

Optou-se por utilizar o gene repórter eGFP para permitir um acompanhamento simplificado da inserção e da expressão gênica na microalga. Para se realizar o preparo do plasmídio pChlamy\_4-eGFP, foi necessário realizar a subclonagem do inserto contendo gene repórter eGFP presente no plasmídio pIDTSmart-eGFP no plasmídio pChlamy\_4 (vetor vazio). Para isto foi realizada inicialmente uma digestão com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI. Os produtos da digestão foram então separados por tamanho por meio de eletroforese em gel de agarose e visualizados por meio da adição de brometo de etídio sob luz UV (Figura 17). Conforme esperado, foram gerados dois fragmentos para cada um dos plasmídios. Para o pIDTSmart-eGFP, um de 2056pb e outro de 771pb, sendo este referente ao gene eGFP. Para o pChlamy\_4 vazio, um de 3541pb, referente ao vetor aberto, e outro de 99pb, referente ao fragmento gerado após a dupla digestão (Figura 17).



**Figura 17** – Resultado da dupla digestão dos vetores com as enzimas BamHI e EcoRI. No gel, foram aplicados os seguintes materiais: (1) Ladder generuler 1kb, (2) pChlamy\_4 vazio, (3) e pIDTSmart-eGFP e (4) ladder generuler mix.

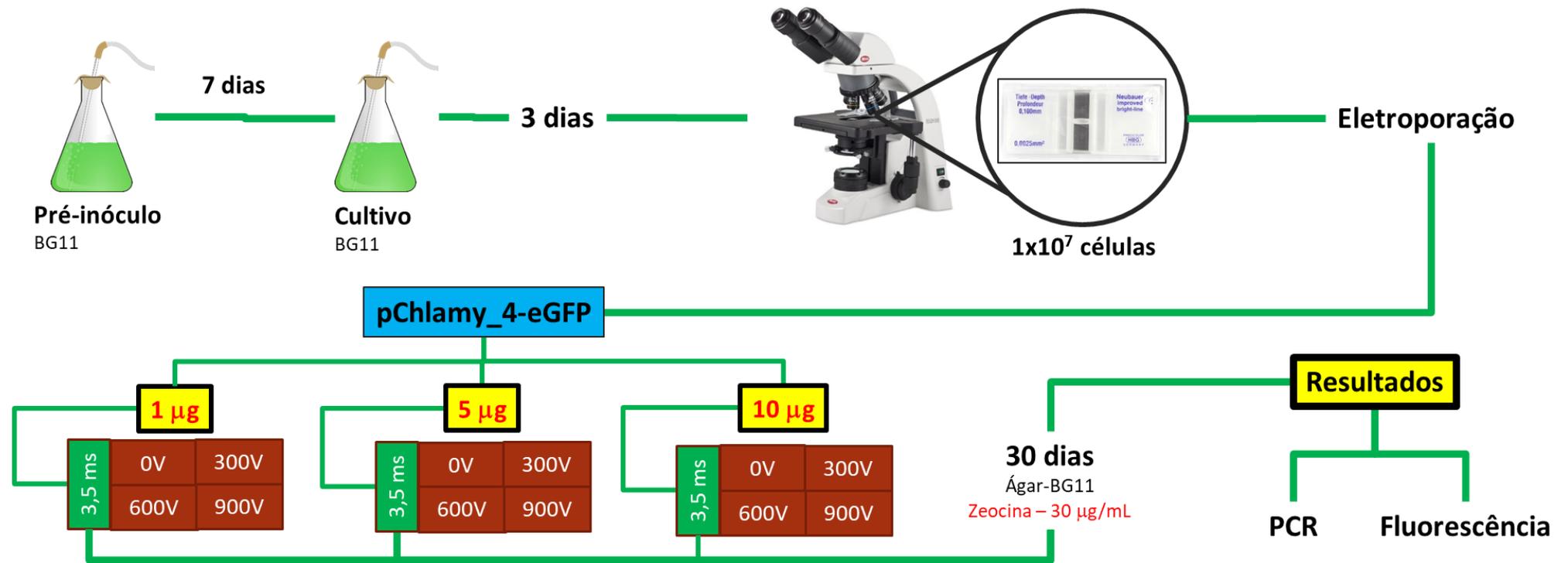
Após a confirmação da clonagem do gene eGFP no vetor pChlamy\_4 vazio, foi realizada a transformação da *E. coli* EPI300 com o vetor construído, pChlamy\_4-eGFP por eletroporação. Após o plaqueamento, dez das colônias positivas foram coletadas e testadas por PCR para a presença do vetor pChlamy\_4-eGFP. Para o plasmídio vazio, um fragmento de 375pb era esperado. Para o pChlamy\_4-eGFP um fragmento de 975pb. Os resultados mostraram que a maior parte das colônias selecionadas a partir da placa de seleção se mostraram positivas, a exceção da colônia #6 (Figura 18). Considerando o resultado obtido, a colônia #9 foi selecionada e preservada em ultrafreezer para manutenção da integridade do plasmídio, sendo a mesma utilizada posteriormente para a extração do plasmídio a ser utilizado na transformação da cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39.



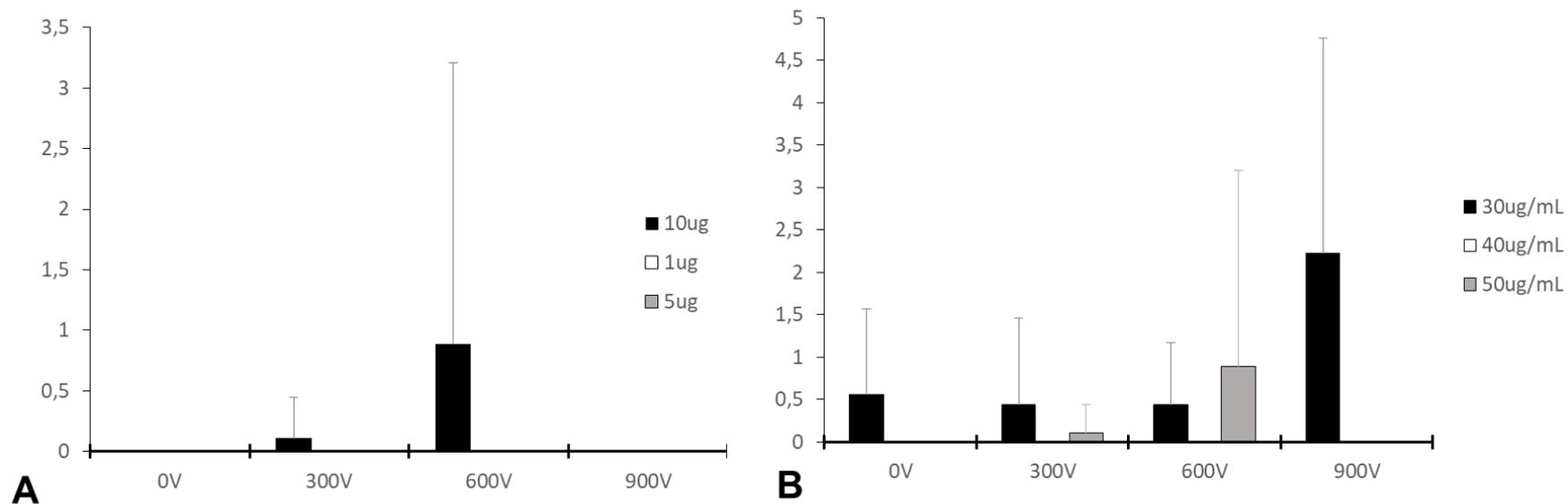
**Figura 18** – Resultado da PCR das colônias de *E. coli* EPI300 transformadas com a construção pClamy\_4 – eGFP. (1) Ladder generuler 1kb plus, (2) *E. coli* EPI300 não transformada, (3) vetor pClamy\_4 vazio, (4-13) colônias #1 a #10 transformadas com o a construção pClamy\_4-eGFP, (14) ladder generuler 1kb.

Para se determinar a melhor concentração de DNA a ser utilizada para a transformação da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39, foram realizadas eletroporações a 300 V, 600 V e 900 V durante 3,5 ms com o uso de 1, 5 ou 10  $\mu\text{g}$  do plasmídeo pChlamy\_4-eGFP (Figura 19). Após 30 dias da eletroporação, foi realizada a contabilização do número de colônias obtidas (Figura 20A). Observou-se que a melhor condição para eletroporação seria com o uso de 10  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial. Com esta quantidade, foi possível obter uma média de 0,89 UFC por placa quando a eletroporação foi realizada a 600 V por 3,5 ms.

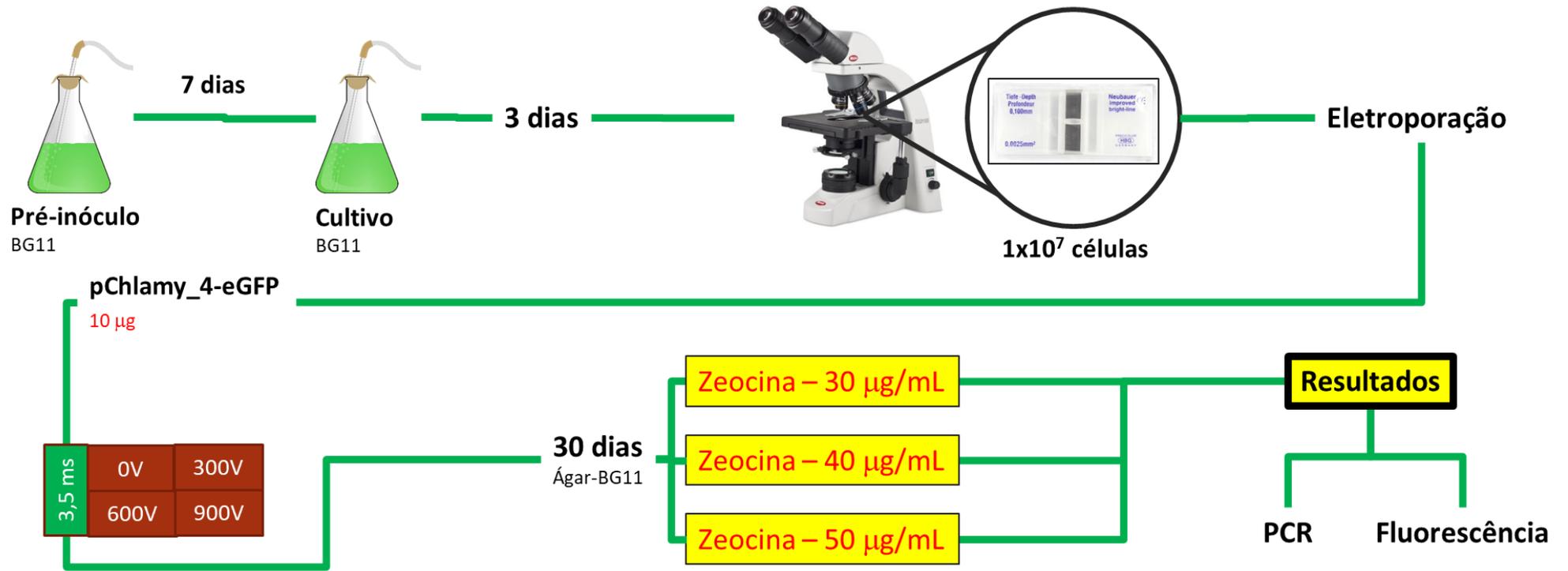
Quando o uso de diferentes concentrações do antibiótico foi avaliado (Figuras 20B e 21), utilizando a quantidade de DNA plasmidial estabelecida no experimento anterior (10  $\mu\text{g}$ ), observou-se que, apesar de a concentração inibitória mínima em meio BG11-ágar para a *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 ter sido determinado em 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 16), quando a concentração de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi utilizada, houveram alterações no número de colônias que apresentaram crescimento. A 600 V e 3,5 ms, o número médio de UFC foi reduzido para 0,44. No entanto, número médio de UFC foi aumentado para 2,22 ao serem aplicados 900 V por 3,5 ms. Este resultado não era esperado visto que concentrações mais elevadas de antibiótico podem levar à inibição do crescimento do microrganismo, mesmo que ele apresente algum grau de resistência ao antibiótico em questão. Sendo assim, foi determinado que a concentração ótima de Zeocina para seleção de possíveis transformantes são 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 19** – Planejamento adotado para determinação da quantidade de plasmídeo mais adequada para a obtenção de transformantes de *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39 por eletrporação

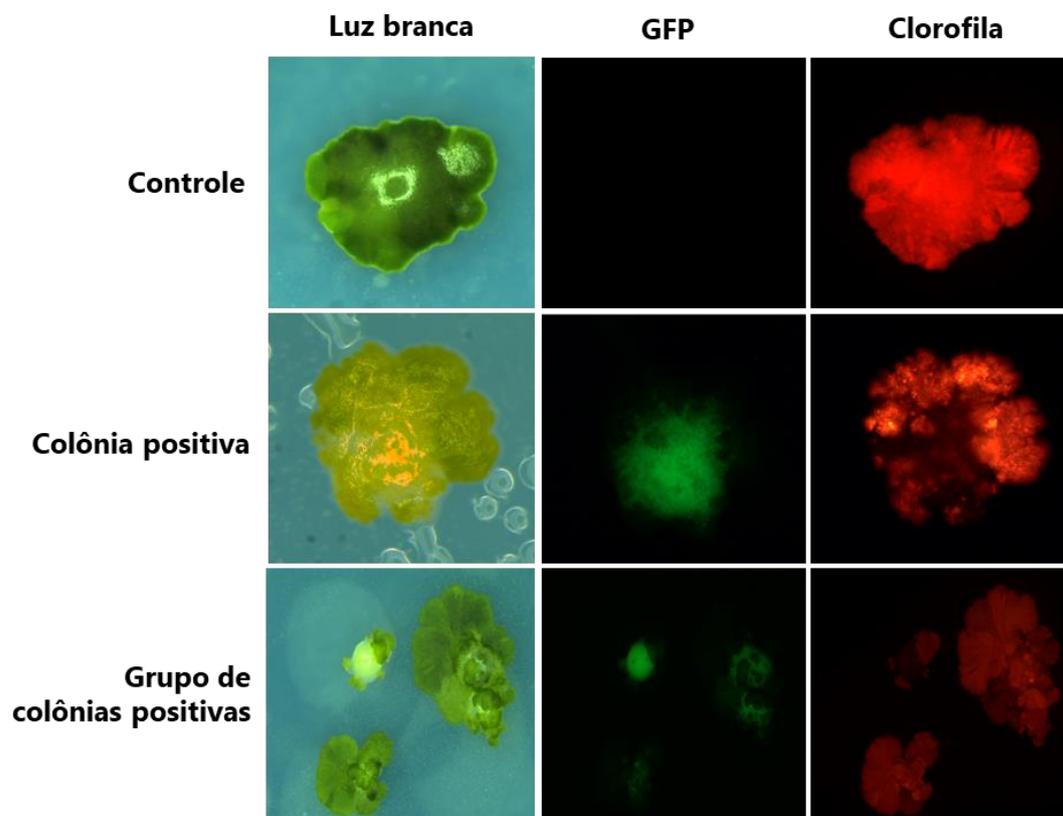


**Figura 20** – Número de unidades formadoras de colônias obtidas após a eletroporação em diferentes condições. (A) Avaliadas diferentes quantidades do plasmídeo pChlamy\_4-eGFP, sendo a seleção realizada em meio ágar-BG11 com o antibiótico Zeocina a  $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . (B) Eletroporação realizada com o uso de  $10 \mu\text{g}$  de DNA plasmidial e diferentes concentrações do antibiótico de seleção (Zeocina). O experimento foi conduzido em triplicatas independentes com número de réplicas igual a 3.



**Figura 21** – Planejamento adotado para determinação da concentração de Zeocina mais adequada para a obtenção de transformantes de *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39 por eletroporação.

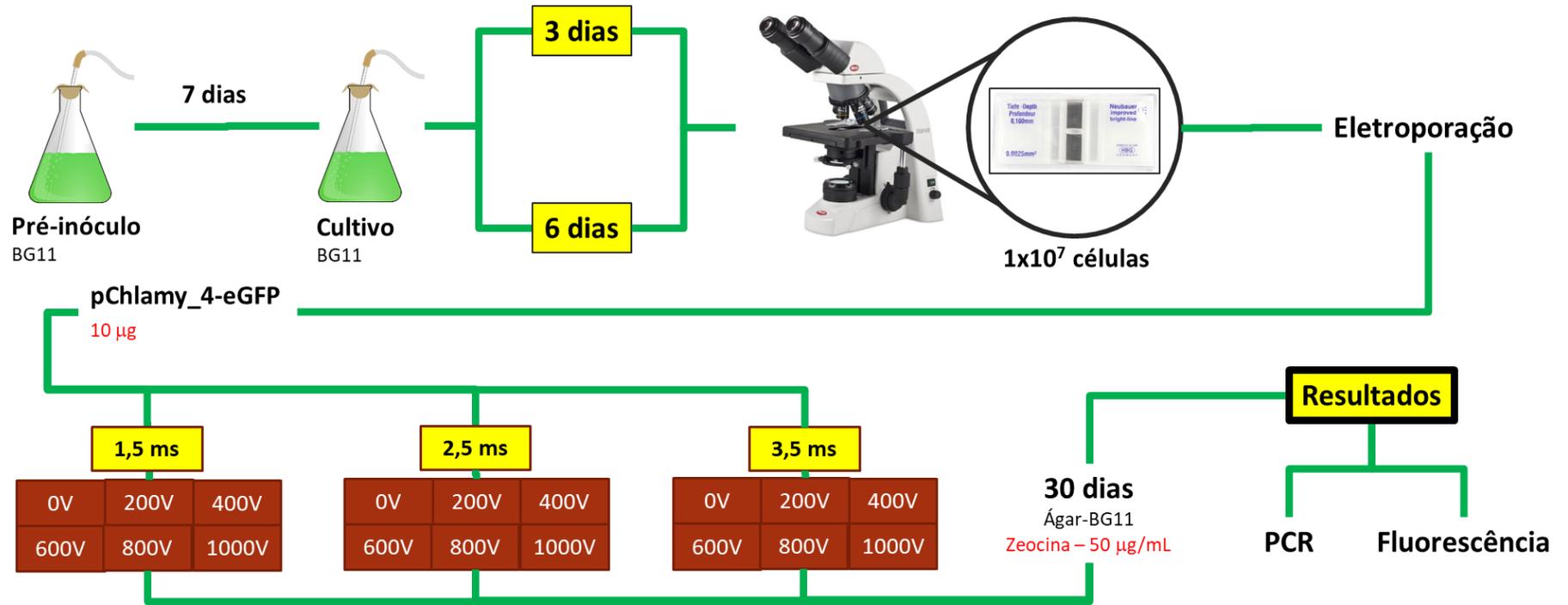
Todas as colônias que apresentaram crescimento em meio ágar BG-11 com Zeocina foram analisadas em estereomicroscópio de fluorescência (Leica M205A) para verificar a expressão do gene repórter. A expressão de eGFP foi avaliada com o uso do filtro adequado. É possível visualizar na Figura 22 imagens representativas de colônias potencialmente positivas (i.e. expressão da proteína eGFP) apresentaram coloração esverdeada, resultado da emissão de fluorescência do produto da expressão do gene repórter. As colônias de microalgas visualizadas sob o filtro TXRL, que permite apenas a visualização de luz visível com emissão acima de 610 nm, apresentaram coloração avermelhada resultante da emissão de fluorescência das clorofilas A ( $E_{m_{max}}$  666 nm) e clorofila B ( $E_{m_{max}}$  644 nm), presentes nesses microrganismos, indicando que se tratavam de colônias de microalgas. Apesar do resultado ter indicado a expressão do eGFP nas colônias avaliadas, quando as colônias foram avaliadas por PCR para a presença do plasmídeo, não foi possível obter resultado positivo (dados não mostrados) para nenhuma das colônias testadas. Tal resultado poderia ser explicado pela ausência de transformantes estáveis, sendo o resultado obtido durante a análise em estereomicroscópio de fluorescência resultante de uma expressão temporária do gene inserido.



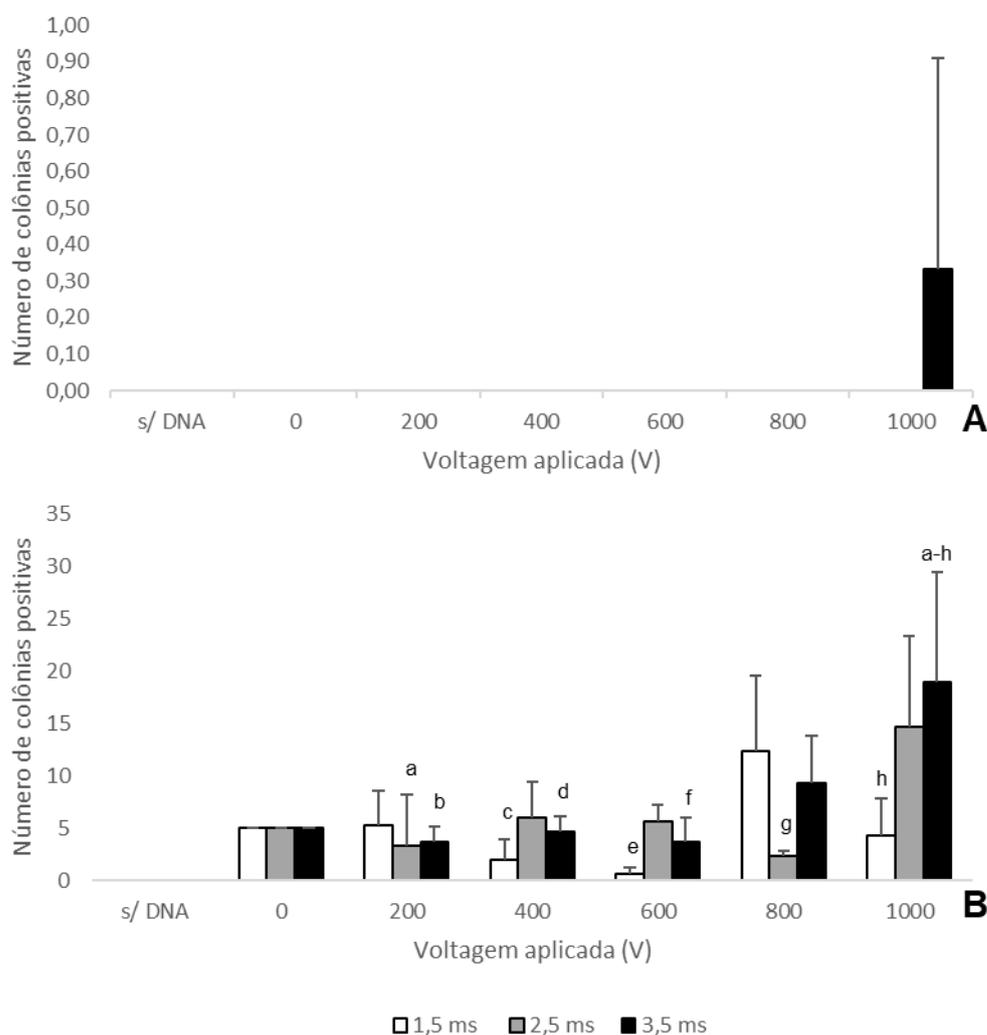
**Figura 22** – Representação de colônias da cepa *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39 possivelmente transformadas com o vetor pChlamy\_4-eGFP. As colônias foram avaliadas em estereomicroscópio de fluorescência com os filtros GFP (ex 470/40, em 525/50), para confirmar a expressão do gene eGFP, e o filtro TXRL (480/40, >610) para visualização da fluorescência emitida pelas clorofilas a e b presentes em microalgas. Para a expressão de eGFP, foram consideradas positivas as colônias que apresentaram coloração esverdeada ao ser utilizado o filtro GFP.

