

LIDIANE COVELL

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS DIURNAS EM MICROALGAS COM  
ACÚMULO DIFERENCIAL DE RESERVAS EM DUAS FASES DO  
CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C873a  
2015  
Covell, Lidiane, 1978-  
Alterações metabólicas diurnas em microalgas com  
acúmulo diferencial de reservas em duas fases do crescimento /  
Lidiane Covell. – Viçosa, MG, 2015.  
viii, 29f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Adriano Nunes Nesi.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 23-29.

1. Microalgas - Fisiologia. 2. *Chlamydomonas reinhardtii*.  
3. *Monoraphidium irregulare*. 4. Fotossíntese. 5. Biossíntese -  
Amido. 6. Biossíntese - Lipídeos. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de  
Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 579.83

LIDIANE COVELL

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS DIURNAS EM MICROALGAS COM  
ACÚMULO DIFERENCIAL DE RESERVAS EM DUAS FASES DO  
CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA:13 de julho de 2015.

---

Wagner Luiz Araújo

---

Mariana Fonseca Machado

---

Adriano Nunes Nesi  
(Orientador)

*“Das Leben ist wie ein Fahrrad. Man muss sich vorwärts bewegen, um das Gleichgewicht nicht zu verlieren.”*

“A vida é como uma bicicleta. Você tem que se mover para a frente para não perder o equilíbrio.”

Albert Einstein

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa;

Ao Departamento de Biologia Vegetal;

Ao Professor Adriano Nunes Nesi;

Ao membros da banca examinadora: Professor Wagner Luiz Araújo; Doutora Mariana Fonseca Machado;

Ao Professor Marcio Arêdes Martins;

Ao Professor Leandro Licursi de Oliveira;

Aos colegas da UCP, em especial a Dora, Marcelo e Jorge;

À toda minha família pela compreensão da ausência;

Ao meu marido, Marcio, pelo apoio incondicional.

## **BIOGRAFIA**

LIDIANE COVELL, filha de Vanir Ribeiro Magalhães e Adenir da Silva Lessa, nasceu em 01 de maio de 1978, na cidade de Viçosa, no Estado de Minas Gerais.

Graduou-se em Biologia pela Universidade Federal de Viçosa em março de 2014.

Em março de 2014, ingressou no programa de mestrado pela mesma instituição, com pesquisas relacionadas a caracterização do metabolismo primário em microalgas, concluindo os requisitos para obtenção do título de Magister Scientiae em julho de 2015.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	4
2.1 - Espécies utilizadas e produção de inóculo .....	4
2.2 - Condições de cultivo .....	5
2.3 - Curvas de crescimento .....	6
2.4 - Contagem de células .....	6
2.5 - Determinação de massa seca .....	6
2.6 – Determinação de massa seca livre de cinzas .....	7
2.7 - Extração e quantificação de clorofilas a e b.....	7
2.8 - Extração e quantificação de proteínas hidrossolúveis.....	7
2.9 - Extração e determinação de açúcares, amido, aminoácidos totais.....	8
2.10 - Determinação de lipídeos neutros .....	8
3 - RESULTADOS .....	8
3.1 – Caracterização do crescimento das cepas .....	8
3.2 – Determinação do crescimento nas fases LOG e STA.....	9
3.3 – Metabolismo do nitrogênio.....	11
3.4 – Metabolismo do carbono .....	13
3.5 – Taxa de síntese e degradação do amido.....	14
3.6 – Taxa de Crescimento .....	16
4 – DISCUSSÃO .....	17
5 – CONCLUSÃO.....	22
6 – REFERÊNCIAS.....	23

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curva de crescimento das cepas <i>Monoraphidium irregulare</i> BR023 e <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC125 em meio TAP. Setas indicam os pontos de coleta nas fases logarítmica e estacionária. Barras indicam cada fase de crescimento para as duas cepas. ....	9
Figura 2 – Número de células nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas (A) <i>Monoraphidium irregulare</i> BR023 e (B) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC125 durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro). Período de escuro destacado em cinza.....	10
Figura 3– Massa seca livre de cinzas nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas (A) <i>Monoraphidium irregulare</i> BR023 e (B) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC125 durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro). Período de escuro destacado em cinza.....	11
Figura 4– Concentrações de (i) clorofila a, (ii) clorofila b e (iii) razão clorofila a/b, por unidade de célula, nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas (A) <i>Monoraphidium irregulare</i> BR023 e (B) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC125 durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro). Período de escuro destacado em cinza. ....	12
Figura 5 – Concentração de (A) proteínas hidrossolúveis e (B) aminoácidos por unidade de célula nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas (i) <i>Monoraphidium irregulare</i> BR023 e (ii) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro). Período de escuro destacado em cinza. ....	13
Figura 6 – Concentração de (A) amido e (B) lipídios por unidade de célula nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas (i) <i>Monoraphidium irregulare</i> BR023 e (ii) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC125 durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro). Período de escuro destacado em cinza. ....	14
Figura 7– Taxas de (A) síntese e (B) degradação de amido nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas <i>Monoraphidium irregulare</i> BR023 e <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC125 durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro). Período de escuro destacado em cinza. Taxas calculadas pela razão entre os valores máximos e mínimos de cada fase e o respectivo tempo, em horas. ....	15
Figura 8 – Taxas de crescimento nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas <i>Monoraphidium irregulare</i> BR023 e <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC125 durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro).....	16



## RESUMO

COVELL, Lidiane, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Alterações metabólicas diurnas em microalgas com acúmulo diferencial de reservas em duas fases do crescimento.** Orientador: Adriano Nunes Nesi.

Existe um crescente interesse na utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis, alimentos e outros produtos de valor comercial. As microalgas possuem grande capacidade de fixar CO<sub>2</sub> atmosférico e acumular carbono, sobretudo na forma de amido e lipídeos. Entretanto, ainda pouco é conhecida a regulação da biossíntese de amido e lipídeos ao longo do curso diário da fotossíntese e as relações das variações desses metabólitos com o crescimento e a produção final de biomassa. Assim, faz-se necessário uma maior compreensão das vias metabólicas e sua regulação para compreender a fisiologia e os mecanismos envolvidos na biossíntese de amido e lipídeos. Dessa forma o presente trabalho objetivou estudar a biossíntese e degradação do amido, de açúcares e lipídeos ao longo do dia. Foram selecionadas duas espécies de microalgas verdes com diferentes taxas de crescimento e contrastantes quanto a produção de amido e lipídeos totais. Com base nestes critérios foram utilizadas *Chlamydomonas reinhardtii* CC125, que possui um elevado acúmulo de amido e baixo teor lipídico, e *Monoraphidium irregulare* BR023, que possui menor conteúdo de amido e maior conteúdo de lipídeo. A cepa de *M. irregulare* apresentou ao final do cultivo  $2,5 \times 10^6$  células/mL, sendo inferior ao verificado para o cultivo de *C. reinhardtii* ( $3,5 \times 10^6$  células/mL). Para proteínas foram encontrados valores médios inferiores em *M. irregulare* aos observados em *C. reinhardtii*. Comportamento similar entre as cepas foi observado para os teores de aminoácidos totais. Verificou-se menores taxas de síntese e degradação de amido para *M. irregulare* em ambas as fases quando comparado com as respectivas taxas para *C. reinhardtii*. Foram observadas maiores intensidades de fluorescência para lipídeos em *M. irregulare*, o que indica que esta espécie apresenta maior teor de lipídeo durante o cultivo em relação a *C. reinhardtii*. Conclui-se que: (i) os teores de proteínas e aminoácidos estão relacionados diretamente com a taxa de crescimento celular; (ii) lipídeo apresenta variação constante ao longo do dia; (iii) amido apresenta comportamento em ritmo circadiano; (iv) a taxa de degradação mais rápida do amido acompanha o aumento do crescimento, como em *C. reinhardtii*.

## ABSTRACT

COVELL, Lidiane, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Daytime metabolic changes in microalgae with differential accumulation of reserves in two phases growth.** Adviser: Adriano Nunes Nesi.

There is a growing interest in using microalgae as a resource for biofuel production, food and other value products. Microalgae have great ability to fix atmospheric CO<sub>2</sub> and accumulate carbon, mostly in the form of starch and lipids. However, it is still little known regulation of starch biosynthesis and lipid along the daily course of photosynthesis and the relationship of variations of these metabolites to the growth and final biomass production. Thus, a greater understanding of metabolic pathways it is necessary and its regulation to understand the physiology and the mechanisms involved in the biosynthesis of starch and lipids. Thus the present study investigated the biosynthesis and degradation of starch, sugars and lipids throughout the day. Two species of green microalgae with different growth rates and contrasting as the production of starch and total lipids selected. Based on these criteria were used *Chlamydomonas reinhardtii* CC125, which has a high accumulation of starch and low-fat, and *Monoraphidium irregulare* BR023, which has a lower starch content and higher content of lipid. The strain of *M. irregulare* showed at the end of cultivation  $2.5 \times 10^6$  cells/ml, being lower than that for the cultivation of *C. reinhardtii* ( $3.5 \times 10^6$  cells/ml). For proteins found average in *M. irregulare* average values lower to observed for the *C. reinhardtii*. Similar behavior was observed among strains for total amino acid content. It was found lower rates of starch synthesis and degradation *M. irregulare* in both phases compared to the respective rates for *C. reinhardtii*. There was higher fluorescence intensities for lipids in *M. irregulare*, indicating that this species has a higher lipid content during cultivation. It concludes that: (i) the levels of proteins and amino acids are directly related to the rate of cell growth; (ii) lipid presents constant change throughout the day; (iii) starch shows behavior circadian rhythm; (iv) the faster degradation rate of the starch accompanies increased growth, as in *C. reinhardtii*.

## 1 - INTRODUÇÃO

As algas são um grupo diverso, metabolicamente flexíveis em relação aos compostos de armazenamento e podem ser cultivadas em uma ampla variedade de ambientes, incluindo instalações de tratamento de águas residuais. As microalgas podem ser cultivadas ao longo do ano, desde que as condições que cultivo permitam taxas viáveis de crescimento e acúmulos de metabólitos de interesse (HOLBROOK et al., 2014).

A fotossíntese constitui a principal rota de fixação do carbono, entretanto algumas espécies permitem a combinação entre a fotossíntese e a assimilação heterotrófica de compostos orgânicos. Tal processo, denominado mixotrofia, possibilita que o crescimento das microalgas não seja estritamente dependente de luz nos cultivos (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004), bem como o uso de variadas fontes de carbono dependendo da aplicação da biomassa produzida e dos recursos disponíveis.

As microalgas podem ser utilizadas como matéria-prima em diversos processos de conversão de biomassa em energia. Microalgas com alta produtividade de triacilglicerídeos (TAG) podem fornecer óleo para a síntese de biodiesel, ao passo que microalgas ricas em amido, celulose e glicogênio podem ser utilizadas para a produção de bioetanol. Ademais, a biomassa resultante da extração de lipídeos e carboidratos pode ser submetida à digestão anaeróbia para a produção de biogás, e para reciclagem de nutrientes como N e P (PARMAR et al., 2011).

Sob condições normais de crescimento, a biomassa de microalgas é constituída principalmente por proteínas, carboidratos, lipídeos, membrana e de parede celular. Acúmulo de compostos de reserva ricos em energia, tais como amido e lipídeos (óleo) ocorre em muitas microalgas sob condições de escassez de nutrientes, como deficiência de N (HICKS et al., 2001; HU et al., 2008).

O lipídeo é em grande parte constituído por TAGs e representa uma forma de armazenamento de energia 2,25 vezes maior do que o amido por unidade de massa (SIAUT et al., 2011). Portanto, a produção de biodiesel pode ser constante, desde que o cultivo das algas seja contínuo. O rápido crescimento e a natureza unicelular permite que esses organismos tenham uma rápida adaptação podendo assim serem manipulados para produzir mais lipídeos por alterações adequadas ao seu ambiente (HOLBROOK et al., 2014; HU et al., 2008).

Os lipídeos, sob a forma de TAGs, são os principais compostos de armazenamento de ácidos graxos, sendo essa a forma mais densa de energia de carbono reduzido na maioria dos organismos vivos (FAN et al., 2012). Entretanto, a maior parte do conhecimento sobre as vias bioquímicas, as enzimas e os fatores regulatórios envolvidos na biossíntese de lipídeos de membrana e de armazenamento de TAG em microalgas é em grande parte inferida a partir da análise do genoma (FAN et al., 2012), do perfil de transcritos (MILLER et al., 2010) e do perfil proteico (MOELLERING; BENNING, 2010).