No total, considerando todas as condições de eletroporação avaliadas, 308 colônias apresentaram crescimento nas placas de seleção contendo meio BG-11 ágar e Zeocina  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . As colônias foram avaliadas em estereomicroscópio de fluorescência com o uso do filtro GFP. Como resultado da avaliação, todas as colônias apresentaram indícios da expressão do gene eGFP, conforme representado na Figura 22.

Após a determinação da quantidade de plasmídio ( $10 \mu\text{g}$ ) e a concentração de Zeocina ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) mais adequadas, procedeu-se para a avaliação da fase de crescimento mais adequada para a realização da transformação de *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 por eletroporação (Figura 23). Com a análise dos dados obtidos na figura 24, foi possível verificar que quando a eletroporação foi realizada após 3 dias de cultivo, no início da fase log, houve a ocorrência de um número reduzido de UFCs, apenas quando se utilizou pulso elétrico de 1000 V por 3,5 ms, não havendo diferença significativa para os demais grupos (Figura 24A). Quando a eletroporação foi realizada após 6 dias de cultivo (Figura 24B), foram recuperados UFCs em todas as condições testadas, incluindo a que a eletroporação não foi realizada. Os dados obtidos também mostraram que na maioria dos grupos não houve diferença significativa quando o tempo de eletroporação foi alterado. Apenas no grupo onde houve a aplicação de 1000 V durante o processo houve influência significativa do tempo no número de transformantes obtidos. Considerando os dados apresentados, a condição 1000 V/3,5 ms se mostrou como a mais eficiente para se obter UFCs da cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39. De fato, era esperado que eletroporações mais intensas e prolongadas resultassem em um maior número de transformantes, como demonstrado por RUN (2016). Porém a discrepância existente entre os resultados obtidos com alteração do tempo de cultivo pré-eletroporação não era esperada.



**Figura 23** – Planejamento adotado para determinação da melhor fase de crescimento para realização da eletroporação da *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39.



**Figura 24** - Número de colônias da cepa *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39 obtidas após a eletroporação com o uso de 10  $\mu$ g de DNA do plasmídeo pChlamy\_4-eGFP sob diferentes parâmetros. (A) Número de colônias positivas em transformação realizada após 3 dias de cultivo. (B) Número de transformantes positivos em transformação realizada após 6 dias de cultivo. O experimento foi conduzido em triplicata ( $n = 3$ ) e os dados são apresentados como a média do número de colônias  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada com o ANOVA One-way com pós-teste de Tukey. Letras iguais representam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0.05$ ).

A diferença significativa entre os resultados obtidos quando o experimento foi realizado após 3 e 6 dias de cultivo poderia ser explicada pelas mudanças no metabolismo da microalga durante o período de cultivo. Por exemplo, é conhecido que a medida que os nutrientes presentes no meio de cultivo se esgotam, alterações morfológicas, como o tamanho celular, e metabólicas, como na produção de carboidratos e lipídios que compõem a parede celular e regulam sua permeabilidade, passam a ocorrer nas células (CAKMAK (2012); ZHU (2014)). Deste modo, estudos futuros são necessários para analisar quais alterações ocorrem durante o período de cultivo da *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 e que poderiam favorecer a obtenção de transformantes durante a eletroporação.

Apesar das possíveis alterações na estrutura celular com o tempo de cultivo, quando as colônias que apresentaram crescimento foram analisadas por PCR para a presença do plasmídeo pChlamy\_4-eGFP, nenhuma das colônias avaliadas apresentou resultado positivo para a presença de DNA do plasmídeo. Este resultado é similar ao observado no experimento anterior (Figuras 20 e 22), no qual nenhuma das UFCs avaliadas apresentaram resultado positivo quando a PCR foi realizada. A ausência de confirmação da transformação genética por meio da técnica de PCR levanta a hipótese de que o DNA exógeno estaria penetrando na célula algal após a eletroporação, todavia levando a uma expressão transiente durante o processo de seleção e crescimento em meio BG11 contendo ágar e zeocina. Com isto, a fluorescência observada poderia ser resultante da expressão da proteína eGFP nas fases iniciais do crescimento das colônias.

É conhecido que o vetor pChlamy\_4 utilizado neste estudo integra-se de forma randômica ao genoma nuclear algal e o número de cópias integradas é bastante variável (Thermo Fisher – Informações do fabricante). O fato de não haver na estrutura

do pChlamy\_4 uma sequência direcionadora para integração nuclear (Figura 4), associado ao fato que este vetor é desenhado para transformação da espécie *C. reinhardtii* poderiam contribuir para a instabilidade da expressão do transgene eGFP na cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39. Portanto, estudos adicionais ainda serão necessários para se desenhar e avaliar construções gênicas alternativas capazes de permitir a transformação estável *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39, viabilizando a utilização desta cepa de microalga como uma plataforma de expressão heteróloga de proteínas.

## 5. Conclusões

O potencial de aplicação biotecnológica das microalgas pertencentes a biodiversidade brasileira ainda é pouco explorado. Porém, os resultados obtidos neste estudo fornecerão suporte para que as microalgas nativas da biodiversidade brasileira possam ser futuramente utilizadas com a finalidade de produção de bioprodutos de maneira sustentável em associação com a indústria sucro-energética.

Neste estudo, três cepas de microalgas verdes nativas foram avaliadas quanto ao seu cultivo em sistemas a base de vinhaça e CO<sub>2</sub>. Os resultados indicaram que nestas condições, as cepas avaliadas alcançam altas produtividades de biomassa, superiores àquelas observadas em meios de cultivo quimicamente definidos.

Análises da composição da biomassa algal produzida pelas cepas *Micractinium* sp. Embrapa|LBA#32 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA#40 revelaram alto acúmulo de carboidratos fermentescíveis e poder calorífico úteis para aplicação industrial. Além disso, os perfis de ácidos graxos acumulados por esses microrganismos apresentam características favoráveis à sua aplicação na produção de biodiesel, apesar dos reduzidos teores produzidos. Mesmo com resultados favoráveis à aplicação biotecnológica desses microrganismos, ainda existem questões relacionadas à baixa transmitância de luz da vinhaça e ao controle de contaminantes microbianos na cultura que apresentarão grandes desafios para o futuro cultivo em larga escala no sistema de cultivo proposto.

Apesar de hipoteticamente possuir potencial para a produção de proteínas heterólogas, não foi possível padronizar um protocolo para a transformação genética estável da cepa *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39. Assim, estudos futuros serão

necessários para viabilizar a utilização deste microrganismo como uma plataforma de produção proteica capaz de crescer em sistemas a base de vinhaça e CO<sub>2</sub>.

Por fim, os protocolos de criopreservação desenvolvidos neste trabalho permitirão a manutenção a longo prazo destes recursos genéticos nativos da biodiversidade brasileira de forma menos laboriosa e mais segura. Isto representa um importante passo para a viabilização da utilização desse diversificado grupo de microrganismos em finalidades biotecnológicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADARME-VEGA, T. C. et al. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microb Cell Fact**, v. 11, p. 96, 2012.

AGUIAR, T. D. F. et al. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 2, p. 80-93, 2012.

AKBARI, F.; ESKANDANI, M.; KHOSROUSHAHI, A. Y. The potential of transgenic green microalgae; a robust photobioreactor to produce recombinant therapeutic proteins. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 2783-2796, 2014.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3402-3410, 2011.

ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais - Produção de biomassa e coprodutos. **IAPAR**, p. 21-24, 2014.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, n. 1-4, p. 130-134, 2007.

ANNAMALAI, J.; SHANMUGAM, J.; NALLAMUTHU, T. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of *Chlorella Vulgaris* Beijerinck. **International Journal of Current Research and Review**, v. 4, n. 7, p. 33-38, 2012.

ASTM. **ASTM D5865-13 - Standard Test Method for Gross Calorific Value of Coal and Coke**. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2013. 19.

BARAHIMIPOUR, R.; NEUPERT, J.; BOCK, R. Efficient expression of nuclear transgenes in the green alga *Chlamydomonas*: synthesis of an HIV antigen and development of a new selectable marker. **Plant Molecular Biology**, p. 1-16, 2016.

BARBOSA, M.; WIJFFELS, R. **Outlook on microalgae production chains** 2016.

BARROCAL, V. M. et al. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 851-856, 2010.

BASUMALLICK, L.; ROHRER, J. **Application Note 282: Rapid and Sensitive Determination of Biofuel Sugars by Ion Chromatography**. Sunnyvale, CA, USA: Thermo Fisher Scientific 2012.

BAUDELET, P.-H. et al. A new insight into cell walls of Chlorophyta. **Algal Research**, v. 25, p. 333-371, 2017.

BOCK, C.; KRIENITZ, L.; PRÖSCHOLD, T. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. **Fottea**, v. 11, n. 2, p. 293-312, 2011.

BRASIL, B.; GARCIA, L. Microalgas: alternativas promissoras para a indústria. **Agroenergia em Revista**, v. 10, p. 6-11, 2016.

BRASIL, B. D. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 39, p. 90-98, 2017.

CABANELAS, I. T. D. et al. From waste to energy: microalgae production in wastewater and glycerol. **Applied Energy**, v. 109, p. 283-290, 2013.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360-369, 2013.

CAKMAK, T. et al. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 8, p. 1947-1957, 2012.

CENCIANI, K. et al. Sustainable production of biodiesel by microalgae and its application in agriculture. **African journal of microbiology research**, v. 5, n. 26, p. 4638-4645, 2011.

CHA, T. S.; YEE, W.; AZIZ, A. Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1771-1779, 2012.

CHEN, C.-Y. et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013.

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

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

CHISTI, Y.; YAN, J. **Energy from algae: current status and future trends: algal biofuels—a status report**: Elsevier 2011.

CHOI, S. P.; NGUYEN, M. T.; SIM, S. J. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Bioresource technology**, v. 101, n. 14, p. 5330-5336, 2010.

CHOW, K.-C.; TUNG, W. L. Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. **Plant cell reports**, v. 18, n. 9, p. 778-780, 1999.

COLL, J. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae: a review. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 4, p. 316-330, 2006.

DARIENKO, T. et al. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, v. 45, n. 1, p. 79-95, 2010.

DAWSON, H. N.; BURLINGAME, R.; CANNONS, A. C. Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. **Current microbiology**, v. 35, n. 6, p. 356-362, 1997.

DE VOS, W. M.; HUGENHOLTZ, J. Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. **Trends in biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 72-79, 2004.

DIAS, M. O. et al. Improving bioethanol production from sugarcane: evaluation of distillation, thermal integration and cogeneration systems. **Energy**, v. 36, n. 6, p. 3691-3703, 2011.

DIXON, J. M.; TANIGUCHI, M.; LINDSEY, J. S. PhotochemCAD 2: A Refined Program with Accompanying Spectral Databases for Photochemical Calculations¶. **Photochemistry and photobiology**, v. 81, n. 1, p. 212-213, 2005.

DU, H. et al. PhotochemCAD‡: a computer-aided design and research tool in photochemistry. **Photochemistry and photobiology**, v. 68, n. 2, p. 141-142, 1998.

FAN, J. et al. Genomic Foundation of Starch-to-Lipid Switch in Oleaginous *Chlorella* spp. **Plant Physiology**, v. 169, n. 4, p. 2444-2461, 2015.

FENTON, O.; Ó HUALLACHÁIN, D. Agricultural nutrient surpluses as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): A review. **Algal Research**, v. 1, n. 1, p. 49-56, 2012.

FERNANDES, M. S. **Desenvolvimento de métodos otimizados para criopreservação de microalgas verdes (Chlorophyta)**. 2017. 46 (Curso de Pós-Graduação(Mestrado)emBiotecnologia). Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Gurupi, Gurupi, Tocantins.

FERNANDES, M. S. et al. Customized cryopreservation protocols for chlorophytes based on cell morphology. **Algal Research**, v. 38, p. 101402, 2019.

GHASEMI, Y. et al. Microalgae biofuel potentials (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 126-144, 2012.

GOMES, A. R. et al. An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. 2016.

GONG, Y. et al. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 12, p. 1879-1890, 2011.

GONG, Y.; JIANG, M. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 7, p. 1269-1284, 2011.

GRIFFITHS, M. J.; VAN HILLE, R. P.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 5, p. 989-1001, 2012.

HADI, S. I. I. A. et al. DNA Barcoding Green Microalgae Isolated from Neotropical Inland Waters. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0149284, 2016.

HAWKINS, R. L.; NAKAMURA, M. Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*. **Current microbiology**, v. 38, n. 6, p. 335-341, 1999.

HO, S.-H. et al. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource technology**, v. 135, p. 191-198, 2013.

HUANG, C.-C. et al. Expression of mercuric reductase from *Bacillus megaterium* MB1 in eukaryotic microalga *Chlorella* sp. DT: an approach for mercury phytoremediation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, n. 1, p. 197-205, 2006.

HUBALEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, n. 3, p. 205-229, 2003.

HUNT, R. W. et al. Effect of Biochemical Stimulants on Biomass Productivity and Metabolite Content of the Microalga, *Chlorella sorokiniana*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2400-2414, 2010.

HUR, J.-Y. Y. S. B. Antibiotics and Their Optimum Concentration for Axenic Culture of Marine Microalgae. **ALGAE**, v. 22, n. 3, p. 229-234, 2007.

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

INSIGHTS, K. M. **Market Research Report**. 2018

JONES, S. W. et al. Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 61, p. 189-197, 2020.

JUNTILA, D.; BAUTISTA, M.; MONOTILLA, W. Biomass and lipid production of a local isolate *Chlorella sorokiniana* under mixotrophic growth conditions. **Bioresource technology**, v. 191, p. 395-398, 2015.

KIM, M.-J. et al. Effect of biostimulator *Chlorella fusca* on improving growth and qualities of chinese chives and spinach in organic farm. **The plant pathology journal**, v. 34, n. 6, p. 567, 2018.

KNOTHE, G.; MATHEAUS, A. C.; RYAN III, T. W. Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester☆. **Fuel**, v. 82, n. 8, p. 971-975, 2003.

KOETSCHAN, C. et al. ITS2 Database IV: Interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 63, n. 3, p. 585-588, 2012.

KOO, J.; PARK, D.; KIM, H. Expression of bovine lactoferrin N-lobe by the green alga, *Chlorella vulgaris*. **ALGAE**, v. 28, n. 4, p. 379-387, 2013.

KUMAR, K.; DAS, D. Growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* in airlift and bubble column photobioreactors. **Bioresource technology**, v. 116, p. 307-313, 2012.

KUMAR, K.; DASGUPTA, C. N.; DAS, D. Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. **Bioresource technology**, v. 167, p. 358-366, 2014.

KUMAR, M. et al. Rapid and efficient genetic transformation of the green microalga *Chlorella vulgaris*. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 3, p. 1735-1745, 2018.

LARKUM, A. W. D. et al. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 198-205, 2012.

LEE, S. et al. Converting carbohydrates extracted from marine algae into ethanol using various ethanolic *Escherichia coli* strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 6, p. 878-888, 2011.

LI, T. et al. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 204-213, 2014.

LI, Y. et al. Biofuels from microalgae. **Biotechnology progress**, v. 24, n. 4, p. 815-820, 2008.

LIU, L. et al. Development of a New Method for Genetic Transformation of the Green Alga *Chlorella ellipsoidea*. **Molecular Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 211-219, 2013.

LIZZUL, A. et al. Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. **Biology**, v. 7, n. 2, p. 25, 2018.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. D. Biodiesel: quality parameters and analytical methods. **Química nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

LUO, W. et al. Genotype versus Phenotype Variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Protist**, v. 157, n. 3, p. 315-333, 2006.

LUO, W. et al. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 545-553, 2010.

MA, R.; LIN, X. *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) improves lutein production in *Chlorella vulgaris*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 32, n. 2, p. 390-396, 2014.

MAKRIDIS, P.; COSTA, R. A.; DINIS, M. T. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii*. **Aquaculture**, v. 255, n. 1, p. 76-81, 2006.

MALCATA, F. X. Microalgae and biofuels: a promising partnership? **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 542-549, 2011.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, p. 631-45, 2012.

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

MERGET, B. et al. The ITS2 Database. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 61, p. 3806, 2012.

MUSSGNUMG, J. H. Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5407-5418, 2015.

NG, S. L. et al. Heterologous expression of the *Streptococcus pneumoniae* yoeB and pezT toxin genes is lethal in *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 19, p. 21-29, 2016.

NICHOLS, H. W.; BOLD, H. C. *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. **Journal of Phycology**, v. 1, n. 1, p. 34-38, 1965.

NIU, Y. F. et al. A new inducible expression system in a transformed green alga, *Chlorella vulgaris*. **Genet Mol Res**, v. 10, n. 4, p. 3427-34, 2011.

NODA, J. et al. Tools for biotechnological studies of the freshwater alga *Nannochloropsis limnetica*: antibiotic resistance and protoplast production. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 2, p. 853-863, 2017.

OLIVEIRA, M. R.; CARIOCA, J. O. B.; MACAMBIRA, S. Development of a methodology for net energy analysis in biorefineries, regarding microalgae cultivation to improve energy yields in industrial wastes. **Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal**, v. 3, n. 1, p. 59, 2012.

OPEP. **2018 Annual Report**. Organization of the Petroleum Exporting Countries. 2019

PARMAR, A. et al. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10163-10172, 2011.

PURKAYASTHA, J. et al. Growth of high oil yielding green alga *Chlorella ellipsoidea* in diverse autotrophic media, effect on its constituents. **Algal Research**, v. 21, p. 81-88, 2017.

RAMOS, M. J. et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource technology**, v. 100, n. 1, p. 261-268, 2009.

RASALA, B. A. et al. Robust expression and secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. **PloS one**, v. 7, n. 8, 2012.

RAZEGHIFARD, R. Algal biofuels. **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1, p. 207-219, 2013.

RAZZAK, S. A. et al. Integrated CO<sub>2</sub> capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, n. 0, p. 622-653, 2013.

RIBEIRO, D. M. et al. A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. **Bioresource Technology Reports**, p. 100354, 2019.

RIPPKA, R. et al. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

ROCHA, M. F. et al. Glucose and lactose as cryoprotectants for fungal strains immobilised in sodium alginate: an emphasis on the conservation of the zygomycetes *Rhizopus* and *Mucor*. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 321-326, 2013.

ROCHAIX, J.-D. *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. **Annual review of genetics**, v. 29, n. 1, p. 209-230, 1995.

RUN, C. et al. Stable nuclear transformation of the industrial alga *Chlorella pyrenoidosa*. **Algal Research**, v. 17, p. 196-201, 2016.

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

SANITHA, M. et al. Agrobacterium-mediated transformation of three freshwater microalgal strains. **Pol J Microbiol**, v. 63, n. 4, p. 387-382, 2014.

SANTANA, H. **Isolamento, seleção e caracterização de microalgas com alta produtividade de biomassa em meio de cultivo a base de vinhaça e CO<sub>2</sub>**. 2016. 120 (Programa de Pós-Graduação em Biociências). Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Vitória da Conquista, Bahia.

SANTANA, H. et al. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource technology**, v. 228, p. 133-140, 2017.

SCRANTON, M. A. et al. *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. **The Plant Journal**, v. 82, n. 3, p. 523-531, 2015.

SEIBEL, P. N. et al. 4SALE – A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 498, 2006.

SHARIFI-SIRCHI, G. R.; JALALI-JAVARAN, M. Selecting appropriate hosts for recombinant proteins production. **Hormozgan Medical Journal**, v. 20, n. 3, p. 214-222, 2016.

SHARMA, A. K. et al. Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 116, 2016.

SIMAS-RODRIGUES, C. et al. Microalgae for economic applications: advantages and perspectives for bioethanol. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 14, p. 4097-4108, 2015.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STEPHENS, E. et al. Future prospects of microalgal biofuel production systems. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 10, p. 554-564, 2010.

SUMAN, G. et al. Single cell protein production: a review. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 4, n. 9, p. 251-262, 2015.

SURZYCKI, R. et al. Factors effecting expression of vaccines in microalgae. **Biologicals**, v. 37, n. 3, p. 133-138, 2009.

TALEBI, A. F. et al. Genetic manipulation, a feasible tool to enhance unique characteristic of *Chlorella vulgaris* as a feedstock for biodiesel production. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 7, p. 4421-4428, 2013.

TAYLOR, R.; FLETCHER, R. L. Cryopreservation of eukaryotic algae—a review of methodologies. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, n. 5, p. 481-501, 1998.

VAN DER GRINTEN, E. et al. Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. **Chemosphere**, v. 80, n. 1, p. 1-6, 2010.

VAN WYCHEN, S.; LAURENS, L. Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass. **NREL Laboratory Analytical Procedure**, 2013a. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy14osti/60957.pdf>>. Acesso em: 01-15-2016.

\_\_\_\_\_. Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by in situ Transesterification. **NREL Laboratory Analytical Procedure**, 2013b. Disponível em: < <http://www.nrel.gov/docs/fy14osti/60958.pdf> >. Acesso em: 01-15-2016.