Sob condições desfavoráveis ao crescimento celular, várias microalgas acumulam lipídeos neutros na forma de gotículas lipídicas localizadas no citoplasma (CONVERTI et al., 2009; ILLMAN et al., 2000; LI, YANTAO et al., 2011; LV et al., 2010). A condição de estresse mais estudada para desencadear o acúmulo de lipídeo é a deficiência de N no meio de cultura. Outras condições de estresse, tais como alto pH, salinidade, luz e temperaturas extremas também tem sido descritas como fatores que têm como resposta o acúmulo de TAG (SIAUT et al., 2011).

Outra forma de armazenamento nas microalgas é o amido. Ele é um polímero de glicose e representa uma importante forma de armazenamento de energia que ocorre tanto em células vegetais vasculares quanto de em algumas microalgas, especialmente sob condições de estresse (LI, Y. et al., 2010).

A primeira reação da síntese de amido no cloroplasto é catalisada pela ADP glicose pirofosforilase (AGPase), que converte a glicose-1-fosfato e ATP em ADP-glicose e o PPi e representa uma etapa chave na regulação da biossíntese do amido. Subsequentemente, a ADP-glicose é utilizada pelas sintases do amido e enzimas ramificadoras para alongar as cadeias de glicano do grânulo de amido (BALL; MORELL, 2003).

Em *Arabidopsis thaliana*, a supressão da subunidade menor da AGPase conduziu a uma redução de 33% na evolução de O<sub>2</sub> fotossintético, enquanto a perda da subunidade maior resultou em uma diminuição moderada de 8% (SUN et al., 1999). Da mesma forma, que em mutantes de cianobactérias, a falta da AGPase, inibe altamente a evolução fotossintética de O<sub>2</sub> (GRUNDEL et al., 2012), indicando a importância da atividade da AGPase não só na produção de amido/glicogênio, mas também na manutenção das atividades fotossintéticas, fornecendo ATP para a formação de NADPH.

A super expressão das enzimas, FBPase e SBPase em tabaco levou ao aumento do teor de açúcar e armazenamento de carboidratos, melhorando a produção de biomassa (MIYAGAWA et al., 2001). As taxas de fluxo metabólico através do ciclo de Calvin-Benson foram descritos por uma série de laboratórios (SZECOWKA et al., 2013), no entanto, o fluxo de carbono através de armazenamento carbono e de vias de sequestro que conduzem ao armazenamento de carboidratos e síntese de lipídeos não foram bem caracterizados em microalgas.

De acordo com o trabalho de KRISHNAN et al. (2015), foi investigado o papel da biossíntese de amido afetando o crescimento fotossintético e a partição de carbono em um mutante de amido em *Chlamydomonas reinhardtii*, onde durante a cultura repleta de nutrientes, esse mutante não redireciona o metabolismo para produzir mais proteínas ou lipídeos, e acumula 20% menos biomassa.

Assim como em plantas, a biossíntese e degradação do amido em microalgas estão sob o controle do ritmo circadiano (MITTAG et al., 2005) que representa um relógio biológico endógeno controlando eventos metabólicos e fisiológicos que ocorrem em fases do ciclo de luz e escuro diários. Além de exibir uma oscilação auto sustentada em condições constantes, ritmos circadianos devem apresentar o mesmo período e taxa em diferentes temperaturas e luminosidades.

A inibição do crescimento é capaz de gerar uma resposta de direcionamento parcial do metabolismo para a produção de compostos de carbonos reduzidos, que poderia resultar em aumento do rendimento em processos de produção de biocombustíveis (CALDANA et al., 2013). Além disto, a síntese de compostos de reservas está relacionada com os níveis de metabólitos de outras classes, como por exemplo, os carotenóides (RECHT et al., 2014). O acúmulo de ácidos graxos frequentemente ocorre quando há um acréscimo nos níveis dos intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA) em decorrência do acúmulo de esqueletos de carbono e poder redutor utilizado na biossíntese de lipídeos (FAN et al., 2012; RECHT et al., 2014). No entanto, muito pouco se conhece sobre como estes fatores metabólicos estão associados com a produção de biomassa e lipídeos em diferentes cepas de microalgas (LU, S. et al., 2012).

Em microalgas verdes, a síntese de lipídeos e de amido utilizam precursores de carbono comuns, porém a regulação da partição de carbono em amido e vias de síntese de lipídeos não é ainda bem compreendida (RAWSTHORNE, 2002; WESELAKE et al., 2009). As alterações no fluxo de carbono da síntese de amido afetam a partição de

carbono em vias de síntese de lipídeos neutros e polares e a fisiologia do crescimento de microalgas, entretanto é necessário mais estudos para entender o funcionamento (LI, Y. et al., 2010). O papel do amido em acúmulo de TAG ainda é controverso e ainda permanecem questões fundamentais sobre a natureza da interação entre si e com o metabolismo do nitrogênio bem como o crescimento e a produção de biomassa (FAN et al., 2012).

O fato do metabolismo de microalgas ser flexível em relação aos compostos de armazenamento, torna o estudo uma tarefa difícil para se elucidar uma descrição detalhada da interação entre as diversas vias metabólicas (JOHNSON; ALRIC, 2013). Ainda de acordo com os autores, há, no entanto, as restrições que governam o metabolismo central do carbono em microalgas que são revelados pela compartimentalização e regulação das vias e sua relação com os processos celulares fundamentais, tais como a motilidade celular, divisão, absorção de carbono e particionamento, ritmos externos e internos, e estresse de nutrientes.

Para microalgas os perfis de acúmulo de massa seca, proteínas e ácidos graxos sugerem que as células continuam crescendo em algumas horas e acumulam reservas de energia após a passagem para uma outra fase (WILLAMME et al., 2015). Em plantas vasculares o amido é acumulado à luz e decompõem assim que a noite ocorre (SMITH; STITT, 2007). Como as algas metabolizam o acetato ainda no escuro, através do ciclo do glioxalato, ocorre acúmulo de amido ainda na fase de escuro, o que não é o caso em plantas vasculares, que não podem usar qualquer fonte externa de carbono para o crescimento (WILLAMME et al., 2015)

Portanto, o presente estudo foi realizado para investigar como compostos associados ao metabolismo do N e C se comportam nas cepas de *Monoraphidium irregulare* BR023 e *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 que apresentam metabolismo de reservas diferentes ao longo de 24 horas nas fases logarítmica e estacionária do crescimento.

## **2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 - Espécies utilizadas e produção de inóculo**

Neste trabalho, foram estudadas alterações metabólicas em duas cepas do filo Chlorophyta, a *Monoraphidium irregulare* BR023 e a *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 durante duas fases de cultivo e que apresentaram respostas diferentes, em

trabalhos prévios (ROCHA, 2014). As duas cepas foram pré-adaptadas nas condições de cultivo do experimento durante 3 ciclos de geração, cultivadas em meio Tris Acetate-Phosphate Medium (TAP) (HARRIS, 1989). O meio TAP tem como principal característica o uso de acetato (0,42 g/L) como fonte de carbono.

Essas cepas com características diferentes selecionadas para a realização do experimento, foram coletadas em uma lagoa artificial da Universidade Federal de Viçosa – UFV e isoladas na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) da UFV. A primeira cepa *C. reinhardtii* CC125, apresenta o genoma completo sequenciado, um elevado teor de amido e baixo teor lipídico. A segunda escolhida, *M. irregulare* BR023, que possui apenas uma parte do genoma sequenciado, exibiu em condições conhecidas de cultivo menor conteúdo de amido e maior conteúdo de lipídeo. Ambas foram cultivadas no meio TAP, acondicionada inicialmente em Erlenmeyers de 125 mL, sob condições fotoautotróficas com temperatura de  $24 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16: 8 h (luz:escuro) e irradiância média de  $100 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proveniente de lâmpadas tubulares de LED (Light Emitter Diode) de 20 W (Kian, Led Tube, China). A agitação dos inóculos foi efetuada em mesa de agitação orbital a 110 rotações por minuto (rpm). Após a aclimação, quando a concentração inicial dos inóculos atingiram o valor de  $10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ , estes foram utilizados no experimento.

## 2.2 - Condições de cultivo

Os cultivos das cepas foram realizados em condições fotoautotróficas de crescimento, com temperatura de  $24 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro), irradiância média de  $100 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proveniente de 8 lâmpadas tubulares de LED de 20 W. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 70 mL de volume útil com 5 repetições biológicas. As unidades experimentais foram mantidas em agitador orbital à 110 rpm.

As concentrações celulares dos inóculos foram de  $1,78 \times 10^7$  células.  $\text{mL}^{-1}$  para *C. reinhardtii* CC125 e de  $2,0 \times 10^7$  células.  $\text{mL}^{-1}$  para *M. irregulare* BR023, ambas cultivadas em Erlenmeyers de 125 mL contendo 70 mL de volume útil. A concentração celular dos cultivos foi ajustada para  $1,0 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  sendo o pH dos cultivos ajustado para  $7,0 \pm 0,1$  por meio de adição de soluções de HCl ou NaOH 2M.

Os cultivos de *C. reinhardtii* CC125 e *M. irregulare* BR023 tiveram duração de 9 e 8 dias, respectivamente, sendo mantidos até a fase de senescência. O crescimento do cultivo foi avaliado por meio de curva de crescimento com leitura diária de 200  $\mu\text{L}$  de

amostra no comprimento de onda de 750nm em espectrofotômetro, identificando as fases logarítmica (LOG), estacionária (STA) e senescente (SNE) dos cultivos. Nas fases LOG e STA foram definidos 7 pontos de coletas com 5 repetições para cada um em um período de 24 horas. Nesse intervalo foram realizadas 5 coletas na presença luz (0h; 3,5h; 7,5h; 11,5h e 15h) e duas no escuro (19h e 23h).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições e um total de 70 unidades experimentais para cada cepa. Para as análises metabólicas foram coletados 2 mL de amostra, centrifugados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido, sendo armazenados em freezer – 80 °C até o momento das análises. Para a determinação de biomassa foram filtrados 10 mL de cada amostra no momento da coleta.

### **2.3 - Curvas de crescimento**

Amostras de 5 unidades experimentais foram coletadas para a realização de curvas de crescimento durante todo o período de cultivo para acompanhamento do padrão de crescimento de cada uma. As amostras foram coletadas e lidas no comprimento de onda de 750 nm em um aparelho de leitor de microplacas.

### **2.4 - Contagem de células**

Nos 7 pontos das fases LOG e STA de cada cepa foram coletados 500 µL de cada unidade experimental dos cultivos e fixados em 500 µL de solução Transeau (BICUDO e BICUDO, 1970). As amostras foram acondicionadas no escuro e em temperatura ambiente após a fixação. As contagens de células foram realizadas por um citômetro de fluxo. Para isso utilizou-se 100 µL de cada amostra, sendo o tempo de contagem por fluxo de um minuto. Para a realização dos cálculos da contagem do número de células foi utilizado o software Flow Jo VX.

### **2.5 - Determinação de massa seca**

A determinação de massa seca foi realizada conforme (GRIFFITHS et al., 2011). Foram coletados 10 mL de cultivo, nas fases LOG e STA, e filtrados em membrana de nitro/celulose com porosidade de 45 µm (Unifil – NC 47 mm), previamente secas em estufa a 75 °C por 24 horas e posteriormente pesadas. Após a filtração, as membranas foram secas em estufa à 75 °C e pesadas em balança com precisão de 5 casas decimais



até a obtenção de massa constante. Em seguida, as membranas foram retiradas da estufa e imediatamente acondicionadas em dessecador para atingirem a temperatura ambiente. Após esse período, as membranas foram pesadas e a massa seca foi determinada, descontando-se o valor da massa da membrana.

## **2.6 – Determinação de massa seca livre de cinzas**

A massa seca livre de cinzas foi determinada por gravimetria e descontada das cinzas após calcinação. Para obtenção da massa seca livre de cinzas, as membranas contendo a massa seca, filtradas e previamente pesadas, foram acondicionadas em cadinho de porcelana já calcinados e dispostos em forno mufla a 575 °C por 5 h. Após nova calcinação e o subsequente resfriamento, o cadinho contendo as cinzas foi disposto em dessecador. O conjunto foi então pesado e a massa seca livre de cinzas foi determinado pela subtração da massa seca pela massa de cinza após a calcinação.

## **2.7 - Extração e quantificação de clorofilas a e b**

As amostras coletadas e congeladas em nitrogênio líquido foram acondicionadas posteriormente em freezer a -80 °C até a extração. Para a extração de pigmentos foi coletado 2 mL de cultura, nas fases LOG e STA, e centrifugados a 11000 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Para as quantificações de clorofila a e b foi realizada a extração etanólica e posteriormente a determinação da absorbância do extrato etílico nos comprimentos de onda de 665 e 645 em um leitor de microplacas (UVM 340, AsysHitech). Para o cálculo da concentração de clorofila a e clorofila b foram utilizadas as equações propostas por (WELLBURN, 1994), com resultados expressos em  $\mu\text{g}/\text{n}^\circ$  células de cultivo.