VASUDEVAN, P. T.; FU, B. Environmentally Sustainable Biofuels: Advances in Biodiesel Research. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 47-63, 2010.

VIEIRA GOMES, A. et al. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. **Microorganisms**, v. 6, n. 2, p. 38, 2018.

WANG, C. et al. Transient expression of the GUS gene in a unicellular marine green alga, *Chlorella* sp. MACC/C95, via electroporation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, n. 2, p. 180-183, 2007.

WANG, L. et al. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. **Bioresource technology**, v. 129, p. 289-295, 2013.

WANG, W. et al. Medium screening and optimization for photoautotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with high lipid productivity indoors and outdoors. **Bioresource technology**, v. 170, p. 395-403, 2014.

XUE, J. et al. The pivotal role of malic enzyme in enhancing oil accumulation in green microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 120, 2016.

YAKHIN, O. I. et al. Biostimulants in plant science: a global perspective. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 2049, 2017.

YANG, B. et al. *Chlorella* species as hosts for genetic engineering and expression of heterologous proteins: progress, challenge and perspective. **Biotechnology journal**, v. 11, n. 10, p. 1244-1261, 2016.

YANG, B. et al. Development of a stable genetic system for *Chlorella vulgaris*—A promising green alga for CO<sub>2</sub> biomitigation. **Algal Research**, v. 12, p. 134-141, 2015.

YEN, H.-W. et al. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. **Bioresource technology**, v. 135, n. 0, p. 166-174, 2013.

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

ZUORRO, A. et al. Use of cell wall degrading enzymes to improve the recovery of lipids from *Chlorella sorokiniana*. **Chemical Engineering Journal**, 2018.

## ANEXOS

### Trabalhos publicados em periódicos indexados

SANTANA, H.; CEREIJO, C. R.; TELES, V. C.; NASCIMENTO, R. C.; FERNANDES, M. S.; BRUNALE, P.; CAMPANHA, R. C.; SOARES, I. P.; SILVA, F. C. P.; SABAINI, P. S.; SIQUEIRA, F. G. BRASIL, B S A F. *Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization*. **Bioresource technology**, v. 228, p. 133-140, 2017.

POSSA, G. C.; SANTANA, H.; BRASIL, B. S. A. F.; RONCARATTI, L. F. *Diel oscillation in the optical activity of carotenoids in the absorption spectrum of Nannochloropsis*. **Journal of molecular modeling**, v. 23, n. 3, p. 95, 2017.

FERNANDES, M. S.; CALSING, L. C. G.; NASCIMENTO, R. C.; SANTANA, H.; MORAIS, P. B.; DE CAPDEVILLE, G; BRASIL, B. S. A. F. *Customized cryopreservation protocols for chlorophytes based on cell morphology*. **Algal Research**, v. 38, p. 101402, 2019.



## Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization



Hugo Santana<sup>a,b</sup>, Carolina R. Cereijo<sup>a,c</sup>, Valérya C. Teles<sup>a,c</sup>, Rodrigo C. Nascimento<sup>a,c</sup>, Maiara S. Fernandes<sup>a,c</sup>, Patrícia Brunale<sup>a</sup>, Raquel C. Campanha<sup>a</sup>, Itânia P. Soares<sup>a</sup>, Flávia C.P. Silva<sup>a</sup>, Priscila S. Sabaini<sup>a</sup>, Félix G. Siqueira<sup>a,b,c</sup>, Bruno S.A.F. Brasil<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Embrapa Agroenergy, Brasília/DF, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista/BA, Brazil

<sup>c</sup> Universidade Federal do Tocantins, Gurupi/TO, Brazil

### HIGHLIGHTS

- A biorefinery strategy for microalgae cultivation using sugarcane vinasse is proposed.
- Screening of 40 microalgae allowed the selection of highly productive strains.
- The feedstock obtained can be used to provide proteins, carbohydrates and energy.
- The culture supernatant can be recycled for sugarcane crops fertilization.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 October 2016

Received in revised form 19 December 2016

Accepted 21 December 2016

Available online 23 December 2016

#### Keywords:

*Chlamydomonas*

*Micractinium*

Biorefinery

Photobioreactor

Wastewater

CO<sub>2</sub>

### ABSTRACT

Sugarcane ethanol is produced at large scale generating wastes that could be used for microalgae biomass production in a biorefinery strategy. In this study, forty microalgae strains were screened for growth in sugarcane vinasse at different concentrations. Two microalgae strains, *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 and *C. biconvexa* Embrapa|LBA40, presented vigorous growth in a light-dependent manner even in undiluted vinasse under non-axenic conditions. Microalgae strains presented higher biomass productivity in vinasse-based media compared to standard Bold's Basal Medium in cultures performed using 15 L airlift flat plate photobioreactors. Chemical composition analyses showed that proteins and carbohydrates comprise the major fractions of algal biomass. Glucose was the main monosaccharide detected, ranging from 46% to 76% of the total carbohydrates content according to the strain and culture media used. This research highlights the potential of using residues derived from ethanol plants to cultivate microalgae for the production of energy and bioproducts.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Microalgae-derived biomass is recognized as an alternative source for a wide variety of bioproducts, such as biofuels, essential oils, pigments and polymers (Perez-García et al., 2011). These photosynthetic microorganisms present higher growth rates and lower land area requirements compared to terrestrial crops commonly used for biofuels production. However, the production of microalgal biomass is still not economically viable due to high costs of cultivation, harvesting and processing (Quinn and Davis, 2015).

Significant cost reductions can be achieved if CO<sub>2</sub>, nutrients and water for microalgae cultivation are obtained at low cost (Brasil et al., 2016). Accordingly, the use of several types of waste streams derived from industrial processes, as well as rural/domestic wastewater, have been proposed for microalgae cultivation as a strategy for cost-reduction in microalgae cultivation (Kang et al., 2015).

A potential wastewater for microalgae cultivation is sugarcane vinasse. It is an acid, dark brown liquid, rich in organic compounds (e.g. glycerol, lactic acid, sugars), nitrogen, phosphorus and ions (e.g. K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) (Ortegón et al., 2016; Parnaudeau et al., 2008). It comprises the main by-product of sugarcane ethanol plants, being generated at 12–14 L per liter of ethanol produced. Although this wastewater is commonly applied in the fertirrigation

\* Corresponding author at: Av. W3 Norte (final), Asa Norte, Brasília, DF 70770-901, Brazil.

E-mail address: [bruno.brasil@embrapa.br](mailto:bruno.brasil@embrapa.br) (B.S.A.F. Brasil).

of sugarcane crops (Dias et al., 2015), its continuous application leads to changes in soil composition and reduces crop productivity (Christofolletti et al., 2013). The use of vinasse for microalgal biomass production has been proposed previously, however these studies showed that the use of sugarcane vinasse, even at low concentrations, can inhibit the growth of microalgae strains (dos Santos et al., 2016; Ramirez et al., 2014).

It is well known that not all strains are able to grow in adverse conditions such as that found in waste streams (Barrocal et al., 2010; Brasil et al., 2016). Therefore, the objectives of this study were to select highly productive microalgae strains capable of growing in sugarcane vinasse and to characterize algal growth requirements and nutrient uptake during cultivation. Additionally, the composition of algal biomass produced in 15 L capacity flat-plate photobioreactors supplemented with CO<sub>2</sub> was analyzed in order to evaluate the strains potential for the production of energy and bioproducts.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microalgae strains and inoculum preparation

Axenic microalgae cultures of Embrapa|LBA1 to Embrapa|LBA40 strains (S1 Table) derived from the Collection of Microorganisms and Microalgae Applied to Agroenergy and Biorefineries at Embrapa (Brasília/DF – Brazil) were used. Strains were kept in liquid cultures of Bold's Basal Medium – BBM medium (Nichols and Bold, 1965) containing ampicillin (100 µg/mL), chloramphenicol (25 µg/mL) and amphotericin B (2.5 µg/mL), at 26 °C ± 1 °C, light intensity of 50 µEm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and 12/12 h light/dark regimen.

For inoculum preparation, microalgae strains were axenic cultured in BBM using Erlenmeyer flasks under 12/12 h light/dark regimen (light intensity of 100 µEm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), at 26 °C ± 1 °C and aeration with 5 L·h<sup>-1</sup> of atmospheric air. During log phase of growth, these starter cultures were used to inoculate experimental units (i.e.; Erlenmeyer flasks or flat-plate photobioreactors) at an initial absorbance of 0.01 at 680 nm. Inoculum volumes ≤5% of the working load were used.

### 2.2. Sugarcane vinasse and medium preparation

Crude sugarcane vinasse was obtained from Jalles Machado (Goianésia/Brazil) ethanol plant. Crude vinasse samples, referred hereafter only as “crude vinasse”, were centrifuged at 4800 RCF during 10 min to remove suspended solids and debris. Diluted vinasse formulations, referred hereafter only as “diluted vinasse”, were prepared by addition of distilled water to crude vinasse at the proportions indicated (i.e.: 25%, 50% or 75%). Clarified vinasse formulation, referred hereafter only as “clarified vinasse”, was prepared as follows: Hydrated lime (Ca(OH)<sub>2</sub>) was added to crude vinasse (3 g·L<sup>-1</sup>). The solution was maintained at rest for 40 min, then centrifuged at 4800 RCF during 10 min and the supernatant was collected. All vinasse-based media formulations were sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min and stored at 4 °C until use. Transmittance of vinasse-based media formulations was measured by spectrophotometry using Spectramax M3 plate analyzer.

### 2.3. Selection of microalgae for growth in vinasse

Embrapa|LBA1 to Embrapa|LBA40 microalgae strains (N = 40) were screened for growth in sugarcane vinasse. Starter cultures of each strain were inoculated in 250 mL of either diluted vinasse formulations at 25%, 50% and 75% concentration in distilled water or in 100% crude vinasse. Culturing was performed in sterile 500 mL Erlenmeyer flasks aerated with 5 L·h<sup>-1</sup> of atmospheric

air, at 26 °C ± 1 °C, light intensity of 100 µEm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> in a 16/8 h light/dark regimen. Microalgae growth was daily monitored through microscopic inspection during 30 days of culturing.

### 2.4. Microalgae cultivation

Selected microalgae strains were submitted to cultivation in 250 mL of crude vinasse or BBM (control) under different conditions: I) Axenic culturing using crude vinasse at 12/12 h light/dark regimen; II) Axenic culturing using crude vinasse without light (dark condition); III) Non-axenic culturing using crude vinasse (pH adjusted to 8.0) at 12/12 h light/dark regimen; IV) Axenic culturing using BBM at 12/12 h light/dark regimen. Culturing was performed in 500 mL Erlenmeyer flasks aerated with 5 L·h<sup>-1</sup> of atmospheric air, at 26 °C ± 1 °C, light intensity of 100 µEm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> in a 12/12 h light/dark regimen.

### 2.5. Biomass dry weight determination

For biomass dry weight determination, 10 mL samples of the algal culture were collected, centrifuged during 10 min at 10700 RCF and the supernatant discarded. The pellet was washed through three cycles of resuspension in distilled water followed by 10 min centrifugation at 10700 RCF. The washed pellet was dried overnight using a dry oven at 105 °C and weighted.

### 2.6. Determination of organic compounds concentration in vinasse-based media

The concentration of total reducing sugars (glucose + fructose + sucrose), glycerol, lactic acid and acetic acid in vinasse-based media at the beginning (day 0) and the end (day 8) of microalgae cultivation (Section 2.4) was determined. One milliliter (1 mL) culture samples were collected, centrifuged for 10 min. at 10,700 RCF and the supernatant was analyzed through High Performance Liquid Chromatography analysis (Agilent 1260 Infinity Binary LC System) using Biorad Aminex HPX-87H column (H2SO4 0.005 M, 0.6 mL/min, 45 °C).

### 2.7. Microalgae cultivation in airlift flat-plate photobioreactors

Selected microalgae strains were cultivated in either diluted vinasse (50%), clarified vinasse or BBM (control) under non-axenic conditions using airlift flat-plate photobioreactors at 13 L of working load (Supplementary Fig. 2). Culturing was conducted for 3 days at 12 h/12 h light/dark regimen (light intensity of 400 µEm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) and a temperature of 37 °C ± 1 °C during light period and 24 ± 1 °C during dark period. Aeration with 64 L·h<sup>-1</sup> of atmospheric air supplemented with 5% CO<sub>2</sub> was provided.

### 2.8. Analysis of biomass biochemical composition

After cultivation, algal biomass was harvested by centrifugation at 4800 RCF during 10 min. The biomass was washed three times with distilled water followed by 10 min centrifugation (4800 RCF) and freeze-dried prior biochemical analysis. The following analysis were performed: Total ash content (Van Wychen and Laurens, 2013c); total protein by the Kjeldahl method (AOAC, 1990), using the nitrogen-protein conversion factor proposed for microalgae (Lourenço et al., 2004); total carbohydrates (Van Wychen and Laurens, 2013a); total carotenoids (Huang and Cheung, 2011); and fatty acid (Van Wychen and Laurens, 2013b). For the determination of the calorific value, the microalgal biomass was analyzed using the protocol described by ASTM (2013).

### 2.9. Determination of carbohydrates profile on harvested biomass

For determination of the carbohydrates profile of the harvested biomasses, the samples were hydrolysed following the methodology proposed by Van Wychen and Laurens (2013a). The carbohydrate profile of the obtained samples was determined using the methodology proposed by Basumallick and Rohrer (2012). The analysis was performed using an ion-exchange chromatography, HPAE-PAD (Dionex ICS 500+ Thermo Scientific), using Dionex Carbo Pac™ SA10-4  $\mu\text{m}$ ,  $4 \times 250$  mm and pre-column, with a PAD (Pulsed Amperometric Detection) detector. Elution by gradient with mobile phase composed by 1 mM KOH solution was used. The temperature of the column was 45 °C and 10 °C for the sample. The carbohydrate determination was performed by comparison with the retention times of the analytic standards. Analytical curves of the carbohydrates detected in the samples were used for quantification.

### 2.10. Determination of vinasse-based media composition

The composition of vinasse-based media at the beginning (day 0) and the end (day 3) of microalgae cultivation in airlift flat-plate photobioreactors (Section 2.7) was determined. Samples were collected, centrifuged for 10 min. at 4800 RCF and the supernatant used for analysis. The following standard methods described by the American Public Health Association (APHA) et al. (2012) were used: SM5210B – Biochemical Oxygen Demand (BOD); QAM.IT.FQ.16A – Chemical Oxygen demand (COD); SM 4500-O/D – Total organic carbon; SM 4500-NO<sub>2</sub>-B – Nitrite (NO<sub>2</sub>-); SM4500-NH<sub>3</sub> – Ammoniacal nitrogen(NH<sub>4</sub>+); SM 4500-P E – Phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>); SM 3500-K B – Total potassium (K+). For nitrate (NO<sub>3</sub>-) levels, was used the method NBR 12620 (1992).

### 2.11. Statistical analysis

All the experiments were conducted in three independent replicates (N=3). The results are presented as means of the replicates  $\pm$  error bars. The analysis of variance used Tukey test with 95% confidence. Statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism 5.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Screening of microalgae strains for growth in vinasse

The screening of forty (40) microalgae strains (Supplementary Table 1) resulted in the selection of two strains, Embrapa|LBA32, a not formally described species of *Micractinium* genus isolated from a natural lagoon in the Amazon rainforest (Hadi et al., 2016), and Embrapa|LBA40, a *Chlamydomonas biconvexa* strain isolated from a sugarcane vinasse stabilization pond from an ethanol plant in Brazil (Hadi et al., 2016) (Supplementary Fig. 1). These strains were able to grow in all media formulations tested, including crude vinasse (data not shown). These results seem to be congruent with the lack of reports in the literature presenting strains capable of vigorous growth in vinasse at high concentrations (dos Santos et al., 2016; Kadioğlu and Algur, 1992).

The selected strains were cultivated in aerated Erlenmeyer's flasks containing 100% crude vinasse under different conditions to evaluate the effect of light and microbial contaminants upon microalgae growth (Fig. 1). Both strains presented similar growth in BBM and crude vinasse under axenic conditions using 12 h/12 h light/dark regimens. On the other hand, algal growth was impaired in the absence of light. These results indicate that both *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 (Fig. 1A) and *C. biconvexa*

Embrapa|LBA40 (Fig. 1B) are able to directly uptake crude vinasse nutrients, in a light dependent manner, without need of substrate metabolism by other microorganisms. This result is consistent with the findings of Ramirez et al. (2014), which reported that *Scenedesmus* sp. growth in medium supplemented with vinasse increases in a light dependent manner. In non-axenic algal cultures, crude vinasse pH was adjusted to 8.0 before inoculation to reduce contamination by heterotrophic microorganisms (Fig. 1).

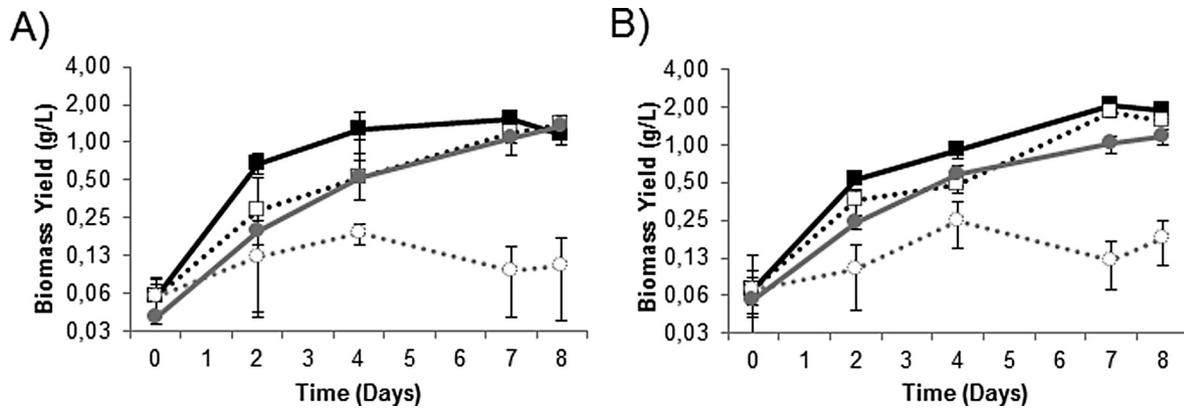
### 3.2. Uptake of organic compounds present in vinasse during algal cultivation

After cultivation in crude vinasse, the concentrations of glucose, fructose, sucrose, glycerol, lactic acid and acetic acid present in *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 and *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 cultures supernatants were evaluated (Fig. 2). When cultivation was performed in the absence of light, no statistically significant change in the concentration of the organic compounds evaluated could be observed (Fig. 2A). This finding is congruent with impaired algal growth under this condition (Fig. 1). When light/dark cycling is applied to axenic cultures, the culture supernatants of both strains presented a significant reduction in glycerol, but not in Total Reducing Sugars (TRS: glucose + fructose + sucrose), lactic acid or acetic acid concentrations (Fig. 2B). On the other hand, when the microalgae strains were cultured under non-axenic conditions, reductions on TRS, lactic acid and glycerol concentrations were detected (Fig. 2C). Furthermore, a reduction in acetic acid concentration was also observed in *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 cultures supernatants (Fig. 2C). The uptake of organic compounds observed in non-axenic cultures (Fig. 2C) is probably associated with the presence of heterotrophic contaminants, such as airborne bacteria and yeasts. Taken together, the results shown in Fig. 1 and Fig. 2 indicate that cultivation of both *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 and *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 leads to a decrease in glycerol levels in a light-dependent manner during growth in crude vinasse. This is indicative that strains *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 and *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 perform photo-heterotrophic metabolism. The main difference between mixotrophy and photo-heterotrophy is that photo-heterotrophic cultivation requires both organic carbon and light at the same time, while mixotrophy uses either one alternatively (Wang et al., 2014). Accordingly, studies have reported that some microalgae strains can metabolize glycerol as a primary carbon source (Ceron Garcia et al., 2006; Ethier et al., 2011). Furthermore, strains from the genera *Micractinium* and *Chlamydomonas* are able to grow in wastewater by metabolizing both organic and inorganic carbon sources (Bouarab et al., 2004; Wang and Park, 2015).

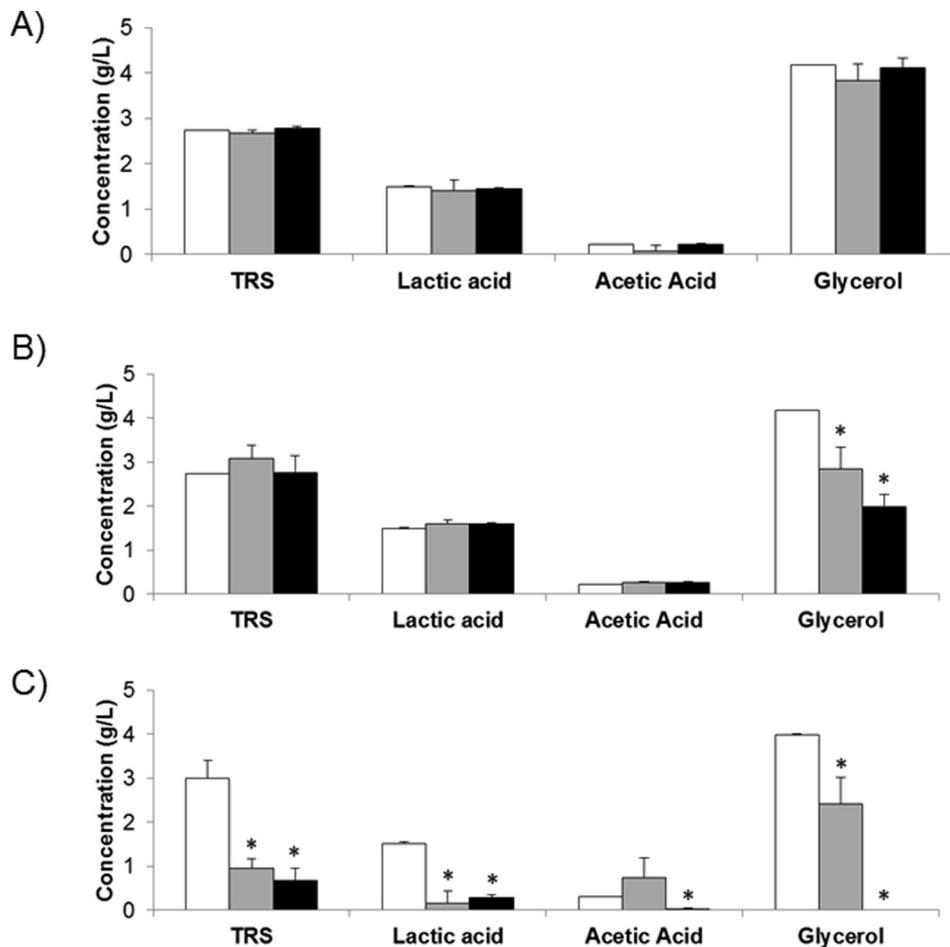
On the other hand, there are studies that suggest that glycerol uptake can be related to algal cell osmoregulation processes in media with high osmolarity (Anderca et al., 2004; Lin et al., 2013), which is the case of the vinasse (Christofolletti et al., 2013). This uptake could potentially reduce glycerol biosynthesis through starch breakdown, favoring microalgal growth (Goyal, 2007). The determination of the pathway involved with glycerol uptake and metabolism on *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 and *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 during growth in sugarcane vinasse, though, remains an issue to be pursued in future studies.