## **2.8 - Extração e quantificação de proteínas hidrossolúveis**

A extração de proteínas hidrossolúveis totais foi realizada, utilizando 2 mL do cultivo na fase LOG e STA coletados como descrito no item anterior, conforme (MICHIELSEN et al., 1998). A quantificação foi realizada pelo método de (BRADFORD, 1976). A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. Como padrão foi utilizado a albumina do soro bovino (BSA), sendo os resultados expressos em  $\mu\text{g}/\text{n}^\circ$  células de cultivo.

## **2.9 - Extração e determinação de açúcares, amido, aminoácidos totais**

Para estas análises foram coletados 2 mL dos cultivos e submetido à extração etanólica, a quente (FERNIE et al., 2001), determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de glicose, frutose e sacarose (FERNIE et al., 2001), aminoácidos solúveis totais (GIBON et al., 2004) e, na fração insolúvel, os teores de amido (FERNIE et al., 2001).

## **2.10 - Determinação de lipídeos neutros**

O acúmulo de TAG na célula foi estimado utilizando o corante vermelho do Nilo pelo método de fluorescência de COOKSEY et al. (1987) adaptado por (GARDNER et al., 2010). Foram utilizados 300 uL de amostra e 1 uL de vermelho do nilo, dissolvido em acetona a 1 mg/mL. A intensidade de fluorescência do vermelho do Nilo foi quantificada em um leitor de microplacas (Victor X5 – Perkin Elmer) utilizando filtros de 485 nm para excitação e 595 nm para emissão. Foi utilizada uma placa negra de 96 poços para evitar o espalhamento da fluorescência. Os dados de intensidade de fluorescência foram normalizados por densidade celular.

# **3 - RESULTADOS**

## **3.1 – Caracterização do crescimento das cepas**

As cepas foram caracterizadas por meio de curvas de crescimento, por densidade óptica, durante todo o período de cultivo com leituras no comprimento de onda de 750 nm. As cepas avaliadas apresentaram uma fase de adaptação, ou fase LAG, curta, e uma fase LOG variando de 24 a 36h, sendo que a fase STA correspondeu a grande parte do período de cultivo (Figura 1). O cultivo foi mantido até a fase de SNE completando assim todas as fases do ciclo das cepas. As cepas entraram rapidamente na fase LOG assim como em SNE, o que pode ser explicado pelo fato do meio TAP ser deficiente em nitrogênio, apenas 0,375 g/L de NH<sub>4</sub>Cl, quando comparado a outros meios de cultura. Essa deficiência de nitrogênio no meio de cultura é uma condição de estresse para as cepas.

A taxa de crescimento da cepa *C. reinhardtii* CC125 foi maior que da cepa de *M. irregulare* BR023, conforme inclinação da curva na fase LOG apresentada na Figura 1. A cepa de *M. irregulare* BR023 cresceu mais lentamente em relação a cepa de *C. reinhardtii* CC125, que atingiu a fase STA mais tarde.

As setas indicam os pontos onde foram feitas as 7 coletas ao longo de 24 horas para cada cepa. Uma vez que as cepas obtiveram um período diferente para a fase estacionária, conforme pode ser visto na Figura 1, vale ressaltar que o meio da fase estacionária foi diferente entre ambas as cepas.

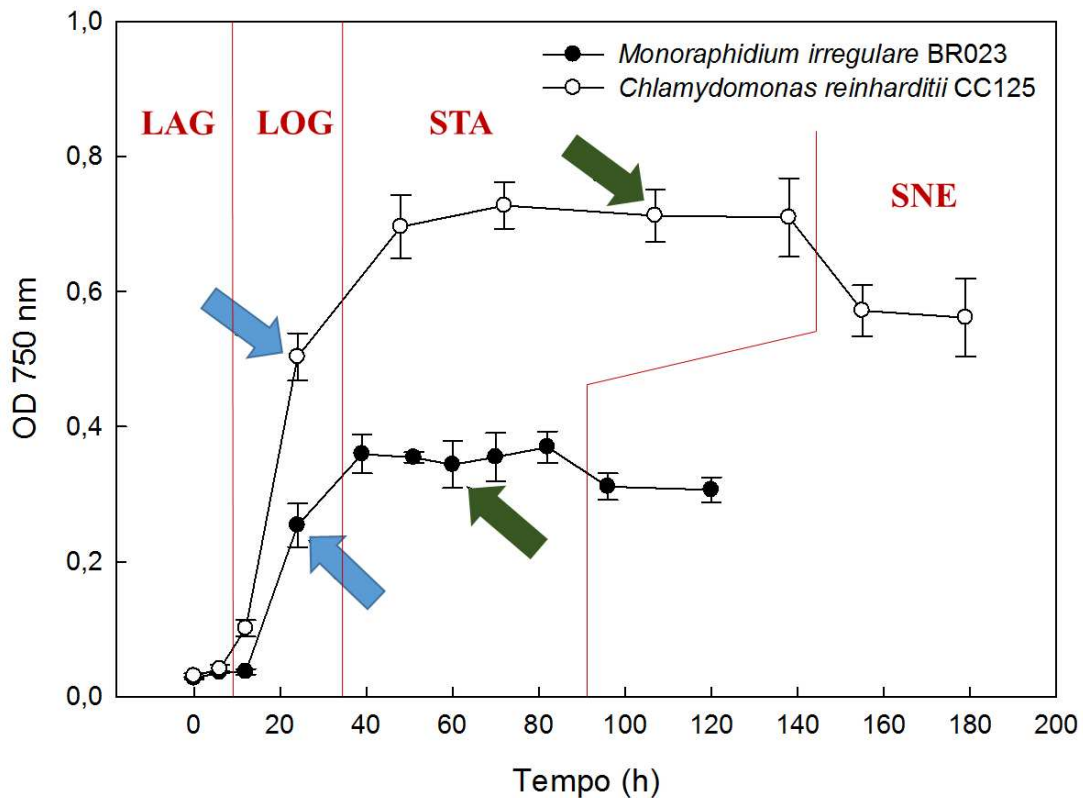


Figura 1 – Curva de crescimento das cepas *Monoraphidium irregulare* BR023 e *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 em meio TAP. Setas indicam os pontos de coleta nas fases logarítmica e estacionária. Barras indicam cada fase de crescimento para as duas cepas.