### 3.3. Cultivation of microalgae in vinasse using airlift flat plate photobioreactors

The scaling-up of the cultivation system is an essential step in order to integrate microalgae cultivation to the ethanol industry in a biorefinery strategy. At large-scale, cultivation parameters cannot be easily controlled, which makes it necessary to use strains that are not easily affected by culture variations and are



**Fig. 1.** Microalgae growth in vinasse. The strains *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 (A) and *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 (B) were grown for eight days using atmospheric air aerated erlenmeyers flasks at  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  under the following conditions: (.....○.....) Crude vinasse, axenic culture in the dark; (.....□.....) Crude vinasse, axenic culture, 12 h/12 h light/dark regimen; (—■—) Crude vinasse (pH 8.0), non-axenic culture, 12 h/12 h light/dark regimen and (—●—) BBM, axenic culture, 12 h/12 h light/dark regimen. Experiments were conducted in triplicates ( $n = 3$ ) and the results are presented as mean  $\pm$  error bars.



**Fig. 2.** Concentration of organic compounds in crude vinasse cultures. Microalgae strains were grown in crude vinasse for eight days using aerated erlenmeyers flasks at  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  under the following conditions: (A) Axenic under dark; (B) Axenic under 12 h/12 h light/dark regimen; (C) Non-axenic under 12 h/12 h light/dark regimen. The concentration of TRS (Total Reducing Sugars: glucose + fructose + sucrose), lactic acid, acetic acid and glycerol present in culture supernatants was measured through HPLC analysis at day 0 (□) and after 8 days of *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 (■) and *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 (■) cultivation. Experiments were conducted in triplicates ( $n = 3$ ) and the results are presented as mean  $\pm$  error bars. Paired  $t$ -test was performed to determinate significant variations in the samples in comparison to uncultured vinasse. Variation was considered significant (\*) when  $p$ -value is  $<0.05$  compared to the initial condition (day 0).

competitive with contaminants in non-axenic conditions (Christenson and Sims, 2011). This is particularly challenging while dealing with cultivation media with high organic load (i.e.: high BOD and COD), such as vinasse, which promotes the growth of heterotrophic contaminants.

In the present work, the cultivation of *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 and *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 in vinasse was scaled-up in 15L airlift flat plate photobioreactors aerated with atmospheric air enriched with 5%  $\text{CO}_2$  under non-axenic conditions. However, the initial attempts to perform cultivation using

**Table 1**

Comparison table of biomass productivity obtained with strains cultured under different conditions. The strains *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 (A) and *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 cultivated in this study were cultivated in air lift flat plate photobioreactors using BBM (Bold's Basal Medium), 50% diluted vinasse or clarified vinasse. Results are presented as mean  $\pm$  error bars of triplicate experiments (n = 3).

Strain	Culture conditions	Biomass productivity (mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	Reference
<i>Micractinium</i> sp. Embrapa LBA32	Bold's Basal Medium	101.11 ( $\pm$ 15.75)	This study
<i>Micractinium</i> sp. Embrapa LBA32	50% water diluted vinasse	177.78 ( $\pm$ 5.09)	This study
<i>Micractinium</i> sp. Embrapa LBA32	100% clarified vinasse	164.44 ( $\pm$ 15.75)	This study
<i>C. biconvexa</i> Embrapa LBA40	Bold's Basal Medium	132.22 ( $\pm$ 15.40)	This study
<i>C. biconvexa</i> Embrapa LBA40	50% water diluted vinasse	182.22 ( $\pm$ 16.44)	This study
<i>C. biconvexa</i> Embrapa LBA40	100% clarified vinasse	222.22 ( $\pm$ 10.71)	This study
<i>Spirulina maxima</i> (SAG 49.88)	Schlösser medium supplemented with beet vinasse (5 g·L <sup>-1</sup> )	150.00	Barrocal et al. (2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Anaerobic digested sugarcane vinasse	70.00	Marques et al. (2013)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Guillard Medium supplement with sugarcane vinasse (50%)	24.00	Ramirez et al. (2014)
<i>Botryococcus braunii</i>	Chu 13 medium supplemented with sugarcane molasses (15 g·L <sup>-1</sup> )	113.00	Yeesang and Cheirsilp (2014)
<i>Spirulina maxima</i>	AO medium supplemented with sugarcane vinasse (1%)	47.73	Dos Santos et al. (2016)

crude vinasse (pH 8.0) failed due to outgrowth of contaminants, especially filamentous fungi (data not shown). In addition, since the selected strains grow in a light-dependent manner, the increase in vinasse light transmittance is also required to achieve high algal biomass productivities. In order to circumvent these limitations, three strategies were employed to favor algal growth: (i) elevating pH of vinasse-based media to 8.0 to minimize growth of fungal contaminants; (ii) shortening batch cultures period in photobioreactors to 3 days (end of microalgae exponential growth phase); (iii) increasing light transmittance in the medium through vinasse dilution in distilled water or chemical clarification. The vinasse dilution and clarification processes improved the light transmittance at wavelengths >600 nm up to 74% and 67.5%, respectively, improving the light penetration at the chlorophyll absorption peaks wavelengths (Supplementary Fig. 3). Under these conditions the biomass productivities achieved by *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 and *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 using 50% diluted vinasse and clarified vinasse were even higher than that observed for BBM (Table 1). Also, microscopic monitoring of cultures confirmed microalgae as the most abundant organisms present with limited contamination by other microorganisms (data not shown).

In the literature, there are reports of successful cultivation of microalgae strains using vinasse. However, the use of this effluent at high concentrations seems to inhibit algal growth. Barrocal et al. (2010) reported biomass dry weight productivities ranging from 240 to 0 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> in *Spirulina maxima* cultures using synthetic media supplemented with 1 g·L<sup>-1</sup> to 7 g·L<sup>-1</sup> of beet vinasse, respectively. Similarly, studies of Ramirez et al. (2014) reported cultivation of *Scenedesmus* sp. in synthetic medium supplemented with sugarcane vinasse up to 50%, however, the productivities obtained were lower under this condition (i.e.: 24 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> of biomass dry weight). Using a distinct approach, Marques et al. (2013) reported that anaerobic biodegradation of vinasse before *Chlorella vulgaris* cultivation increased algal biomass productivity up to 70 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. In here, *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 and *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 strains were grown in 50% diluted vinasse or 100% clarified vinasse and showed average productivities up to 222 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> of biomass dry weight (Table 1).

These findings highlight the importance of screening and selecting robust microalgae strains capable of maintaining high growth rates in wastewater-based cultivation systems. Indeed, it is unlikely that one species/strain of microalgae will thrive in several substrates given the distinct and complex mixtures found in each

type of residue/wastewater (Brasil et al., 2016). Therefore, strains will probably be specific for each substrate as indicated by the higher productivities obtained with indigenous microalgae grown in produced water, for example (Brasil et al., 2016; Wood et al., 2015). Not surprisingly, the strain *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 selected in the present study is an autochthonous microalgae isolated from a sugarcane vinasse stabilization pond (Hadi et al., 2016).

### 3.4. Analysis of algal biomass and culture supernatants composition

Microalgae can produce various bioproducts of commercial interest for the industry. Carbohydrates for production of chemicals, proteins for use as animal feed, and lipids for biodiesel, are some examples of such compounds (Benemann, 2013; Pulz and Gross, 2004). The production of these metabolites, however, depends on the microalgae strain and cultivation conditions.

In this study, biomasses and culture supernatants from flat plate photobioreactors batch cultures of *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 and *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 strains were analyzed (Tables 2 and 3). The results showed an increase in protein content of microalgal biomass (Table 2), that was paralleled by the significant reduction in nitrate levels on the supernatant of vinasse-based media (Table 3). Another important finding is that the nutrient load of vinasse remains largely unaltered after algal cultivation (Table 3). The growth of neither microalgae strain significantly altered the BOD, COD, organic carbon, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> or K<sup>+</sup> content of vinasse-based media (Table 3), allowing further use of culture supernatants for sugarcane crops fertilization/irrigation and contributing to biorefinery integration.

However, a decrease in carotenoids, carbohydrates and fatty acids content during the cultivation of both strains in vinasse formulations compared to BBM was observed (Table 2). Similar results were obtained by Wang et al. (2013), and Del Campo et al. (2007), showing that there is an inverse correlation between protein accumulation and carbohydrates and/or lipid content, including carotenoids, in algal biomass. Since the nitrate levels are significantly higher in vinasse-based media than in BBM, it is possible to hypothesize that the high availability of this nitrogen source is one of the factors that contributed to the accumulation of proteins instead of other compounds (Table 2). It is important to emphasize though, that the higher biomass productivity achieved in vinasse-based media (Table 1) partly compensate the

**Table 2**  
Productivity, composition and year round estimates of microalgal biomass produced in flat-plate photobioreactors. *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 and *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 strains were cultivated for 3 days in BBM, 50% diluted vinasse and clarified vinasse. Results are presented as mean  $\pm$  error bars of triplicate experiments ( $n = 3$ ). One-way ANOVA with Tukey post-test was used to evaluate the differences ( $p$ -value  $< 0.05$ ). Different letter (a, b, c) means statistically different. Year round estimates were performed considering  $200 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  with 240 working days per year.

	<i>Micractinium</i> sp. Embrapa LBA#32			<i>Chlamydomonas biconvexa</i> Embrapa LBA#40		
	100% BBM	50% Diluted Vinasse	100% Clarified Vinasse	100% BBM	50% Diluted Vinasse	100% Clarified Vinasse
Carbohydrates content (%)	28.21 ( $\pm 0.24$ )a	17.55 ( $\pm 0.03$ )b	21.79 ( $\pm 0.36$ )c	31.61 ( $\pm 0.18$ )a	13.50 ( $\pm 0.76$ )b	11.71 ( $\pm 0.14$ )c
Carbohydrates productivity ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	28.50 ( $\pm 4.29$ )a	31.20 ( $\pm 1.05$ )a	35.87 ( $\pm 3.98$ )a	31.79 ( $\pm 4.88$ )a	24.58 ( $\pm 2.48$ )b	26.03 ( $\pm 1.22$ )b
Protein content (%)	34.03 ( $\pm 0.10$ )a	39.50 ( $\pm 0.47$ )b	39.62 ( $\pm 0.09$ )b	30.96 ( $\pm 0.17$ )a	41.68 ( $\pm 0.35$ )b	39.92 ( $\pm 0.60$ )c
Protein productivity ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	34.40 ( $\pm 5.36$ )a	70.20 ( $\pm 1.20$ )b	65.15 ( $\pm 6.20$ )b	40.94 ( $\pm 4.94$ )a	71.27 ( $\pm 6.29$ )b	88.71 ( $\pm 4.83$ )b
Carotenoid content ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	669.85 ( $\pm 10.86$ )a	192.08 ( $\pm 24.66$ )b	26.34 ( $\pm 3.15$ )c	805.26 ( $\pm 174.46$ )a	165.61 ( $\pm 22.58$ )b	12.97 ( $\pm 0.01$ )c
Carotenoid productivity ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ )	19.10 ( $\pm 2.98$ )a	5.99 ( $\pm 0.74$ )b	0.95 (0.18)c	33.94 (9.74)a	4.05 ( $\pm 0.54$ )b	0.33 ( $\pm 0.02$ )c
Fatty acid content (%)	3.23 ( $\pm 0.55$ )a	2.21 ( $\pm 0.44$ )a	2.50 ( $\pm 1.30$ )a	2.06 ( $\pm 0.35$ )a	1.58 ( $\pm 0.21$ )ac	1.26 ( $\pm 0.07$ )bc
Fatty acid productivity ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	3.22 ( $\pm 0.45$ )a	3.94 ( $\pm 0.90$ )a	3.99 ( $\pm 1.64$ )a	2.73 ( $\pm 0.64$ )a	2.88 ( $\pm 0.50$ )a	2.79 ( $\pm 0.26$ )a
Calorific value ( $\text{cal} \cdot \text{g}^{-1}$ )	5037.81 ( $\pm 16.25$ )a	5184.49 ( $\pm 36.85$ )b	5260.21 ( $\pm 44.65$ )b	5069.56 ( $\pm 34.53$ )a	5137.54 ( $\pm 17.86$ )bc	5114.23 ( $\pm 19.35$ )ac
Ash content (%)	3.21 ( $\pm 0.30$ )a	6.00 ( $\pm 0.15$ )b	5.83 ( $\pm 0.36$ )b	5.44 ( $\pm 0.28$ )a	6.09 ( $\pm 0.54$ )ac	6.67 ( $\pm 0.31$ )bc
<b>Year round estimates</b>						
Bio-ethanol ( $\text{L} \cdot \text{year}^{-1}$ ) <sup>1</sup>	646.55	707.75	813.58	716.91	557.58	590.35
Biodiesel ( $\text{kg} \cdot \text{year}^{-1}$ ) <sup>2</sup>	155.00	189.01	191.38	98.75	134.36	138.18

Year round estimates considering  $200 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  with 240 working days per year (Cabanelas et al., 2013).

<sup>1</sup> Estimated based on the conversion rate of 0.6 L per kg of total carbohydrates (Cabanelas et al., 2013).

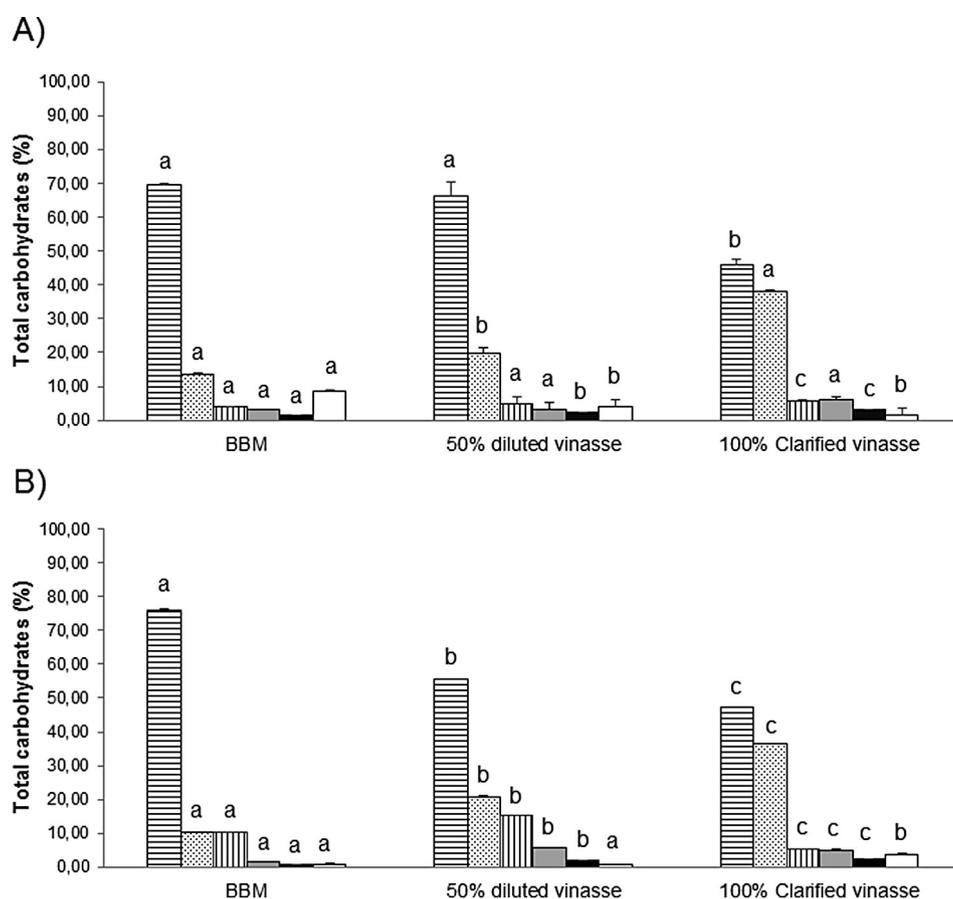
<sup>2</sup> Estimated based on the conversion rate of 1 kg of fatty acid to 1 kg of biodiesel (Cabanelas et al., 2013).

**Table 3**  
Vinasse composition after microalgae cultivation using flat-plate photobioreactors. Analysis of the supernatant of 3 days cultures of the strains *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 and *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 after 3 days of cultivation in 50% diluted vinasse or clarified vinasse. Results are presented as mean  $\pm$  error bars of triplicate experiments ( $n = 3$ ). One-way ANOVA with Tukey post-test was used to evaluate the differences ( $p$ -value  $< 0.05$ ). Different letter (a, b, c) means statistically different. N.D. (Not detected,  $< 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

	50% Diluted Vinasse			100% Clarified Vinasse		
	Initial condition	LBA#32 culture supernatant	LBA#40 culture supernatant	Initial condition	LBA#32 culture supernatant	LBA#40 culture supernatant
Biochemical Oxygen Demand ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	3.74 ( $\pm 0.20$ )a	4.98 ( $\pm 0.21$ )a	5.36 ( $\pm 1.45$ )a	9.64 ( $\pm 0.69$ )a	11.73 ( $\pm 2.09$ )a	12.23 ( $\pm 2.50$ )a
Chemical Oxygen Demand ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	8.93 ( $\pm 1.45$ )a	12.08 ( $\pm 0.25$ )a	13.38 ( $\pm 2.51$ )a	22.65 ( $\pm 2.64$ )a	26.85 ( $\pm 0.78$ )a	27.98 ( $\pm 0.32$ )a
Total organic carbon ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	13.14 ( $\pm 0.68$ )a	12.59 ( $\pm 0.29$ )a	10.87 ( $\pm 0.97$ )a	25.66 ( $\pm 1.85$ )a	23.80 ( $\pm 1.95$ )a	24.42 ( $\pm 1.47$ )a
Nitrate ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	21.49 ( $\pm 1.24$ )a	11.50 ( $\pm 0.00$ )b	13.00 ( $\pm 1.41$ )b	39.41 ( $\pm 0.99$ )a	21.00 ( $\pm 1.41$ )b	27.25 ( $\pm 1.06$ )c
Nitrite ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0.10 ( $\pm 0.01$ )a	0.07 ( $\pm 0.01$ )a	0.09 ( $\pm 0.01$ )a	0.15 ( $\pm 0.02$ )a	0.27 ( $\pm 0.06$ )a	0.27 ( $\pm 0.04$ )a
Ammoniacal nitrogen ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	N.D.	N.D.	N.D.	9.25 ( $\pm 2.52$ )a	5.63 ( $\pm 0.88$ )a	N.D.
Phosphate ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	11.95 ( $\pm 0.35$ )a	11.45 ( $\pm 2.05$ )a	21.20 ( $\pm 4.53$ )a	18.47 ( $\pm 3.29$ )ab	19.05 ( $\pm 0.64$ )a	15.15 ( $\pm 1.20$ )b
Total potassium ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	1954.52 ( $\pm 311.13$ )a	1368.00 ( $\pm 223.45$ )a	1317.00 ( $\pm 151.32$ )a	2362.02 ( $\pm 265.17$ )a	2996.00 ( $\pm 82.02$ )ab	3092.00 ( $\pm 53.74$ )b

decrease in these metabolites contents leading to carbohydrates and fatty acids productivities similar to those obtained in BBM cultures (Table 2). This finding contributes positively to the economic feasibility of using this wastewater for microalgae cultivation and its use as feedstock for biodiesel or ethanol production (Table 2) (Supplementary Table 2).

Carbohydrates comprise the second major fraction present in algal biomass produced in vinasse-based media and could be used for the production of ethanol (Chen et al., 2013) (Table 2). The results of carbohydrate characterization also showed that the strains *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 and *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 accumulate mainly glucose-based carbohydrates when cultured in



**Fig. 3.** Carbohydrate profile of the biomass obtained with the cultivation in air lift flat-plate photobioreactors. The biomass of the strains *Micractinium sp.* Embrapa|LBA32 (A) and *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 (B) cultured in BBM, 50% diluted vinasse and 100% clarified vinasse were analyzed for its carbohydrate profile. Were analyzed the contribution of glucose (▨), galactose (▩), mannose (▧), ribose (■), myo-inositol (■) and Xylose + Arabinose (□). Experiments were conducted in triplicates (n = 3) and the results are presented as mean ± error bars. Statistical analysis was performed comparing the three media formulations for each carbohydrate separately using One-way ANOVA with Tukey post-test. Differences were considered significant if p-value < 0.05. Different letters (a, b, c) means statistically different.

BBM or vinasse (Fig. 3). However, the cultivation in vinasse-based media changed significantly the carbohydrate profile, especially in clarified vinasse formulations, showing the decrease of glucose-based carbohydrates and increase of galactose content for both strains (Fig. 3). Both these sugars are fermentable and can be used for ethanol production, for example, however most fermenting microorganisms cannot metabolize galactose until the depletion of glucose (De Vos and Hugenholtz, 2004). This can limit the application at large scale of vinasse-produced biomass due to reduced overall productivity in fermentative processes (Kim et al., 2012). Factors such as low nitrogen levels, alkaline pH and optimum CO<sub>2</sub> supplementation should be used in future studies aiming the optimization of carbohydrate accumulation (Markou et al., 2012).

An alternative application of algal biomass (or its residual fraction) in a sugarcane-ethanol plant would be the generation of power through combustion. In this study, the algal biomasses obtained have calorific values (Table 2) quite similar to that observed for sugarcane bagasse, which is the usual source of biomass for energy cogeneration in ethanol plants (Dias et al., 2011). However, it is important to highlight that the high water content of algal biomasses can represent a major obstruction for its utilization (Jin et al., 2014). Considering that an algal biomass contains up to 60% of water, the specific heat capacity and latent heat of vaporization of water must be considered. In this condition, is possible to estimate that the calorific value of the algal biomass obtained in this study with 60% of moisture is approximately 2054 cal·g<sup>-1</sup>, in which at least 19% (cal·g<sup>-1</sup>) of the biomass energy would be necessary to evaporate the biomass water. Furthermore,

others factors such as boiler efficiency and steam cycle efficiency, influence the overall efficiency of converting biomass energy in electricity (Luk et al., 2013). Accordingly, the overall energy efficiency obtained from Jin et al. (2014) when using algal biomasses for power generation was around 30%. Therefore, future studies focusing on techno-economic analyzes of the whole process, including the kinetic modelling of microalgae growth, are required to provide critical data on economic and environmental sustainability of this alternative.

#### 4. Conclusions

The isolation and screening of indigenous microalgae strains for the capacity of growing in sugarcane vinasse, allowed the selection of strains with high biomass productivity. The composition of algal biomass produced in vinasse-based media revealed large yields of proteins, carbohydrates and calorific power useful for industrial application. In addition, after algal cultivation, the culture supernatants could be recycled for sugarcane crop fertilization contributing to techno-economic feasibility of the biorefinery. However, there are still issues related to the low light transmittance of vinasse and the control of microbial contaminants in the culture that will pose major challenges to future large-scale cultivation.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brazil), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP – Brazil) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq – Brazil) for supporting this work. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.075>.

## References

- Anderca, M.I., Suga, S., Furuichi, T., Shimogawara, K., Maeshima, M., Muto, S., 2004. Functional identification of the glycerol transport activity of *Chlamydomonas reinhardtii* CrMIP1. *Plant Cell Physiol.* 45 (9), 1313–1319.
- AOAC, 1990. Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis. 15th ed. In: Helrich (Ed.), AOAC: Official Methods of Analysis 15th ed., Vol. 1 Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA, pp. 69–90.
- APHA, AWWA, WEF., 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Charles Darwin House, Washington, DC.
- ASTM, 2013. ASTM D5865–13 – Standard Test Method for Gross Calorific Value of Coal and Coke. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- Barrocal, V.M., Garcá-Cubero, M.T., González-Benito, G., Coca, M., 2010. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. *New Biotechnol.* 27 (6), 851–856.
- Basumallick, L., Rohrer, J., 2012. Application Note 282: Rapid and Sensitive Determination of Biofuel Sugars by Ion Chromatography. Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA.
- Benemann, J., 2013. Microalgae for biofuels and animal feeds. *Energies* 6 (11), 5869–5886.
- Bouarab, L., Dauta, A., Loudiki, M., 2004. Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration. *Water Res.* 38 (11), 2706–2712.
- Brasil, B.S., Silva, F.C., Siqueira, F., 2016. Microalgae biorefineries: the Brazilian scenario in perspective. *New Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.04.007>.
- Cabanelas, I.T.D., Arbib, Z., Chinalia, F.A., Souza, C.O., Perales, J.A., Almeida, P.F., Druzian, J.I., Nascimento, I.A., 2013. From waste to energy: microalgae production in wastewater and glycerol. *Appl. Energy* 109, 283–290.
- Ceron Garcia, M., Camacho, F.G., Mirón, A.S., Sevilla, J.F., Chisti, Y., Grima, E.M., 2006. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16 (5), 689.
- Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., Bai, F.-W., Chang, J.-S., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* 78, 1–10.
- Christenson, L., Sims, R., 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* 29 (6), 686–702.
- Christofolletti, C.A., Escher, J.P., Correia, J.E., Marinho, J.F.U., Fontanetti, C.S., 2013. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste Manag.* 33 (12), 2752–2761.
- De Vos, W.M., Hugenholtz, J., 2004. Engineering metabolic highways in lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* 22 (2), 72–79.
- Del Campo, J.A., García-González, M., Guerrero, M.G., 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 (6), 1163–1174.
- Dias, M.O., Modesto, M., Ensinas, A.V., Nebra, S.A., Maciel Filho, R., Rossell, C.E., 2011. Improving bioethanol production from sugarcane: evaluation of distillation, thermal integration and cogeneration systems. *Energy* 36 (6), 3691–3703.
- Dias, M.O.S., Maciel Filho, R., Mantelatto, P.E., Cavalett, O., Rossell, C.E.V., Bonomi, A., Leal, M.R.L.V., 2015. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. *Environ. Dev.* 15, 35–51.
- dos Santos, R.R., Araujo Ode, Q., de Medeiros, J.L., Chaloub, R.M., 2016. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. *Bioresour. Technol.* 204, 38–48.
- Ethier, S., Woisard, K., Vaughan, D., Wen, Z., 2011. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Bioresour. Technol.* 102 (1), 88–93.
- Goyal, A., 2007. Osmoregulation in *Dunaliella*, Part II: photosynthesis and starch contribute carbon for glycerol synthesis during a salt stress in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol. Biochem.* 45 (9), 705–710.
- Hadi, S.I.A., Santana, H., Brunale, P.P.M., Gomes, T.G., Oliveira, M.D., Matthiensen, A., Oliveira, M.E.C., Silva, F.C.P., Brasil, B.S.A.F., 2016. DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PLoS One* 11 (2), e0149284.
- Huang, J.J., Cheung, P.C., 2011. Enhancement of polyunsaturated fatty acids and total carotenoid production in microalgae by ultraviolet band A (UVA, 365 nm) radiation. *J. Agric. Food Chem.* 59 (9), 4629–4636.
- Jin, L., Gebreegziabher, T., Yu, Z., Oyedun, A.O., Yi, Z., Maojian, W., Hui, C.W., 2014. Modeling and optimization of microalgae drying for power generation. *Energy Procedia* 61, 168–171.
- Kadioglu, A., Algur, Ö.F., 1992. Tests of media with vinasse for *Chlamydomonas reinhardtii* for possible reduction in vinasse pollution. *Bioresour. Technol.* 42 (1), 1–5.
- Kang, Z., Ramanan, R., Yang, J.W., Kim, H.S., 2015. A cost analysis of microalgal biomass and biodiesel production in open raceways treating municipal wastewater and under optimum light wavelength. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (1), 109–118.
- Kim, S.R., Ha, S.-J., Wei, N., Oh, E.J., Jin, Y.-S., 2012. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol.* 30 (5), 274–282.
- Lin, H., Fang, L., Low, C.S., Chow, Y., Lee, Y.K., 2013. Occurrence of glycerol uptake in *Dunaliella tertiolecta* under hyperosmotic stress. *FEBS J.* 280 (4), 1064–1072.
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., Lavín, P.L., Lanfer Marquez, U.M., Aidar, E., 2004. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *Eur. J. Phycol.* 39 (1), 17–32.
- Luk, H.T., Lam, T.Y.G., Oyedun, A.O., Gebreegziabher, T., Hui, C.W., 2013. Drying of biomass for power generation: a case study on power generation from empty fruit bunch. *Energy* 63, 205–215.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (3), 631–645.
- Marques, S.S.I., Nascimento, I.A., de Almeida, P.F., Chinalia, F.A., 2013. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171 (8), 1933–1943.
- NBR 12620, 1992. Waters – determination of nitrate – chromotropic acid and phenoldisulfonic acid methods – method of test. ABNT. 5.
- Nichols, H.W., Bold, H.C., 1965. *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *J. Phycol.* 1 (1), 34–38.
- Ortegón, G.P., Arboleda, F.M., Candela, L., Tamoh, K., Valdes-Abellan, J., 2016. Vinasse application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at valle del cauca (Colombia). *Sci. Total Environ.* 539, 410–419.
- Parnaudeau, V., Condom, N., Oliver, R., Cazevielle, P., Recous, S., 2008. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Bioresour. Technol.* 99 (6), 1553–1562.
- Perez-García, O., Escalante, F.M., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.* 45 (1), 11–36.
- Pulz, O., Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65 (6), 635–648.
- Quinn, J.C., Davis, R., 2015. The potentials and challenges of algae based biofuels: a review of the techno-economic, life cycle, and resource assessment modeling. *Bioresour. Technol.* 184, 444–452.
- Ramirez, N.N.V., Farenzena, M., Trierweiler, J.O., 2014. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 57 (5), 630–635.
- Van Wychen, S., Laurens, L., 2013a. Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass, Laboratory Analytical Procedure. NREL, U.S.A.
- Van Wychen, S., Laurens, L., 2013b. Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by in situ Transesterification, Laboratory Analytical Procedure. NREL, U.S.A.
- Van Wychen, S., Laurens, L., 2013c. Determination of Total Solids and Ash in Algal Biomass, Laboratory Analytical Procedure. NREL, U.S.A.
- Wang, J., Yang, H., Wang, F., 2014. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (7), 3307–3329.
- Wang, L., Li, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2013. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *Bioresour. Technol.* 129, 289–295.
- Wang, M., Park, C., 2015. Investigation of anaerobic digestion of *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp. grown in high-nitrogen wastewater and their co-digestion with waste activated sludge. *Biomass Bioenergy* 80, 30–37.
- Wood, J.L., Miller, C.D., Sims, R.C., Takemoto, J.Y., 2015. Biomass and phycocyanin production from cyanobacteria dominated biofilm reactors cultured using oilfield and natural gas extraction produced water. *Algal Res.* 11, 165–168.
- Yeasang, C., Cheirsilp, B., 2014. Low-cost production of green microalga *Botryococcus braunii* biomass with high lipid content through mixotrophic and photoautotrophic cultivation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174 (1), 116–129.

# Diel oscillation in the optical activity of carotenoids in the absorption spectrum of *Nannochloropsis*

Gabriela C. Possa<sup>1,2</sup> · Hugo Santana<sup>3</sup> · Bruno S. A. F. Brasil<sup>3</sup> · Luiz F. Roncaratti<sup>1</sup>

Received: 20 November 2016 / Accepted: 30 January 2017  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

**Abstract** In this paper we show that the absorption spectrum of the microalgae *Nannochloropsis oceanica* exhibits changes in response to the modulation of incident light. A model was used to analyze the contribution of different active pigments to the total absorption in the photosynthetically active radiation region and suggested consistent diel oscillations in the optical activity of carotenoids.

**Keywords** *Nannochloropsis* · Absorption spectrum · Carotenoids · Diel oscillations

## Introduction

Photosynthesis is the main process of energy transformation on our planet and its importance for life as we know is enormous [1–4]. Photosynthetic organisms are at the very base of almost all food chains and over the last 3 billion years they have provided most of the molecular oxygen found in the atmosphere [5]. Among many other photosynthetic

organisms, microalgae stand out due to their relative simplicity and variety [6]. They are ubiquitous in nature [7] and their biodiversity represents a valuable resource for the humankind [8, 9]. Over the last decades, thousands of novel compounds have been harvested from microalgae biomass, most of them unique products like carotenoids, fatty acids, antioxidants, toxins, enzymes, polymers, peptides, and sterols [10].

Among several species of microalgae described in the literature, the ones belonging to the *Nannochloropsis* genus have been attracting increasing interest due to their promising biotechnology applications [11, 12] and to their high lipid content and productivity. At the moment, their uses range from an energy-rich food source to biofuel production [13–19]. All the *Nannochloropsis* species consist of non-motile cells with diameters of 2–5 micrometers and few structural elements which do not present any distinct morphological feature, being characterized mostly by genome sequence analysis [20, 21]. They all have chlorophyll *a*, lack of chlorophyll *b* and *c*, and are able to accumulate high levels of carotenoids [22–25], which the presence of can be detected by analysis of their absorption spectrum [26–28]. Notably, *Nannochloropsis* [29, 30] and other algae as well [31, 32], have been observed to exhibit significant changes in the optical activity of carotenoids with respect to chlorophyll *a*. These changes have been associated to a response to nitrogen availability and fatty acid content.

In this paper we show that *Nannochloropsis oceanica* exhibits changes in the optical activity of carotenoids with respect to chlorophyll *a* also in response to modulation of the incident light associated with the light/dark periods. In the next sections, we present, describe, and model this phenomenon, finally we discuss and conclude our analysis.

---

This paper belongs to Topical Collection VI Symposium on Electronic Structure and Molecular Dynamics – VI SeedMol

---

✉ Luiz F. Roncaratti  
roncaratti@fis.unb.br

<sup>1</sup> Instituto de Física, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, Brazil

<sup>2</sup> Faculdade Gama, Universidade de Brasília, 72444-240 Gama, Brazil

<sup>3</sup> Embrapa Agroenergia, 70770-901 Brasília, Brazil

## Methods

### Identification of the microalgae strain

A *Nannochloropsis* wild-type strain obtained from coastal waters of Brazil was used in this study. For identification of this microalgae, the total genomic DNA of the strain was isolated from 30 mg of fresh algal biomass using the cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) DNA extraction protocol [33]. It was followed by PCR (polymerase chain reaction) amplification of the *rbcL* DNA region using the primers Fw\_ *rbcL*\_192 (5' - GGT ACT TGG ACA ACW GTW TGG AC - 3') and Rv\_ *rbcL*\_657 (5' - GAA ACG GTC TCK CCA RCG CAT - 3') [34]. The PCR products were sequenced using a 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) and the forward and reverse sequences obtained were aligned and edited using Geneious 9.1 software (Biomatters).

The identification of microalgae using only morphologic data is not a precise method for distinguish species, especially for the strains that have high morphologic similarity. However, the correct identification of a microalgae strain has a crucial role in metabolic studies, since it is a diverse group of microorganisms that have significant metabolic differences among its species. To avoid misidentification and to increase the speed of the process, the use of molecular tools to identify species is an alternative to fulfill these requirements. These tools identify regions in the organism's DNA that show very low variation rates in samples of the same species. However, this region varies enough to identify if it is a different microorganism strain or species. For microalgae, the marker *rbcL* shows these characteristics and can be used with this purpose. The similarity analysis of the consensus *rbcL* sequence using the BOLD systems resulted in a top hit of 98.69 % for a *Nannochloropsis oceanica* strain deposited in the BOLD database (Accession number: HQ710610).

### Experimental setup

We used a laboratory-scale automatized photobioreactor to maintain 1-l culture of *Nannochloropsis oceanica* in a constant density, temperature, and salinity ( $10^7 \pm 10^5$  cells/ml,  $25 \pm 0.1$  °C and 30 ppt, respectively) environment for several days. The density was controlled by a dilution system that works via feedback between an optical density module that measures the culture absorbance at 640 nm and a peristaltic pump with two heads that simultaneously add/remove the same amount of medium/algae on the reactor whenever the absorbance increases beyond a set point. The correspondence between absorbance at 640 nm and the algae density was found to be linear by a previous calibration using a Neubauer chamber. The temperature

was controlled via feedback between a digital thermometer immersed in the culture and thermoelectric modules attached to the reactor vessel. Such a vessel consists of a cylinder with a 4.5-cm radius made out of transparent borosilicate glass. The culture was fed with Guillard's f/2 growth medium [35] and aerated with CO<sub>2</sub>-enriched atmospheric air (2000 ppm). The microalgae were kept under 12/12 light/dark cycles of cool white LEDs (6000 K and  $\approx 500$  lumens at the glass wall). The culture growth dynamics was monitored using pH and dissolved oxygen (DO) probes, as well as the instantaneous growth rate (given by the dilution rate). The absorption spectrum on the region of the photosynthetically active radiation (400–700 nm) was measured by a fiber-based CCD spectrometer together with a stabilized tungsten-halogen light source (360–2600 nm). The ends of the optical fibers attached to the light source and to the spectrometer are held together facing each other by a Teflon ring, which is submerged in the culture and defines an optical path of 5 mm in which the microalgae can continuously flow through. The culture is kept homogeneous by the airlift generated by the aeration and by a magnetic stirrer located at the bottom of the vessel.

### Absorption spectrum

The absorption spectrum is represented as the sum of the optically active pigment contributions over the time

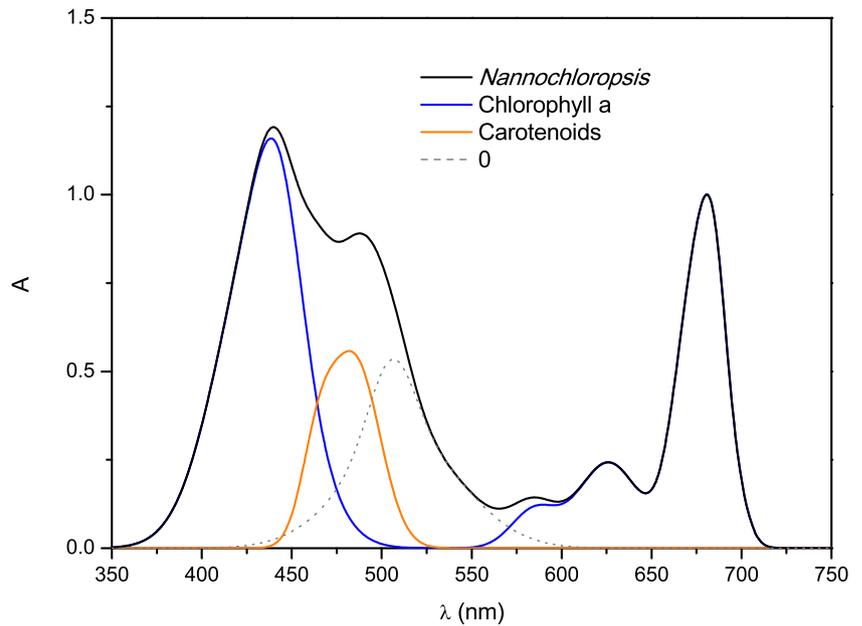
$$A(\lambda, t) = C_{\text{chl}}(t)A_{\text{chl}}(\lambda) + C_{\text{car}}(t)A_{\text{car}}(\lambda) + C_0(t)A_0(\lambda), \quad (1)$$

where  $A_{\text{chl}}$  and  $A_{\text{car}}$  represent the absorption spectra of chlorophyll *a* and carotenoids, respectively.  $A_0$  represents

**Table 1** Parameters for the *Nannochloropsis* absorption spectrum according with Eqs. 1 and 2

	<i>a</i>	$\lambda$ (nm)	<i>w</i> (nm)
chl	0.731	431.4	23.5
	0.324	443.1	12.4
	0.092	584.8	12.6
	0.209	626.1	16.9
	0.682	675.5	11.8
	0.309	685.7	7.2
	0.045	699.7	5.8
car	0.432	464.5	9.4
	0.946	485.1	13.9
0	0.442	505.5	12.4
	0.569	512.3	32.3

**Fig. 1** The *Nannochloropsis* absorption spectrum and its components according to Eqs. 1, 2 and Table 1. In this figure, the contribution of each component is shown using typical values of the  $C$  coefficients found in our experiment

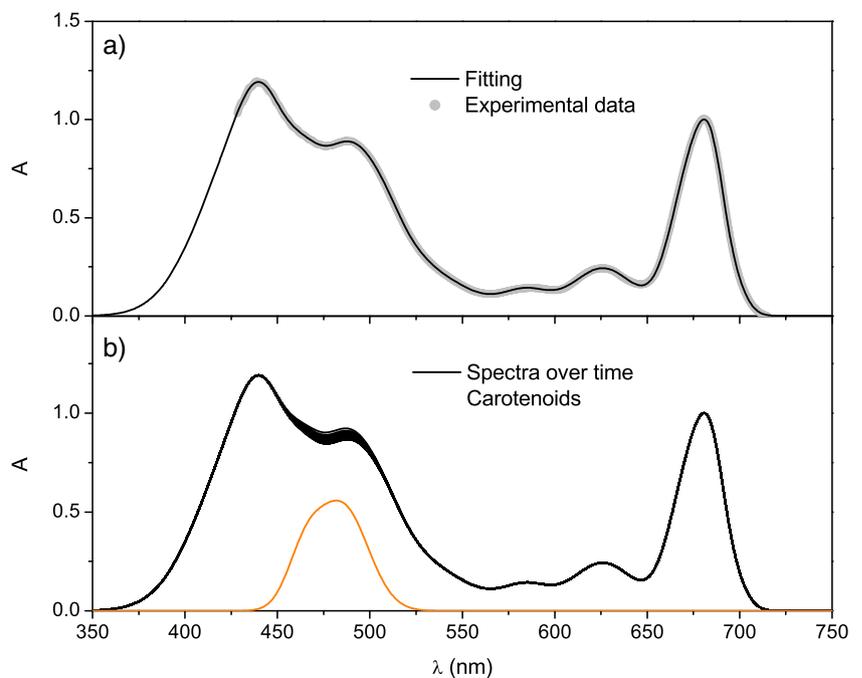


all the remaining features of the spectrum. They are all represented as packages of Gaussian functions

$$A_{\alpha}(\lambda) = \sum_i a_{\alpha i} e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{\lambda - \lambda_{\alpha i}}{w_{\alpha i}} \right)^2}, \quad (2)$$

where  $\alpha$  stands for chl, car, and 0. The coefficients  $C_{\alpha}(t)$  give the contributions of  $\alpha$  over time. The values of  $a_{\alpha i}$ ,  $\lambda_{\alpha i}$  and  $w_{\alpha i}$  are given in Table 1. Figure 1 illustrates our model for the *Nannochloropsis oceanica* absorption spectrum and its components. This representation is very close to those used to represent the absorption spectra of *Nannochloropsis* sp. [26] and *Nannochloropsis salina* [27].