### 3.2 – Determinação do crescimento nas fases LOG e STA

Verificou-se que o número de células não alterou marcadamente ao longo do dia (Figura 2). Entretanto, verificou-se alterações entre as fases para as duas cepas. Observou-se também que durante todo o cultivo, nas fases LOG e STA a cepa de *C. reinhardtii* CC125 apresentou um número maior de células quando comparada com a cepa de *M. irregulare* BR023.

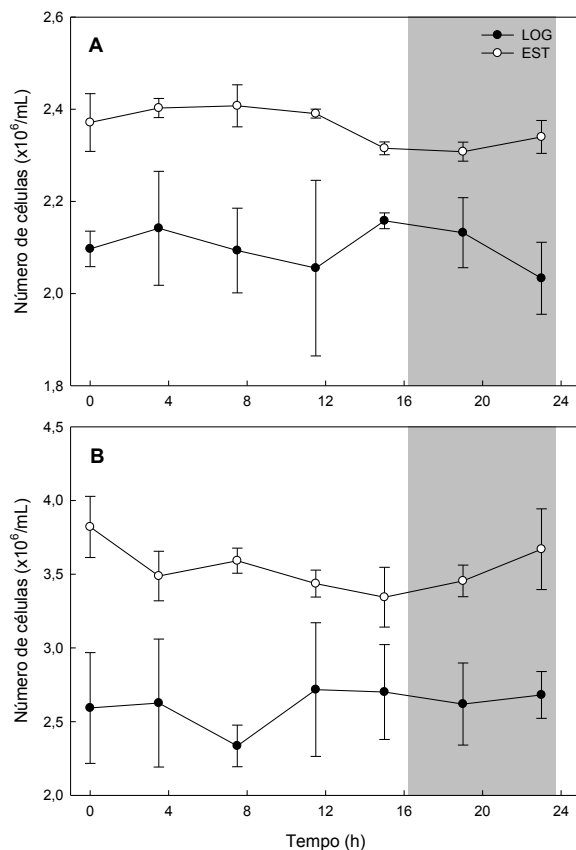


Figura 2 – Número de células nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas (A) *Monoraphidium irregulare* BR023 e (B) *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro). Período de escuro destacado em cinza.

A variação na quantidade de massa seca livre de cinzas ao longo do dia indica que a massa seca aumenta durante as fases de crescimento das células, atingindo um valor médio de 0,8 mg/mL na fase STA para *M. irregulare* BR023 e um valor médio de 0,9 mg/mL na fase STA para *C. reinhardtii* CC125 (Figura 3). Entretanto, pequena variação entre os pontos de coletas foi observada ao longo do dia.

Para verificar a relação entre os valores de contagem de células, massa seca livre de cinzas e das leituras feitas ao longo do cultivo, foi calculado a razão entre a média da fase STA e a média da fase LOG, obtendo valores de 1,413 para OD 750nm, 1,357 para contagem de células e 1,212 para massa seca. Podendo ser atribuído o maior valor para a leituras a 750 nm a absorção do meio de cultura e o teor de pigmento, que interferem nos resultados da leitura.

Os resultados obtidos para os metabólitos de C e N foram calculados todos em função do número de células, possibilitando assim resultados mais precisos.

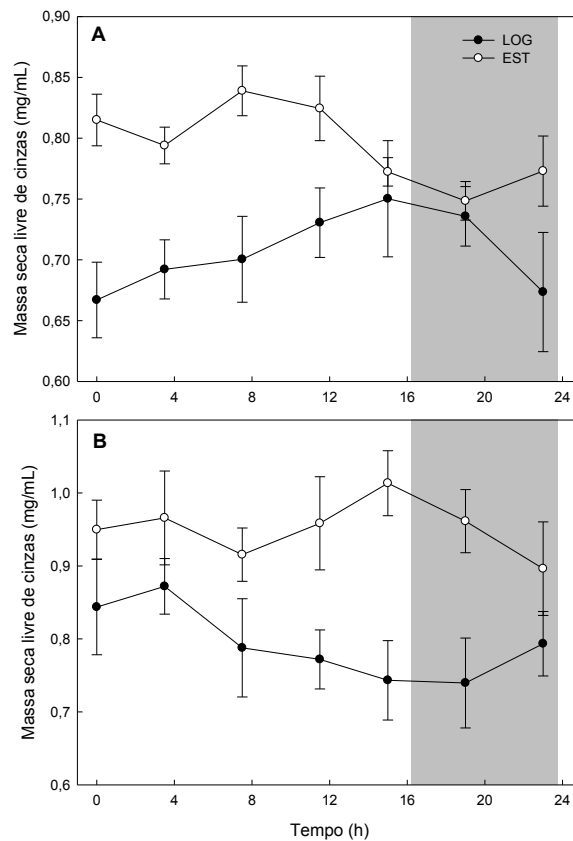


Figura 3– Massa seca livre de cinzas nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas (A) *Monoraphidium irregulare* BR023 e (B) *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro). Período de escuro destacado em cinza.

### 3.3 – Metabolismo do nitrogênio

A tendência do conteúdo de clorofila a e b diferiu do observado para o número de células e massa seca para as duas cepas, uma vez que o perfil de acúmulo de clorofila não é estimado apenas pelo aumento constante seguido por um decréscimo acentuado correlacionada com a divisão celular. Na quantificação desses pigmentos, não observou-se uma diferença significativa dos teores ao longo do dia para cada fase, entretanto os teores para a fase LOG foram superiores aos da fase STA, tanto para *M. irregulare* BR023 (Figura 4Ai, Bi e Ci) quanto para *C. reinhardtii* CC125 (Figura 4Aii, Bii e Cii). Isso sugere a ocorrência de um elevado auto-sombreamento na fase STA, resultando em menor incidência de luz no interior do cultivo o que poderia estar interferindo na eficiência fotossintética. Em adição verificou-se que os valores de clorofilas para as duas cepas não variaram ao longo do dia em ambas as fases de cultivo.