**Fig. 2 a** Experimental absorption spectrum (3) and its analytical representation (1). Strong agreements as the one shown for this single case were found for all the obtained spectra over time. **b** Absorption spectra during 72 h (in black). It can be seen that the only region where significant changes occur lies around the absorption peak of the carotenoids (in orange)



**Results**

Every five minutes pH, DO, density and the absorption spectrum of the culture were obtained. The last one was calculated through the transmittance of light from  $\lambda=425$  to 725 nm, with resolution of 0.5 nm, and the Beer-Lambert law

$$A(\lambda, t) = -\ln \frac{I(\lambda, t)}{I_m(\lambda)}, \quad (3)$$

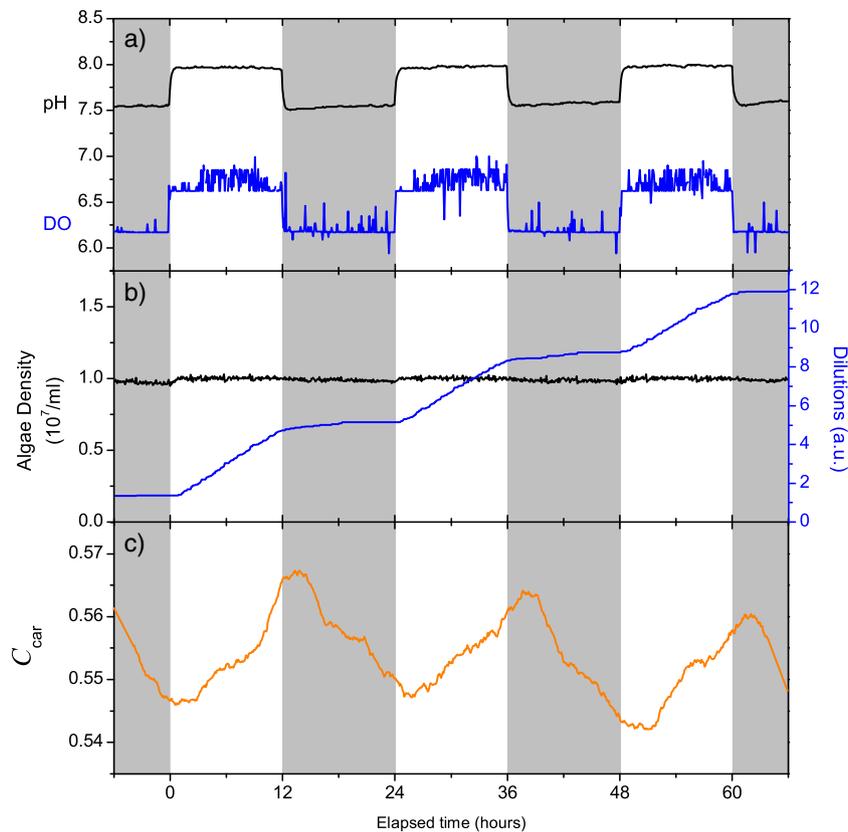
where  $I(\lambda, t)$  is the radiant flux transmitted through the algae culture at wave length  $\lambda$  at time  $t$ , and  $I_m(\lambda)$  is the

radiant flux transmitted at wave length  $\lambda$  through the pure growth medium. A curve fitting algorithm was used to find the values for  $C_{chl}(t)$ ,  $C_{car}(t)$  and  $C_0(t)$ , in Eq. 1, that best adjust each one of the spectra obtained with Eq. 3 over the time. Figure 2a compares one of the fitted curves to its respective experimental data and shows a strong agreement between both. Figure 2b presents all the spectra obtained along the last 72 hours of the experiment. It can be easily seen from this figure that the region around the absorption peak of the carotenoids is the only one that presented significant changes over time.

The observed changes in the optical activity of carotenoids with respect to chlorophyll *a* can be better understood in terms of the  $C_{chl}(t)$ ,  $C_{car}(t)$  and  $C_0(t)$  coefficient values. While  $C_{chl}$  and  $C_0$  remained constant and equal to 1.16 and 0.53, respectively,  $C_{car}$  presented an oscillatory pattern around 0.55. In Fig. 3 it is easy to see that such a pattern follows the culture growth dynamics associated with the 12/12 light/dark cycles.

## Discussion

Consistent diel oscillations in the optical activity of carotenoids were observed in the absorption spectrum of *Nannochloropsis oceanica*. The exact mechanism behind this pattern is yet to be understood. However, some assumptions about the phenomenon can be made. In particular, it is known that pigments display a different absorption cross section once they are packaged inside a cell. This can be due to the non-linear dependence of absorption on pigment concentrations, cell refractive index, cell size, or pigment location within the cell [28]. Regarding these possibilities, the question that rises is how the light modulation could affect the biophysical mechanisms behind these features. Particularly, changes in cell size due to growth and division can also lead to variations in attenuation cross section [36]. However, such variations would be detected equally regarding absorption due to carotenoids and chlorophyll *a* in a way that their ratio should remain constant.



**Fig. 3** Diel patterns associated with the 12/12 light/dark cycles. **a** Photosynthesis and respiration lead pH and dissolved oxygen (DO) to have different equilibrium values during light and dark periods. **b** Algae density was kept constant during the entire experiment due to the dilution system that simultaneously add and remove the same amount of medium and algae on the reactor whenever the density increased beyond the set point ( $10^7$  cells/ml). As expected, the presence of light increases the amount of oxygen, decreases the  $\text{CO}_2$  concentration

(increasing the pH), and allows the algae to grow, as seen by the dilution rate (derivative of the dilution curve). During the dark periods, the oxygen is no longer produced and the  $\text{CO}_2$  is no longer consumed (decreasing the pH), the dilution rate then equals zero. **c** A consistent diel pattern is observed for the optical activity of carotenoids. This oscillatory pattern is slightly out of phase (approx. 2 h) with respect to the light/dark cycles

A possible cause for changes in the carotenoid absorption could be nitrogen starvation [29, 30]. This condition would increase the carotenoids-to-chlorophyll absorption ratio, similarly to what was observed during the light periods but, since the culture was grown in a continuous mode, the insertion of medium would prevent such starvation. Besides that, there is no nitrogen compensation during the dark periods that could be responsible for the decreases of  $C_{car}$  values while there is no dilution of the culture. This leads us to think that even if nitrogen could affect the values of  $C_{car}$ , that would not happen with an oscillatory pattern as the one observed.

A more interesting cause for the observed oscillations of carotenoids optical activity could be the non-photochemical quenching (NPQ) processes that occur in almost all photosynthetic Eukaryotes. Reference [37] is a very good paper on this subject. According to present understanding, these processes help to regulate and protect the photosynthetic apparatus from damage caused by reactive oxygen species (ROS). NPQ involves conformational changes within the PSII (Photosystem II) antenna and the activation of the xanthophyll (oxygenated carotenoids) cycle triggered by the decrease in lumen pH in excessive light. During the light periods, the observed increase in  $C_{car}$  can be associated to the increase in the quantity of specific xanthophyll species (antheraxanthin and zeaxanthin) inside a cell due to a decrease in lumen pH. On the other hand, during the dark periods, the process is reversed, decreasing  $C_{car}$ .

## Conclusions

A consistent diel pattern in the carotenoid optical activity was observed in a *Nannochloropsis oceanica* culture cultivated in a controlled lab-scale photobioreactor. This phenomenon seems to be related to NPQ processes. The ability to measure in vivo such a pattern and its interpretation could provide a valuable non-destructive monitoring tool of how photosynthetic energy conversion works.

**Acknowledgments** This work was supported by CNPq and FAP-DF.

## References

- Rabinowitch E (1969) Govindjee photosynthesis. Wiley, New York
- Nelson N, Ben-Shem A (2004) Nat Rev Mol Cell Biol 5:971–982
- Nelson N (2011) Biochim Biophys Acta 1807:856–863
- Nelson N (2013) Photosynth Res 116:145–151
- Crowe SA, Døssing LN, Beukes NJ, Bau M, Kruger SJ, Frei R, Canfield DE (2013) Nature 501:535–538
- Barsanti L, Gualtieri P (2006) Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology. CRC Press, Boca Raton
- Boyce DG, Lewis MR, Worm B (2010) Nature 466:591–596
- Luiten EEM, Akkerman I, Koulman A, Kamermans P, Reith H, Barbosa MJ, Sipkema D, Wijffels RH (2003) Biomol Eng 20:429–439
- US Department of Energy (2014) National alliance for advanced biofuels and bioproducts (final report). Retrieved from <https://energy.gov/eere/bioenergy/downloads/national-alliance-advanced-biofuels-and-bioproducts-synopsis-naabb-final>
- Cardozo KH, Guaratini T, Barros MP, Falco VR, Tonon AP, Lopes AP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E (2007) Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 146:60–78
- Kilian O, Benemann CSE, Niyogi KK, Vick B (2011) PNAS 108:21265–21269
- Radakovits R, Jinkerson RE, Fuerstenberg SI, Tae H, Settlage RE, Boore JL, Posewitz MC (2012) Nat Commun 3:686
- Zittelli GC, Lavista F, Bastianini A, Rodolfi L, Vincenzini M, Tredici MR (1999) J Biotechnol 70:299–312
- Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR (2009) Biotechnol Bioeng 102:100–112
- Gouveia L, Oliveira AC (2009) J Ind Microbiol Biotechnol 36:69–274
- Huerlimann R, de Nys R, Heimann K (2010) Biotechnol Bioeng 107:245–257
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Renew Sust Energ Rev 14:217–232
- Koberg M, Cohen M, Ben-Amotz A, Gedanken A (2011) Bioreour Technol 102:4265–4269
- Kazamia E, Aldridge DC, Smith AG (2012) J Biotechnol 162:163–169
- Fawley KP, Fawley MW (2007) Protist 158:325–336
- Wang D, Ning K, Li J, Hu J, Han D, Wang H, Zeng X, Jing X, Zhou Q, Su X, Chang X, Wang A, Wang W, Jia J, Wei L, Xin Y, Qiao Y, Huang R, Chen J, Han B, Yoon K, Hill RT, Zohar Y, Chen F, Hu Q, Xu J (2014) PLoS Genetics 10:1–13
- Brown JS (1987) Plant Physiol 83:434–437
- Lubián LM, Montero O, Moreno-Garrido I, Huertas IE, Sobrino C, del Valle MG, Parés G (2000) J Appl Phycol 12:249–255
- Forján E, Garbayo I, Henriques M, Rocha J, Vega JM, Vílchez C (2011) Mar Biotechnol 13:366–375
- Basso S, Simionato D, Gerotto C, Segalla A, Giacometti GM, Morosinotto T (2014) Biochim Biophys Acta 1837:306–314
- Gitelson AA, Grits YA, Etzion D, Ning Z, Richmond A (2000) Biotechnol Bioeng 69:516–525
- Reichardt TA, Collins AM, Garcia OF, Ruffing AM, Jones HDT, Timlin JA (2012) Algal Res 1:22–31
- Kandilian R, Lee E, Pilon L (2013) Bioreour Technol 137:63–73
- Solovchenko A, Khozin-Goldberg I, Recht L, Boussiba S (2011) Mar Biotechnol 13:527–535
- Pal D, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, Boussiba S (2011) Appl Microbiol Biotechnol 90:1429–1441
- Reynolds RA, Stramski D, Kiefer DA (1997) Limnol Oceanogr 42:881–892
- Solovchenko AE, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, Merzlyak MN (2009) J Appl Phycol 21:361–366
- Bonato ALV, do Valle CB, Jank L, Resende RMS, Leguizamón GOC (2002) Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum Maximum*. Embrapa Gado de Corte Comunicado técnico
- Hadi SIIA, Santana H, Brunale PPM, Gomes TG, Oliveira MD, Matthiensen A, Oliveira MEC, Silva FCP, Brasil BSAF (2016) PLOS ONE 11(2):E0149284
- Guillard RRL, Ryther JH (1969) Can J Microbiol 8:229–239
- DuRand MD, Olson RJ (1998) Limnol Oceanogr 43:1107–1118
- Müller P, Li XP, Niyogi KK (2001) Plant Physiol 125:1558–1566



## Customized cryopreservation protocols for chlorophytes based on cell morphology



Maiara S. Fernandes<sup>a,b,c</sup>, Lorena C.G. Calsing<sup>a</sup>, Rodrigo C. Nascimento<sup>a,b</sup>, Hugo Santana<sup>a,d</sup>, Priscila B. Morais<sup>a</sup>, Guy de Capdeville<sup>a</sup>, Bruno S.A.F. Brasil<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Embrapa Agroenergy, Brasília, DF, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO, Brazil

<sup>c</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Guajará-Mirim, RO, Brazil

<sup>d</sup> Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Microalgae

Cryoprotectants

Central composite rotational design

Morphotype

### ABSTRACT

The development of efficient algae cryopreservation methods is pivotal to the establishment of long-term culture collections as well as algae breeding and genetic modification programs. However, the unpredictable responses of distinct algal species to cryopreservation agents and protocols have hampered the standardization of universal methods so far. The results presented in this study indicate that intrinsic biological factors (i.e.: cell morphology and phylogenetic origin) play a role in the definition of which culture age and cryoprotectant agent type and concentration should be used to achieve successful cryopreservation. Through the use of Central Composite Rotatable Design (CCRD) it was possible to define optimized protocols for cryopreserving three major morphotypic groups found among chlorophytes (i.e.: coenobium, coccoid or palmella forming strains). These optimized protocols were then validated upon fifteen strains from Sphaeroleales, Chlamydomonadales and Chlorellales clades. Analysis reveals that the use of DMSO as the sole cryoprotectant provided the highest post-freezing cell viability recovery rates for 80% of the coccoid strains tested, while the combination of glycerol and PEG400 allowed efficient cryopreservation of 100% of the coenobium and palmella forming strains evaluated. In addition, results suggest that coenobium-forming strains have higher resistance to freeze/thawing when frozen at mid-log phase of growth, while coccoid and plameloid strains present higher survival rates when cryopreserved at late-log phase. Such information is of valuable practical use since a simple visual inspection of algae strain's predominant morphotype can guide the choice of the most suitable cryopreservation protocol.

### 1. Introduction

There is a growing interest in using microalgae for biotechnological applications such as the production of biofuels, special oils, pigments, polymers, animal feed and other bioproducts [1–4]. The green algae taxon, Chlorophyta, comprise approximately 8000 described species of single-celled or colonial photosynthetic organisms that are naturally present in different aquatic and humid terrestrial ecosystems [5,6]. This largely unexplored genetic diversity provides a major reservoir for microalgae breeding programs. Pivotal to this task though, is the prior establishment of long-term culture collections. Traditional algae culture maintenance methods based on continuous subculturing in liquid or solid media, however, are time-consuming, expensive and prone to genetic drift and contaminations [7]. Therefore, procedures that can provide long-term storage of microalgae, such as cryopreservation, are

the most suitable alternatives [8]. Indeed, low temperatures inhibit chemical and physical processes and can maintain biological samples in a metabolic inactive state for long periods of time [9]. However, it has been reported that procedural steps, such as cooling rate, the type and concentration of the cryoprotectant agent used and post-thawing steps, as well as biological features, such as culture age, cell size and morphology, can greatly influence the levels of cell viability recovery. This occurs due to the distinct responses of complex biological systems to cell damage caused by water loss and ice crystals formation during the freezing process [7,10–12].

Relative success of the standardization of procedural steps such as cell concentration, cooling rate and thawing protocols for a broad range of algal species has been reported [8]. On the other hand, a universal type and concentration of cryoprotectant agent (CPA) has not been achieved so far [7,9,11,13–15]. CPAs promote cell viability by acting

\* Corresponding author at: Av. W3 Norte (final), Asa Norte, 70770-901 Brasília, DF, Brazil.

E-mail addresses: [lorena.garcia@embrapa.br](mailto:lorena.garcia@embrapa.br) (L.C.G. Calsing), [bruno.brasil@embrapa.br](mailto:bruno.brasil@embrapa.br) (B.S.A.F. Brasil).

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101402>

Received 13 March 2018; Received in revised form 28 June 2018; Accepted 25 December 2018

Available online 31 December 2018

2211-9264/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

both extracellular and intracellularly. For example, cell permeable cryoprotectants, such as dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol and methanol, disrupt ice crystal formation intracellularly, while non-permeable agents, such as polyethylene glycol (PEG), induce cell dehydration by promoting intracellular water efflux. Furthermore, synergies among combined CPAs have also been observed for the cryopreservation of some algal species when using double (sucrose + DMSO) or even triple (DMSO + proline + ethylene glycol) mixtures [7–9]. Therefore, each type of CPA (or CPAs mixture) appears to affect post-thawing cell viability recovery differently according to the algal strain, suggesting that intrinsic biological factors play a role in the efficiency of each type of CPA. This study evaluated the correlation between biological factors (i.e.: cell morphology and phylogenetic origin) and the efficiency of distinct CPAs. The goal was to investigate whether strain morphology typing could provide insights about CPAs efficiency thereby allowing the development of cryopreservation protocols customized for major chlorophyte groups.

## 2. Material and methods

### 2.1. Microalgae strains

Microalgae strains *Desmodesmus spinosus*|LBA35, *Chlorella sorokiniana*|LBA39 and *Chlamydomonas biconvexa*|LBA40 were used in the selection of cryoprotectants agents and on the cryopreservation optimization experiments as representatives of three different morphotypes (i.e.: colonial coenobial, unicellular coccoid, colonial palmelloid) (Supplementary Fig. 1). Fifteen microalgae strains representative of each morphotype were selected from the Collection of Microorganisms and Microalgae Applied to Agroenergy and Biorefineries at Embrapa (Brasília/DF–Brazil) and the subsequent validation of the optimized protocols was performed on all fifteen microalgae strains (Supplementary Table 1).

### 2.2. Microalgae cultivation

Microalgae were cultivated in erlenmeyers flasks (500 ml) with 300 ml of BG11 medium [16]. They were inoculated with optical density adjusted for 0.01 (O.D. 0.01,  $\lambda = 680$  nm) and kept under artificial illumination of  $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 12/12 h light cycle, temperature of 30 °C, aeration of  $10 \text{ L h}^{-1}$ , for a period of 10 days. Biomass growth was monitored through optical density (O.D.) readings at 680 nm.

### 2.3. Cryopreservation

Microalgae cell suspensions were adjusted (centrifuged and suspended in fresh medium) to optical density equal to 1 (O.D =  $1/\lambda = 680$  nm) immediately prior to cryopreservation for normalization purposes. Aliquots of the cultures (1.5 ml) were transferred to 2 ml polypropylene cryotubes. Cryoprotectants (Glycerol, DMSO and PEG 400) were then added (or not, in the case of control samples) at concentrations of 10% (cryoprotectants agents screening assays) or in concentrations ranging from 0 to 10%, in the case of the optimization of microalgae cryopreservation protocols assays. The cryotubes were subsequently placed in a freezing container (Mr. Frosty™ Freezing Container) which allows a cooling rate of approximately  $-1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . The container was placed in ultra-freezer ( $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) and after 4 h the frozen cryotubes were removed from the container, placed in storage boxes and stored in ultra-freezer at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . After 15 days, the cryotubes were thawed by submersion in a 35 °C water bath for approximately 2 min. Samples were centrifuged for 5 min at 10,732g and the supernatant discarded. The pellets were transferred to test tubes (20 × 150 mm) and suspended in 3.5 ml of fresh BG-11 medium. Cell viability was measured immediately (0 h) and also 24 h after thawing. For the measures taken 24 h after thawing, the tubes were maintained in growth chambers under illumination cycles of 12 h light/12 h dark

and temperature of 25 °C for 24 h.

Results were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA), using the Tukey test at significance level of 5%, with the software Statistica [17].

### 2.4. Cell viability assay

Cell viability was determined using TTC (2, 3, 5 – Triphenyltetrazolium chloride) method. Traditionally, this method was used in the determination of cell viability in plants and seeds [18–20], but now is well consolidated also for algae studies [21–25]. The assay is based on the activity of dehydrogenase enzymes, which catalyze respiratory reactions in mitochondria. These enzymes reduce the TTC salt (colorless) to formazan in living cells. The resulting formazan crystals present red color and the color intensity is used to measure mitochondrial activity and, consequently, cell viability, since the reduction of respiratory rates reflects the metabolic activity of the cells [20]. Cell viability was determined based on the absorbance (ABS) at 490 nm of algal strains samples submitted to TTC method. Absorbance was measured both before cryopreservation and after thawing. Cell viability was calculated as shown:

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{\text{Sample ABS 490nm (after thawing)}}{\text{Sample ABS 490nm (before cryopreservation)}} * 100 \quad (1)$$

In test tubes, 1.5 ml of each culture was homogenized in 3 ml of TTC reagent 0.5% (w/v) and then incubated for 24 h in the dark at 28 °C. After this period, 6 ml of ethanol 95% (v/v) was added to the tubes which were then placed in boiling water for 10 min in order to release the colored formazan compound. The material was then centrifuged for 5 min at 10,732 g for solids separation and the supernatant was used for absorbance spectrophotometer readings at 490 nm. Cell viability was confirmed by monitoring algal growth (optical density of the cultures at 680 nm), up to 15 days after thawing (data not shown).

### 2.5. Cryoprotectant agents screening

An initial screening using either two cell penetrating CPAs, glycerol and DMSO, or one non-permeable CPA, polyethylene glycol 400 (PEG400), at 10% concentration was performed. Algal cells were frozen after 9 days of cultivation (stationary phase) and cell viability was measured immediately (0 h) after thawing and 24 h post-thawing. Results were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA), using the Tukey test at significance level of 5%, with the software Statistica [17].

### 2.6. Optimization of microalgae cryopreservation protocols

Cell viability after freezing/thawing was analyzed at three different algal growth phases: mid-log phase (3rd day of cultivation), late-log phase (6th day of cultivation) and stationary phase (9th day of cultivation). A Central Composite Rotatable Design (CCRD) was used to investigate the effect of cryoprotectants - concentration ranging from 0 to 10% (v/v) (independent variables - Glycerol and PEG400 for *D. spinosus*|LBA35 and *C. biconvexa*|LBA40 strains; DMSO and Glycerol for *C. sorokiniana*|LBA39 strain) on viable cells recovery after freezing (dependent variable). The CCRD approach was used because in this method variables are analyzed simultaneously, thus it is possible to verify and quantify synergistic and antagonistic effects. Moreover, CCRD method employs a reduced number of experiments or repetitions, considerably reducing human manipulation errors [26–28]. Therefore the experimental strategy was composed of a  $2^2$  factorial design, five levels of each independent variable, 4 axial points and 3 repetitions of the central point, in a total of 11 experiments (Supplementary Table 2) for each algal morphotype at each one of the three growth phase studied.

The following polynomial equation was fitted to data:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 \quad (2)$$

where  $\beta_n$  are constant regression coefficients;  $y$  is the response (cell viability %), and  $x_1$  and  $x_2$  are the coded independent variables. The analysis of variance (ANOVA), determination of  $R^2$  and the generation of three-dimensional graphs were carried out using the software Statistica [17]. The experimental validation was performed through the comparison between the cell viability of samples frozen for 15 days and 6 months under optimized conditions against the cell viability obtained for samples frozen in the absence of cryoprotectants. Results were statistically evaluated at significance level of 5% through the interface Experimental Design (DOE) followed by analysis of variance (ANOVA), using the software Statistica [17].