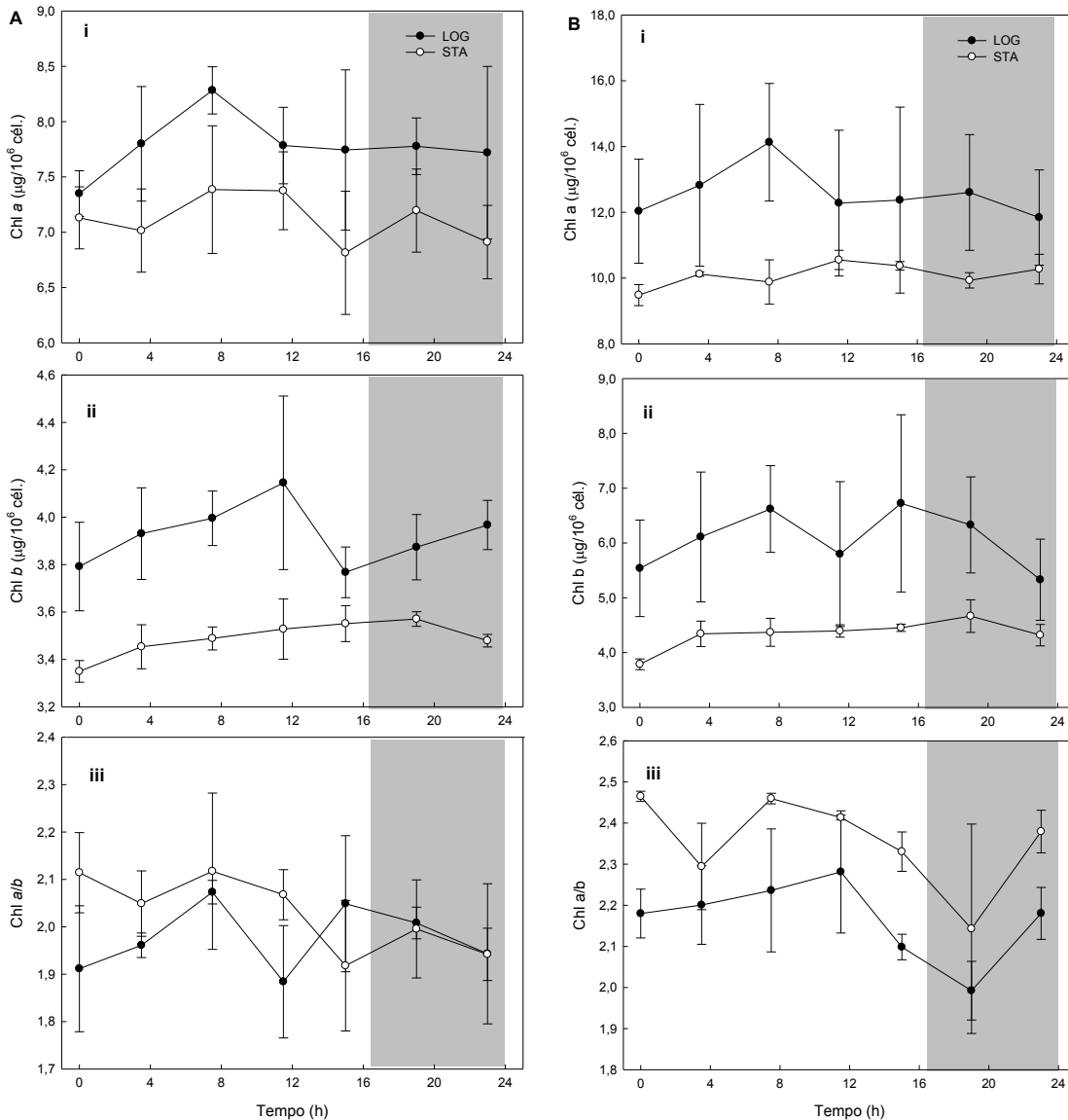


Figura 4– Concentrações de (i) clorofila a, (ii) clorofila b e (iii) razão clorofila a/b, por unidade de célula, nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas (A) *Monoraphidium irregulare* BR023 e (B) *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro). Período de escuro destacado em cinza.

Ainda em relação ao metabolismo do nitrogênio, verificou-se que o teor total de proteína para ambas as cepas foram maiores na fase LOG quando comparada a fase STA (Figura 5A). Esses valores apresentaram uma tendência de diminuição com o aumento da produção de biomassa, bem como o aumento do número de células. Entretanto observou-se uma tendência de aumento durante a noite para a cepa de *M. irregulare*, o que não ocorreu com a cepa de *C. reinhardtii*.

Como descrito em outros estudos (MONTGOMERY et al., 2014), os teores de aminoácidos livres são inferiores em comparação com os outros metabolitos analisados neste estudo, o que corrobora com os resultados das Figuras 5Bi e ii. Para *M. irregulare* os dados obtidos não apresentam um padrão regular entre as fases logarítmica e estacionária, embora tenha sido observado uma tendência de diminuição no período da noite. Enquanto que para *C. reinhardtii* foi mantido um padrão similar ao encontrado para proteína.