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Cryoprotectant agents screening

The core hypothesis empirically investigated in this study is that intrinsic biological factors (i.e.: algal cell morphology and phylogenetic origin) are major determinants for the efficacy of distinct cryopreservation protocols. In order to address this issue, three distinct microalgae strains were initially tested: the coenobia forming strain *Desmodesmus spinosus*|LBA35, the unicellular coccoid strain *Chlorella sorokiniana*|LBA39 and the palmella forming strain *Chlamydomonas biconvexa*|LBA40 (Supplementary Fig. 1).

The results of the cryoprotectant agents screening is presented in Fig. 1. These two measurements (immediately after thawing (A) and 24 h post-thawing (B)) were used because they allow the quantification not only of algal resistance to freezing/thawing but also cell viability recovery, since some CPAs can be toxic to certain algal strains [7]. Quantification of algal cells viability after cryopreservation is often performed through plating and counting of colony forming units

[8,9,29,30]. However, this method is laborious, time-consuming and known to be error prone [30,31]. Therefore, the method of choice for this study was based on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) to water-insoluble reddish formazan salts by enzymes of the respiratory chain, a measure of cell mitochondrial activity and viability of eukaryotic organisms that has been used for decades [20]. This method allows the rapid quantification of algal cells viability through simple spectrophotometric absorbance measurements.

Fig. 1 shows a higher cell viability recovery for strains *D. spinosus*|LBA35 and *C. biconvexa*|LBA40 after cryopreservation in the presence of glycerol and PEG400. In contrast, DMSO, promoted higher cryoprotectant effect for *C. sorokiniana*|LBA39 (Fig. 1B). It is important to highlight that algal strains were not only physiologically active but also capable of cell division as observed by visual inspection of algal cultures growth up to 15 days post-thawing (Data not shown). Representative pictures of algal growth recovery post-thawing, either before or after the addition of TTC, are shown (Supplementary Fig. 2).

The variable efficiency of CPAs according to algal strain was expected and has been reported previously [7,8,13,32]. The higher viability recovery obtained using glycerol and DMSO for the cryopreservation of *C. sorokiniana*|LBA39, however, contrasts with the results reported by Nakanishi et al. [9], that did not observe significant cryoprotectant effect when using glycerol and DMSO upon *Chlorella* strains. It is important to highlight though, that the CPAs concentrations used in that study were lower (i.e. 2.5–5%) than the concentrations of 10% used in here. On the other hand, studies from Crutchfield et al. [33] and Yang & Li [34] reported low efficacy of DMSO as a CPA for *Chlamydomonas* strains, corroborating the results shown for *C. biconvexa*|LBA40 (Fig. 1).

#### 3.2. Optimization of algal cryopreservation protocols

The effect of culture age in cryopreservation tolerance has been reported as variable among different algal strains [29,35–37]. For example, reference algae collections, such as UTEX Culture Collection of Algae, Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) and Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA), recommend cells to be frozen during log phase of growth. In contrast, however, increased resistance to cryopreservation has been observed for older cultures (stationary phase) of *Nannochloropsis gaditana*, *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella vulgaris* [29,30]. Furthermore, Osorio et al. [35], Piasecki et al. [36] and Salas-leiva & Dupré [37] reported higher cell viability recovery in experiments performed during late-log growth phase.

In order to investigate the influence of algal growth phase on cell viability recovery post-thawing, as well as to optimize cryoprotectant agents efficiency, *D. spinosus*|LBA35, *C. sorokiniana*|LBA39 and *C. biconvexa*|LBA40 strains were submitted to cryopreservation based on experimental planning using central composite rotatable design (CCRD) (Supplementary Table 2). The two most efficient CPAs previously screened for each strain (Fig. 1) were used upon cells derived from cultures in the following growth phases: mid-log phase (3rd day), late-log phase (6th day) and stationary phase (9th day) (Supplementary Fig. 3). The post-thawing cell viability results (Supplementary Table 3) were used to calculate regression coefficients and the determination coefficients ( $R^2$ ) of the coded second order polynomial equations of each strain using cells frozen at the three distinct growth phases (Supplementary Table 4). It is possible to verify significant synergistic effects ( $p < 0.05$ ) among the studied CPAs (Supplementary Table 4). After the elimination of non-significant factors (NS), the analysis of variance (ANOVA) and the F test were performed in order to verify the significance of the regressions obtained and possible lack of fit of the models (data not shown), at confidence level of 95%. It can be observed that strain *D. spinosus*|LBA35 presents highest post-freezing cell viability recovery rates when microalgae cells were cryopreserved during mid-log growth phase (3rd day of cultivation) (Supplementary Table 3).

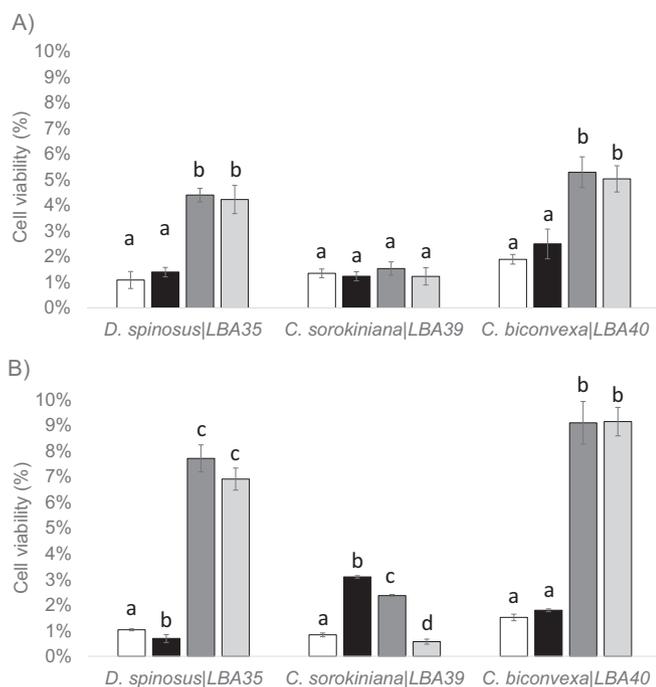


Fig. 1. Analysis of cryoprotectants agents efficiency: After 9 days of cultivation cells from strains *D. spinosus*|LBA35, *C. sorokiniana*|LBA39 and *C. biconvexa*|LBA40 were frozen without CPA (□), with 10% glycerol (■), 10% DMSO (■) or 10% PEG400 (■). Cell viability was measured at 0 h (A) and 24 h (B) after thawing. Different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) according to Tukey's tests. Data shown is the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

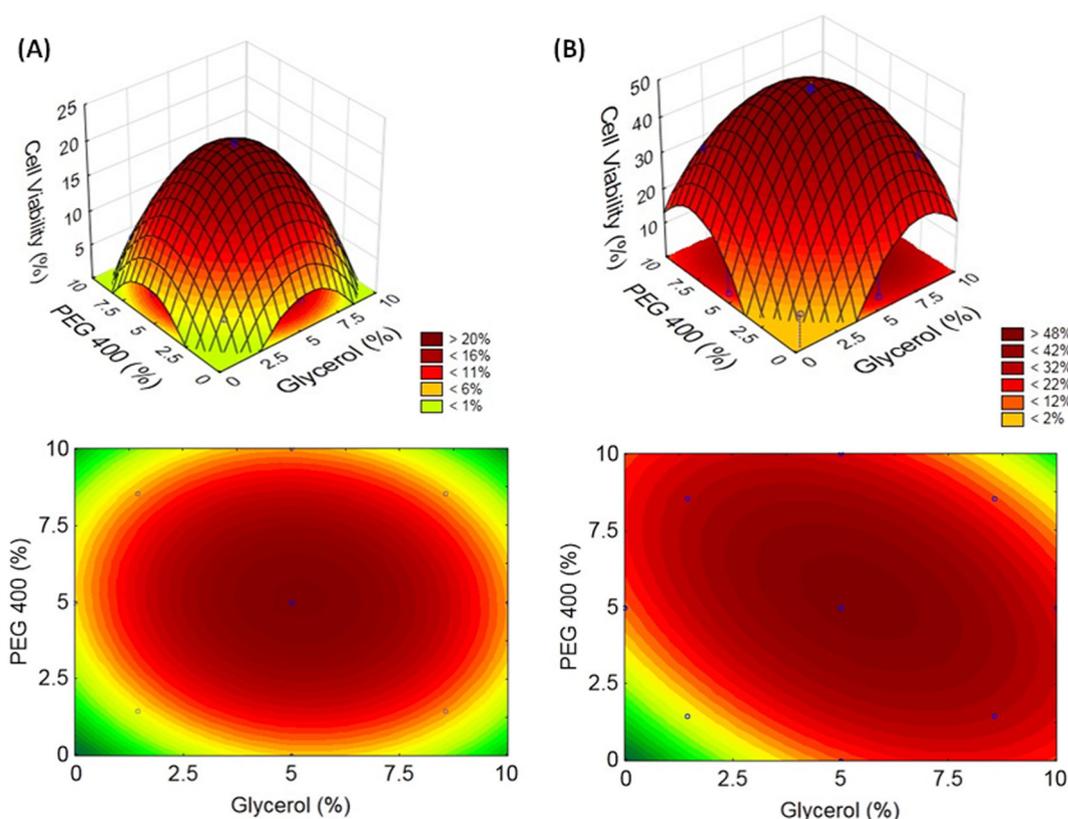


Fig. 2. Response surface and contour plots for *D. spinosus*|LBA35 strain: After 3 days of cultivation, cells from strain *D. spinosus*|LBA35 were frozen in the presence of glycerol (0–10% v/v) and PEG 400 (0–10% v/v). Cell viability recovery was measured at 0 h (A) and 24 h (B) after thawing.

On the other hand, for *C. sorokiniana*|LBA39 and *C. biconvexa*|LBA40 strains, cells frozen during the 6th day of culture (late-log phase) presented the highest post-thawing viability recovery rates (Supplementary Table 3).

Fig. 2 shows the response surfaces and contour plots based on the cell viability recovery values obtained for *D. spinosus*|LBA35 strain cryopreserved during mid-log growth phase (3rd day of cultivation) in the presence of different concentrations of the glycerol and PEG 400. Cell viability was significantly affected by glycerol and the PEG 400 concentrations, ranging from 3.9 to 20.75% and from 3.11 to 49.62%, 0 h and 24 h after thawing, respectively. Viability recovery rates increased as the experimental conditions approached the agents' midpoint (i.e., 5% glycerol + 5% PEG 400) reaching approximately 21% at 0 h and 50% at 24 h after thawing. It is possible to hypothesize that the synergistic effect of glycerol, a cell permeable CPA, and PEG400, a non-permeable CPA, is due to the complementary effect of both agents on the disruption of intracellular ice crystals and promotion of cell dehydration, respectively [7–9].

Fig. 3 shows the response surfaces and contour plots based on the cell viability recovery values obtained for *C. sorokiniana*|LBA39 strain cryopreserved during late-log phase of growth (6th day of culture) at the different concentrations of glycerol and DMSO. In Fig. 3A it is possible to observe that the highest cell viability recovery rates concentrate around the central point. However, a shift towards 0% of glycerol concentration can be observed at cell viability recovery measures 24 h after the thawing (Fig. 3B). This decrease in cell viability recovery rates in the presence of glycerol 24 h after thawing suggests that this CPA might be toxic to *C. sorokiniana* |LBA39. Therefore, there seems to be an optimum range trend for the cryopreservation of *C. sorokiniana*|LBA39 strain, between 6.7 and 9.7% of DMSO in the absence of glycerol. This result is in agreement with the reported by Morris [38], who observed increased cytotoxicity for *Chlorella* strains as a function of increased glycerol concentrations. Study from Tzovenis

et al. [39] also corroborates the efficiency of DMSO as a CPA for the cryopreservation of *Chlorella* species. In addition, the non-synergistic effect of DMSO and glycerol might be related to the fact that both CPAs act intracellularly disrupting ice crystal formation in a similar/redundant mode of action [7,8].

Cryopreservation of *C. biconvexa*|LBA40 was performed using late-log phase cultures (6th day of culture) in the presence of different concentrations of glycerol and PEG 400 (Fig. 4). It can be observed that the central conditions of the used cryoprotectants (i.e.: 5% glycerol + 5% PEG 400) led to higher cell viability recovery reaching over 70% at 24 h post-thawing (Fig. 4).

To our knowledge, this is the first report to describe the use of Central Composite Rotatable Design (CCRD) to study algae cryopreservation. This approach is very useful since it allows empirical testing of interactions among different variables using a reduced set of replicates [26–28]. Nonetheless, there are several reports that describe that the combination of different CPAs promotes greater efficiency in cell recovery compared to the use of each one individually [9,40,41]. Bui et al. [8] evaluated the recovery of 19 strains of microalgae frozen with DMSO or sucrose or the combination of both agents. The effect of sucrose as the sole CPA yielded low cell viability recovery (< 10%). DMSO used alone had a significantly higher cryoprotectant effect (68% of the strains were recovered and exhibited viability of ~40%). On the other hand, the combined use of sucrose and DMSO produced an improvement both in terms of the number of strains recovered (100% success) and also in cell viability (~55%). Nakanishi et al. [9], when examining the cryoprotectant efficiency of DMSO, glycerol and ethylene glycol in strains of *C. vulgaris*, *N. oculata* and *T. tetraathele*, observed little or no cell survival when the agents were used individually. However, the mixture of these CPAs with sorbitol or proline produced beneficial effect for all strains tested. Chong et al. [41] tested either MeOH individually or mixed with sucrose for the cryopreservation of dinoflagellates and found that the combination of both also increased

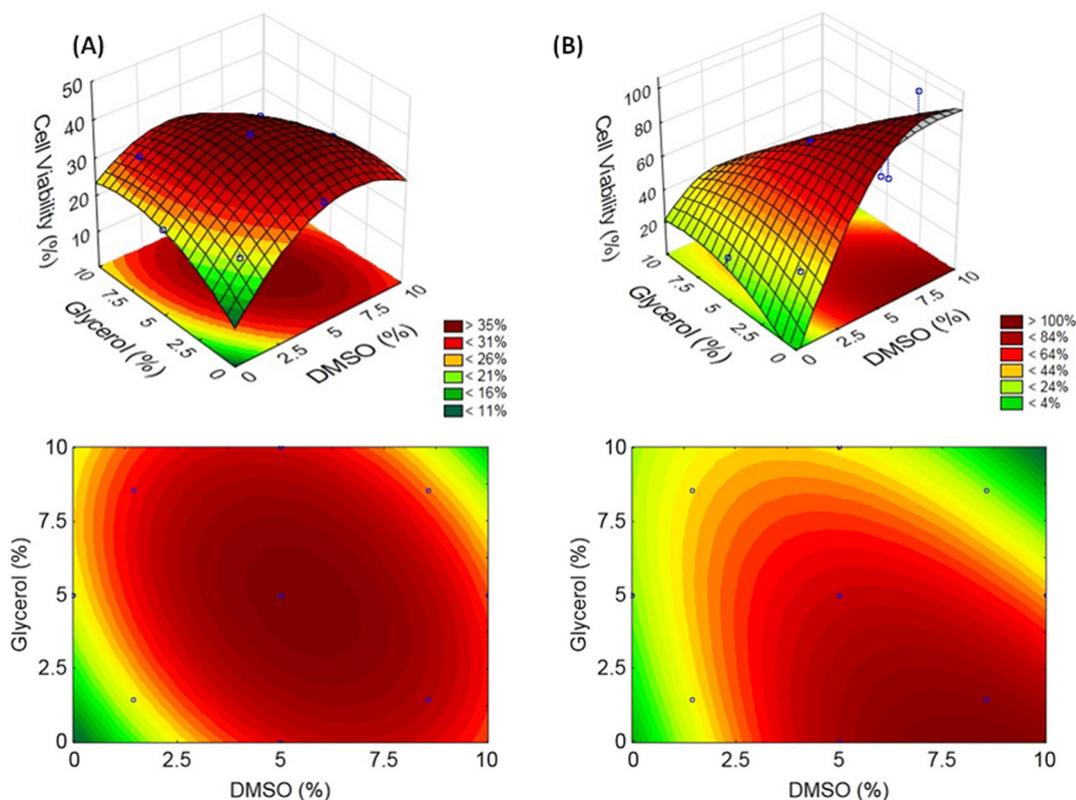


Fig. 3. Response surface and contour plots for *C. sorokiniana*|LBA39 strain: After 6 days of cultivation, cells from strain *C. sorokiniana*|LBA39 were frozen in the presence of glycerol (0–10% v/v) and DMSO (0–10% v/v). Cell viability recovery was measured at 0 h (A) and 24 h (B) after thawing.

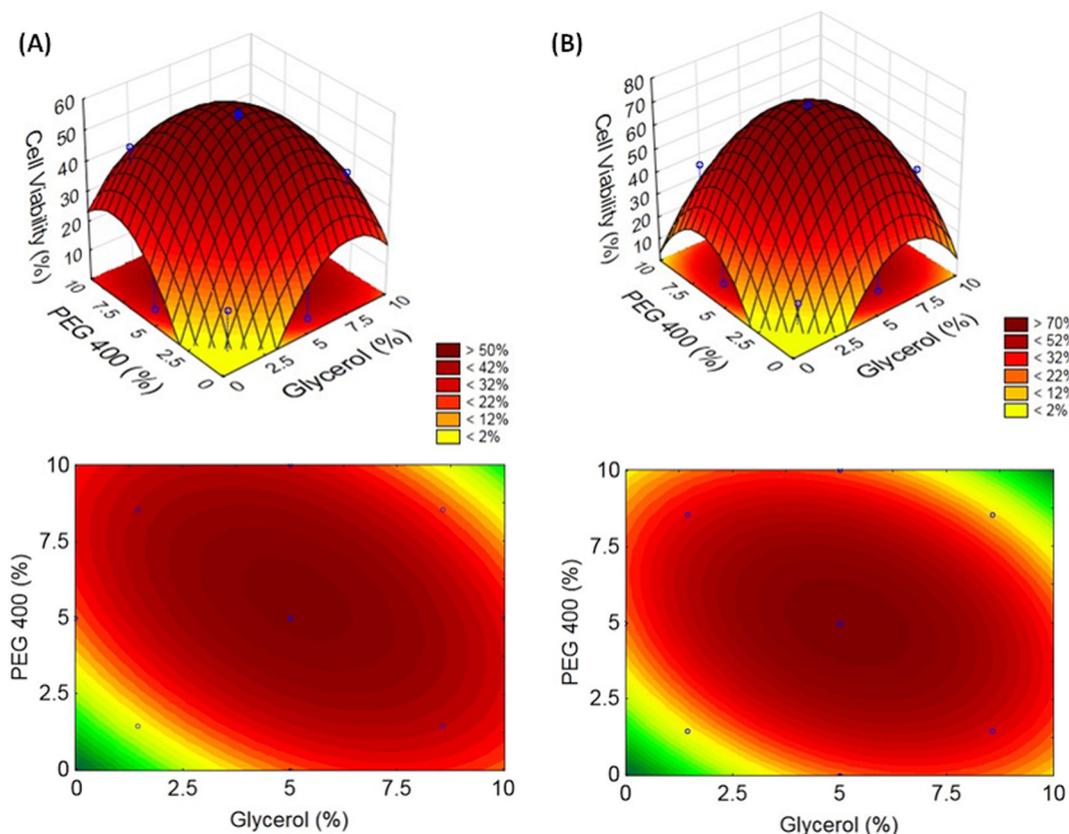
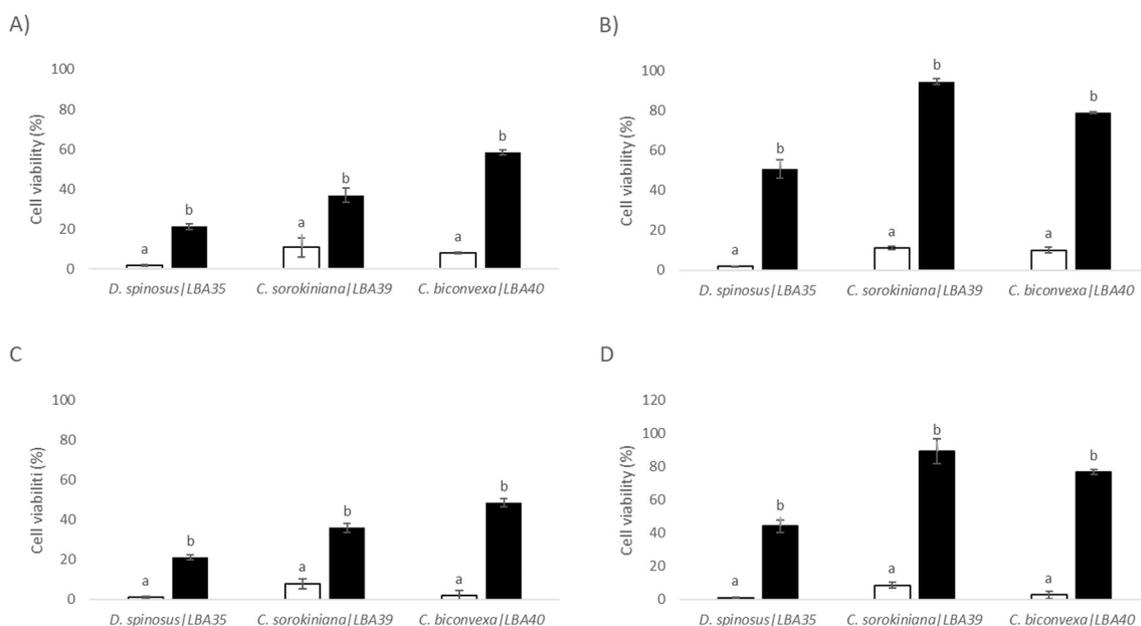


Fig. 4. Response surface and contour plots for *C. biconvexa* |LBA40 strain: After 6 days of cultivation, cells from strain *C. biconvexa* |LBA40 were frozen in the presence of glycerol (0–10% v/v) and PEG 400 (0–10% v/v). Cell viability recovery was measured at 0 h (A) and 24 h (B) after thawing.



**Fig. 5.** Experimental validation of the optimal conditions obtained by CCRD: Optimal formulations indicated by CCRD were applied to the strains *D. spinosus*|LBA35 (i.e.: 5% glycerol + 5% PEG 400), *C. sorokiniana*|LBA39 (i.e.: 7% DMSO), *C. biconvexa*|LBA40 (i.e.: 5% glycerol + 5% PEG 400) (■). Control algal cells were frozen without CPAs (□). *D. spinosus*|LBA35 strain was frozen after 3 days of cultivation, while *C. sorokiniana*|LBA39 and *C. biconvexa*|LBA40 were frozen after 6 days of cultivation. Cells were kept frozen for 15 days (A and B) or for 6 months (C and D). Cell viability was measured at 0 h (A and C) and 24 h (B and D) after thawing. Different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) according to Tukey's tests. Data shown is the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

post-thawing cell viability recovery.

### 3.3. Validation of optimized cryopreservation conditions

The response surfaces and contour plots presented reveal the existence of a region (not a single point) with a high percentage of cell viability recovery after freezing/thawing (Figs. 2 to 4). Therefore, the optimal CPAs combination for cryopreservation of *D. spinosus*|LBA35 and *C. biconvexa*|LBA40 strains can be defined as 5% glycerol + 5% PEG 400 (Figs. 2 and 4). While for *C. sorokiniana*|LBA39, the optimal CPA concentration can be defined as 7% of DMSO, using as a criterion a lower concentration of cryoprotective agent within the region of maximum cell viability recovery (6.7% to 9.7% - Fig. 3). In order to validate these definitions, *D. spinosus*|LBA35, *C. biconvexa*|LBA40 and *C. sorokiniana*|LBA39 were cryopreserved using the aforementioned optimal conditions for periods of 15 days and 6 months (Fig. 5). It can be observed that these optimized conditions resulted in statistically significant ( $p < 0.05$ ) improvements in cell viability recovery for all three strains (Fig. 5). Furthermore, the robust recovery of cell viability observed after 6 months of cryopreservation (Fig. 5C and D) suggests that long term storage using the optimized conditions described in here should be possible. However, it must be highlighted that the temperatures of  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  used in this study might reduce viability of materials stored for longer periods of time (i.e.: over 6 months). Therefore, storage in liquid nitrogen ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) is recommended for long term preservation [9,12,42]. Indeed, successful cryopreservation of algae strains in liquid nitrogen for up to 15 years has been reported [9,42].

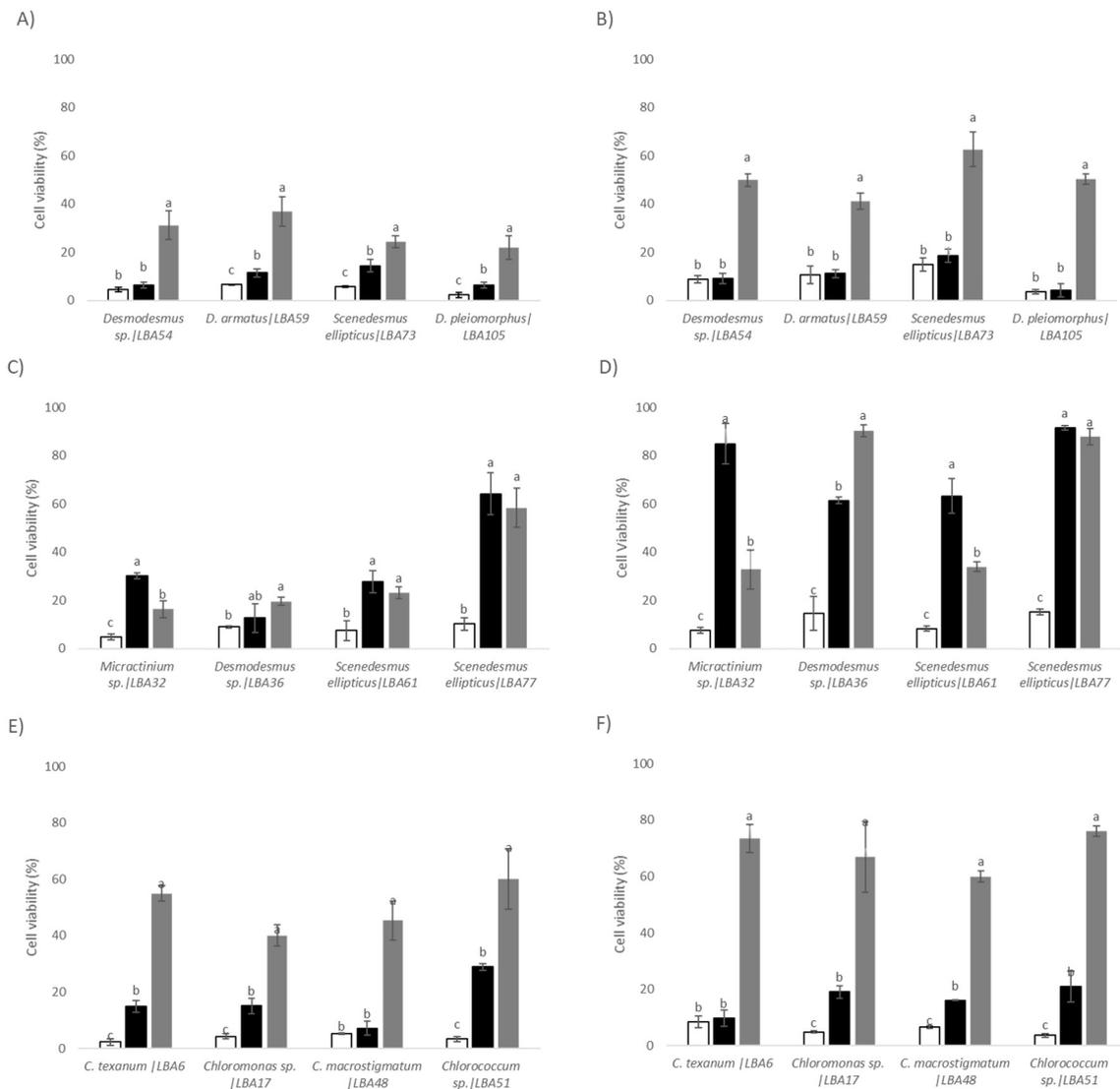
In order to verify if the optimized conditions (i.e.: culture age and CPAs type/concentration) obtained for *D. spinosus*|LBA35, *C. biconvexa*|LBA40 and *C. sorokiniana*|LBA39 could be applied to other algae species, subsequent experimental validation was performed upon an additional subset of 12 algal strains (Fig. 6). This subset of algal strains comprises four strains of each of the three morphotypes studied (i.e.: coenobial, coccoid and palmelloid). All 12 strains (100%) could be successfully cryopreserved (Fig. 6) and the post-thawing cell viability recovery rates obtained were similar to those observed in CCRD experiments using *D. spinosus*|LBA35, *C. biconvexa*|LBA40 and

*sorokiniana*|LBA39 strains (Figs. 2–4). Furthermore, it is possible to observe a correlation between the efficiency of the cryoprotective agents and the algal cell morphology (Fig. 6). Indeed, all the coenobial and palmelloid strains had statistically ( $p < 0.05$ ) higher rates of cell recovery in the presence of 5% glycerol + 5% PEG 400 (Fig. 6A–B and E–F). In addition, 7% of DMSO presented a cryoprotective effect equal to or greater than the 5% glycerol + 5% PEG 400 combination for 3 out of 4 coccoid strains analyzed (Fig. 6C–D). Only *Desmodesmus* sp.|LBA36 presented higher cell viability recovery when cryopreserved in the presence of 5% glycerol + 5% PEG 400 (Fig. 6C–D). It is important to highlight though that efficient cryopreservation of this strain was also achieved using 7% of DMSO (Fig. 6C–D – Black bars).

The data displayed in Figs. 6 and 7 suggest that both cell morphology and strain phylogenetic origin exert significant influence on the success of cryopreservation. This perception becomes more evident by observing the response to cryopreservation of certain coccoid strains where morphotype and phylogenetic signals seems to “overlap” (i.e.: strains *Desmodesmus* sp.|LBA36, *Scenedesmus ellipticus*|LBA61 and *Scenedesmus ellipticus*|LBA77) (Fig. 7). In such cases, either 7% DMSO or 5% glycerol + 5% PEG 400 were capable of providing efficient cryoprotection (Fig. 6). The strains *Desmodesmus* sp.|LBA36, *Scenedesmus ellipticus*|LBA61 and *Scenedesmus ellipticus*|LBA77 exhibit coccoid morphology when cultivated in the laboratory, even though the prototypic morphology of the genera *Desmodesmus* and *Scenedesmus* is a coenobium colony. Recently, several coccoid green microalgae previously assigned to Chlorellales have been reassigned to other taxa, including Sphaeropleales, based on novel evidence from DNA-based identification studies [43–45]. The definition whether morphotype or phylogeny is the main driver in the definition of cryopreservation parameters (i.e.: CPAs type/concentration and culture age), however, remains an issue to be pursued further.

## 4. Conclusions

The results presented in this study indicate that intrinsic biological factors (i.e.: cell morphology and phylogenetic origin) are determinants of which culture age and cryoprotectant agent type and concentration



**Fig. 6.** Validation of optimized conditions obtained by CCRD: Four coenobial strains (a-b), 4 coccoid strains (c-d) and 4 palmelloid strains (e-f) were frozen without CPA (□), with 7% DMSO (■) or with 5% glycerol + 5% PEG400 (▒). Coenobial strains were frozen after 3 day of cultivation (a-b), while coccoid and palmelloid strains (c-f) were frozen after 6 days of cultivation. Cell viability was measured at 0 h (a, c, e) and 24 h (b, d, f) after thawing. Different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) according to Tukey's tests. Data shown is the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

should be used to achieve successful cryopreservation. Indeed, the use of rotational central composite design made possible the optimization of protocols for cryopreserving three major morphotypic groups found among chlorophytes (i.e.: Coenobium, coccoid or palmella forming strains). Although a single universal cryopreservation method for all chlorophytes has not been achieved yet, the information provided here is of valuable practical use since the rapid inspection of algae strain's predominant morphotype can guide the choice of the most suitable cryopreservation protocol.

### Acknowledgements

The authors are grateful to the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brazil) for supporting this work. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Author contributions

Maiara S. Fernandes; Lorena C. Garcia Calsing; Bruno S. A. F. Brasil

contributed to conception, design, analysis and interpretation of the data; collection and assembly of data, article writing, and final approval of the article.

Rodrigo C. Nascimento, Hugo Santana, Priscila B. Morais and Guy de Capdeville contributed to collection and assembly of data and critical revision of the article for important intellectual content.

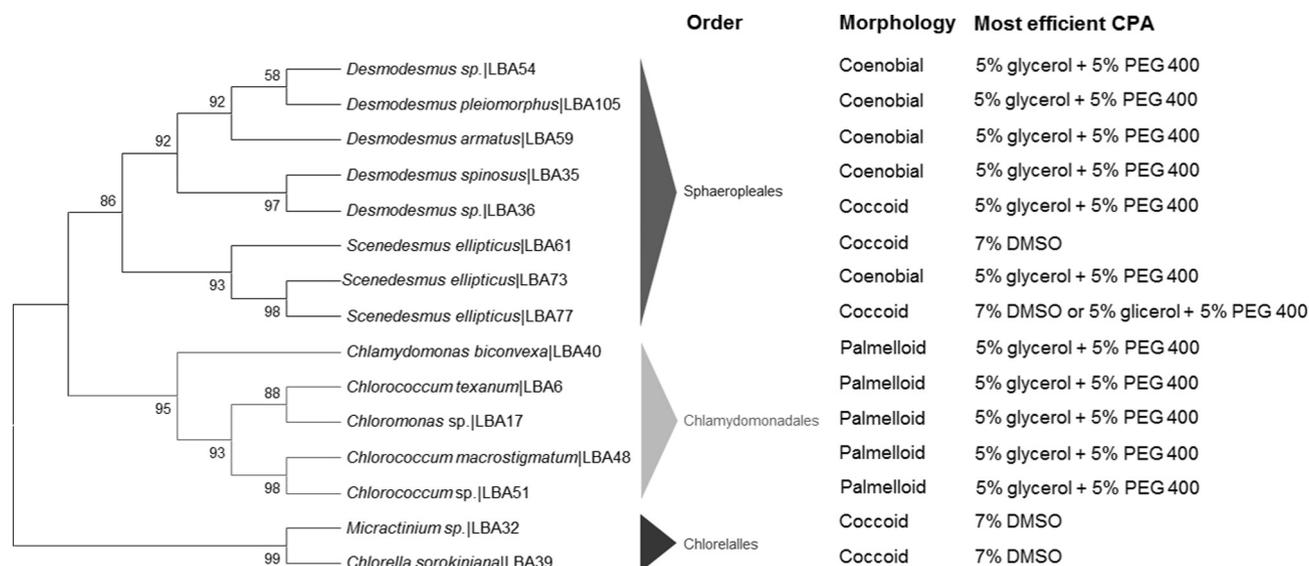
Maiara Fernandes, Lorena Calsing and Bruno Brasil take responsibility for the integrity of the work as a whole.

### Authors agreement

The authors declare their agreement to authorship and submission of the manuscript for peer review.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest. No conflicts, informed consent, human or animal rights applicable.



**Fig. 7.** Relationship among the strain phylogeny, morphology and most efficient cryopreservant agent: The phylogenetic tree was inferred using the General Time Reversible method based on dataset of 135 aligned positions of 15 *nutS2* marker nucleotide sequences. For the analysis, the GTR model with invariable sites (I) and gamma distribution shape parameter (G) (GTR + G + I) was chosen. The bootstrap values (1000 replicates) are shown next to the branches. The strains' taxonomic assignment, morphology and most efficient CPA are shown.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101402>.

## References

- [1] A.W.D. Larkum, I.L. Ross, O. Kruse, B. Hankamer, Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production, *Trends Biotechnol.* 30 (2012) 198–205.
- [2] B.S.A.F. Brasil, F.C.P. Silva, F.G. Siqueira, Microalgae biorefineries: the Brazilian scenario in perspective, *New Biotechnol.* (2017) 90–98.
- [3] H. Santana, C.R. Cerejjo, V.C. Teles, R.C. Nascimento, M.S. Fernandes, P. Brunale, R.C. Campanha, I.P. Soares, F.C.P. Silva, P.S. Sabaini, F.G. Siqueira, B.S.A.F. Brasil, Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization, *Bioresour. Technol.* 228 (2017) 133–140.
- [4] B.D.S.A.F. Brasil, F.G. de Siqueira, T.F.C. Salum, C.M. Zanette, M.R. Spier, Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories, *Algal Res.* 25 (2017) 76–89.
- [5] S.I.L.A. Hadi, H. Santana, P.P.M. Brunale, T.G. Gomes, M.D. Oliveira, A. Matthiensen, M.E.C. Oliveira, F.C.P. Silva, B.S.A.F. Brasil, DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters, *PLoS One* 11 (2016) 1–18.
- [6] M.D. Guiry, How many species of algae are there? *J. Phycol.* 48 (2012) 1057–1063.
- [7] R. Taylor, R.L. Fletcher, Cryopreservation of eukaryotic algae – a review of methodologies, *J. Appl. Phycol.* 10 (1998) 481–501.
- [8] T.V.L. Bui, I.L. Ross, G. Jakob, B. Hankamer, Impact of procedural steps and cryopreservation agents in the cryopreservation of chlorophyte microalgae, *PLoS One* 8 (2013) 1–9.
- [9] K. Nakanishi, K. Deuchi, K. Kuwano, Cryopreservation of four valuable strains of microalgae, including viability and characteristics during 15 years of cryostorage, *J. Appl. Phycol.* 24 (2012) 1381–1385.
- [10] J.O.M. Karlsson, M. Toner, Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues, *Biomaterials* 10 (1996) 243–256.
- [11] J.G. Day, J.J. Brand, Cryopreservation methods for maintaining cultures, in: R.A. Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques*, Academic Press, New York, 2005, pp. 165–187.
- [12] J.G. Day, R.A. Fleck, Cryo-injury and the implications this has to the conservation of biological resources, *Microalgae Biotechnol.* 1 (2015) 1–11.
- [13] I. Joseph, A. Panigrahi, P. Chandra, I. Kishore, Tolerance of three marine microalgae to cryoprotectant dimethyl sulfoxide, methanol and glycerol, *Indian J. Mar. Sci.* 29 (2000) 243–247.
- [14] W. Guermazi, A. Sellami-Kammoun, J. Elloumi, Z. Drira, L. Aleya, R. Marangoni, I.H. Ayad, S. Maalej, Microalgal cryo-preservation using dimethyl sulfoxide (Me<sub>2</sub>SO) coupled with two freezing protocols: influence on the fatty acid profile, *J. Therm. Biol.* 35 (2010) 175–181.
- [15] L. Rhodes, J. Smith, R. Tervit, R. Roberts, J. Adamson, S. Adams, M. Decker, Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae, *Cryobiology* 52 (2006) 152–156.
- [16] R. Rippka, J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman, R.Y. Stanier, Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *J. Gen. Microbiol.* 111 (1979) 1–61.
- [17] Statsoft Inc, *Statistica for Windows [Computer Program Manual]*, StatSoft Inc., Tulsa, OK, 2007.
- [18] P.L. Steponkus, F.O. Lanphear, Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury, *Plant Physiol.* 42 (10) (1967) 1423–1426.
- [19] L.E. Towill, P. Mazur, Studies on the reduction of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures, *Can. J. Bot.* 53 (11) (1975) 1097–1102.
- [20] M. Catala, M. Esteban, G.J.L. Rodríguez, L.G. Quintanilla, Development of a naturally miniaturised testing method based on the mitochondrial activity of fern spores: a new higher plant bioassay, *Chemosphere* 77 (2009) 983–988.
- [21] W. Chang, M. Chen, T. Lee, 2,3,5-Triphenyltetrazolium reduction in the viability assay of *Ulva fasciata* (Chlorophyta) in response to salinity stress, *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40 (1999) 207–212.
- [22] J. Kovacik, P. Babula, J. Hedbavny, J. Kovacik, Changes of metal-induced toxicity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NO modulators in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae), *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 5502–5511.
- [23] F. Zhang, L. Cheng, X. Xu, L. Zhang, H. Chen, Screening of biocompatible organic solvents for enhancement of lipid milking from *Nannochloropsis* sp, *Process Biochem.* 46 (2011) 1934–1941.
- [24] J. Kovacik, P. Babula, J. Hedbavny, O. Krystofova, I. Provaznik, Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object, *Chemosphere* 120 (2015) (23–20).
- [25] J. Xie, W. Hu, H. Pei, Detection of amount and activity of living algae in fresh water by dehydrogenase activity (DHA), *Environ. Monit. Assess.* 146 (2008) 473–478.
- [26] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, *Statistics for Experimenters: An Introduction to Designs, Data Analysis and Model Building*, Wiley, New York, 1978.
- [27] G.E. Box, N.R. Draper, *Response Surfaces, Mixtures, and Ridge Analyses*, Vol. 649 John Wiley & Sons, 2007.
- [28] M.I. Rodrigues, A.F. Iemma, Experimental strategy for fractional factorial and central composite rotational designs, in: CRC Press TFG (Ed.), *Experimental Design and Process Optimization*, CRC Press, Florida, 2014.
- [29] J.P. Cañavate, L.M. Lubián, Effects of culture age on cryopreservation of marine microalgae, *Eur. J. Phycol.* 32 (1997) 87–90.
- [30] H. Morschett, S. Reich, W. Wiechert, M. Oldiges, Simplified cryopreservation of the microalga *Chlorella vulgaris* integrating a novel concept for cell viability estimation, *Eng. Life Sci.* 16 (2016) 36–44.
- [31] M. Armstrong Lumley, R. Burgess, L.J. Billingham, D.F. McDonald, Colony counting is a major source of variation in CFU-GM results between centres, *Br. J. Haematol.* 97 (1997) 481–484.
- [32] A. Nakazawa, I. Nishii, Amidic and acetic cryoprotectants improve cryopreservation of volvocine green algae, *CryoLetters* 33 (2012) 201–212.
- [33] A. Crutchfield, K. Diller, J. Brand, Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta), *Eur. J. Phycol.* 34 (1999) 43–52.
- [34] D. Yang, W. Li, Methanol-promoted lipid remodelling during cooling sustains cryopreservation survival of *Chlamydomonas reinhardtii*, *PLoS One* 11 (2016) 1–17.
- [35] H.C. Osorio, C.N. Laranjeiro, L.M.A. Santos, M.F. Santos, First attempts to cryopreserve strains from the Coimbra Collection of Algae (ACOI) and the use of image analysis to assess viability, *Nova Hedwigia* 79 (2004) 227–235.
- [36] B.P. Piasecki, K.R. Diller, J.J. Brand, Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii*: a cause of low viability at high cell density, *Cryobiology* 58 (2009) 103–109.

- [37] J.S. Salas-Leiva, E. Dupré, Cryopreservation of the microalgae *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen): analysis of the effect of DMSO temperature and light regime during different equilibrium periods, *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 39 (2011) 271–279.
- [38] G.J. Morris, Cryopreservation of *Chlorella*. 1. Interactions of rate of cooling, protective additive and warming rate, *Arch. Microbiol.* 107 (1976) 57–62.
- [39] I. Tzovenis, G. Triantaphyllidis, X. Naihong, E. Chatzinikolaou, E. Papadopoulou, G. Xouri, T. Tafas, Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain, *Aquaculture* 230 (2004) 457–473.
- [40] S. Kono, K. Kuwano, N. Saga, Cryopreservation of *Eisenia bicyclis* (Laminariales, Phaeophyta) in liquid nitrogen, *J. Mar. Biotechnol.* 6 (1998) 220–223.
- [41] G. Chong, S. Tsai, L.H. Wang, C.Y. Huang, C. Lin, Cryopreservation of the gorgonian endosymbiont *Symbiodinium*, *Sci. Rep.* 6 (2006) 52–59.
- [42] A. Tannioua, V. Turpinb, T. Lebeau, Comparison of cryopreservation methods for the long term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia* (simonsen), *Cryobiology* 65 (2012) 45–50.
- [43] C. Bock, L. Krienitz, T. Proeschold, Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species, *Fottea* 11 (2) (2011) 293–312.
- [44] L. Krienitz, C. Bock, Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters, *Phytoplankton Responses to Human Impacts at Different Scales*, Springer, 2012, pp. 295–326.
- [45] L. Krienitz, V.A. Huss, C. Bock, *Chlorella*: 125 years of the green survivalist, *Trends Plant Sci.* 20 (2) (2015) 67–69.