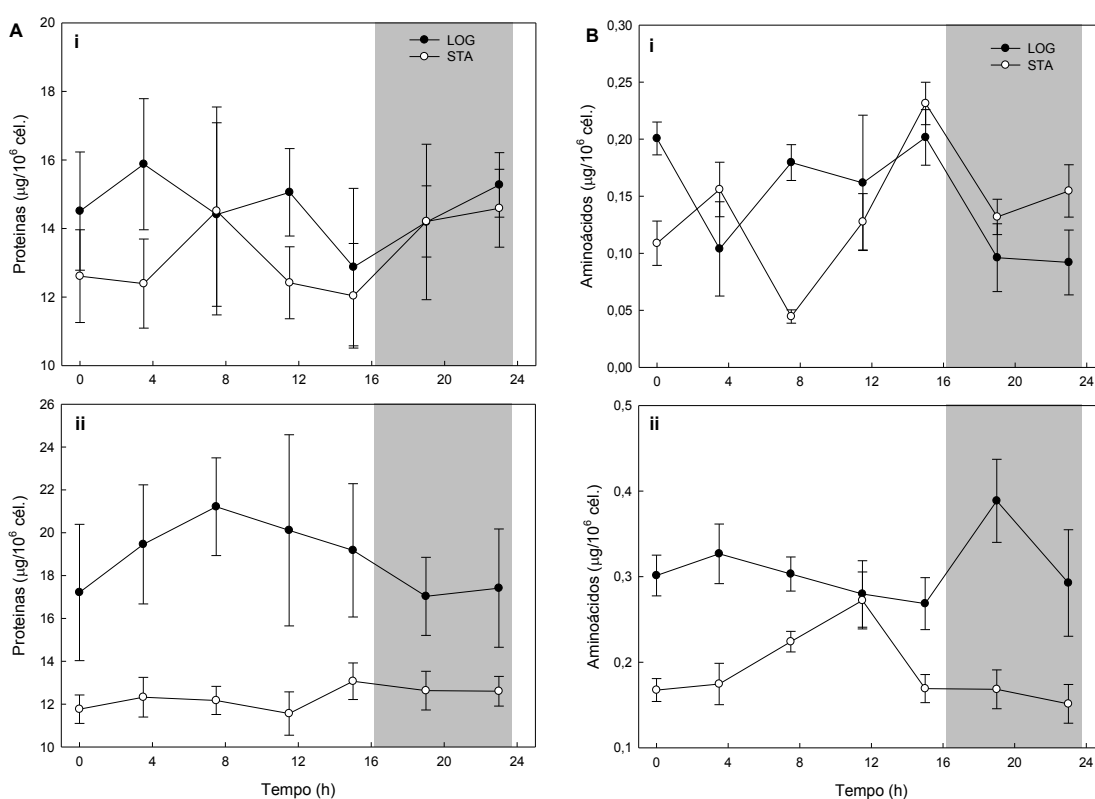


Figura 5 – Concentração de (A) proteínas hidrossolúveis e (B) aminoácidos por unidade de célula nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas (i) *Monoraphidium irregulare* BR023 e (ii) *Chlamydomonas reinhardtii* durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro). Período de escuro destacado em cinza.

### 3.4 – Metabolismo do carbono

Quanto aos compostos de reserva, para a cepa *M. irregulare* (Figura 6Ai) não foi observado diferença no teor de amido entre as duas fases de crescimento, enquanto que a cepa de *C. reinhardtii* obteve maiores valores de amido na fase STA em relação a fase LOG (Figura 6Aii). Observou-se um padrão semelhante para as duas cepas entre as curvas de amido ao longo do dia, em que o valor mínimo adquirido foi no início do dia e o máximo no meio do dia, iniciando-se assim a degradação, que foi mantida no

período de escuro. Entretanto as duas cepas tiveram comportamentos diferentes entre si quando comparadas entre as fases analisadas. *C. reinhardtii* mostrou um aumento nos teores de amido da fase LOG para a STA, o que não foi observado para a cepa de *M. irregulare*.

Foram realizadas análises para a quantificação de açúcares (glicose, frutose e sacarose), entretanto os valores foram abaixo do limite de detecção do aparelho utilizado.

Contrariamente aos valores obtidos em relação aos teores de amido, *M. irregulare* apresentou os maiores teores de lipídeos na fase STA quando comparada a fase LOG (Figura 6Bi). Para a cepa de *C. reinhardtii* foram encontrados valores menores do que para *M. irregulare*, além de não terem se diferenciado em relação aos valores das duas fases (Figura 6Bii).

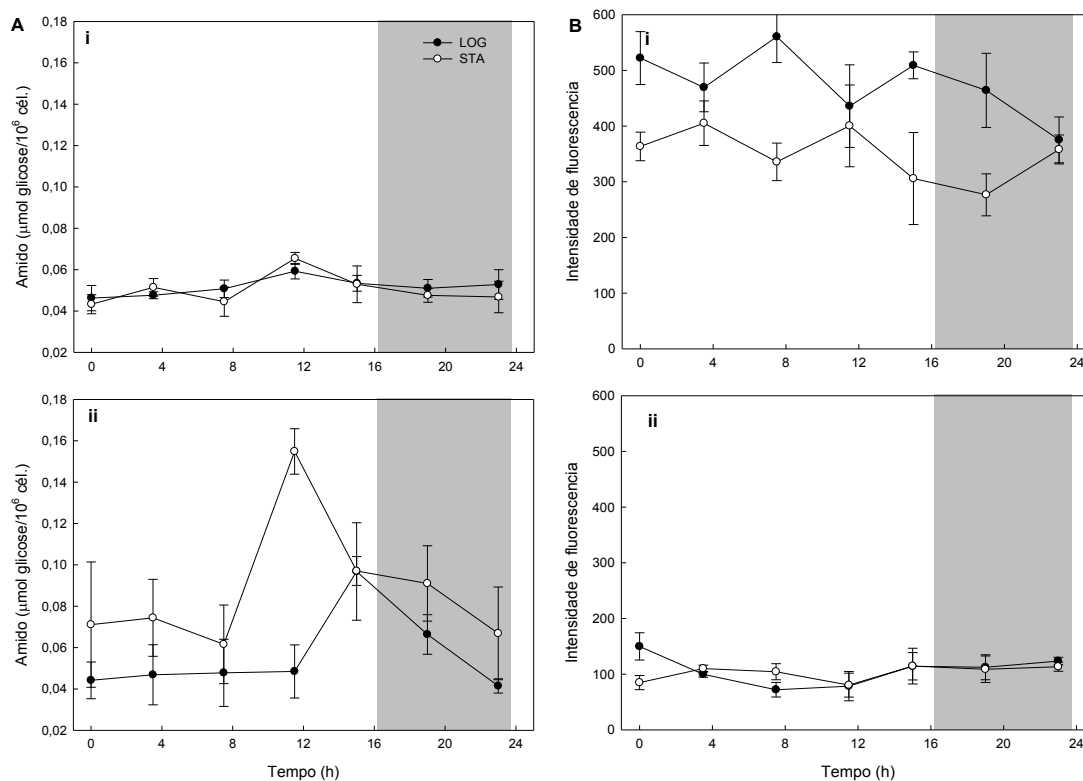


Figura 6 – Concentração de (A) amido e (B) lipídios por unidade de célula nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas (i) *Monoraphidium irregulare* BR023 e (ii) *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro). Período de escuro destacado em cinza.

### 3.5 – Taxa de síntese e degradação do amido

Para verificar a relação entre a variação entre os teores de amido e crescimento foram determinadas as taxas de síntese e degradação. Para tais estimativas, foram



utilizados os teores máximos de amido às 19h, subtraído do teor de amido no início do período de luz em relação ao número de horas de luz. Já para o cálculo das taxas de degradação, foram utilizados os teores máximos de amido menos os valores observados no final da noite divididos pelo intervalo de tempo entre os dois pontos de coleta. Curiosamente verifica-se que as taxas de síntese e degradação de amido são inferiores para *M. irregulare* na fase LOG e STA. e comparadas as taxas para *C. reinhardtii*. Entretanto, diferenças marcantes são observadas para as taxas de síntese e degradação da fase STA para *C. reinhardtii*. Observa-se que nessa fase as taxas são superiores para a *C. reinhardtii* em relação a *M. irregulare*.

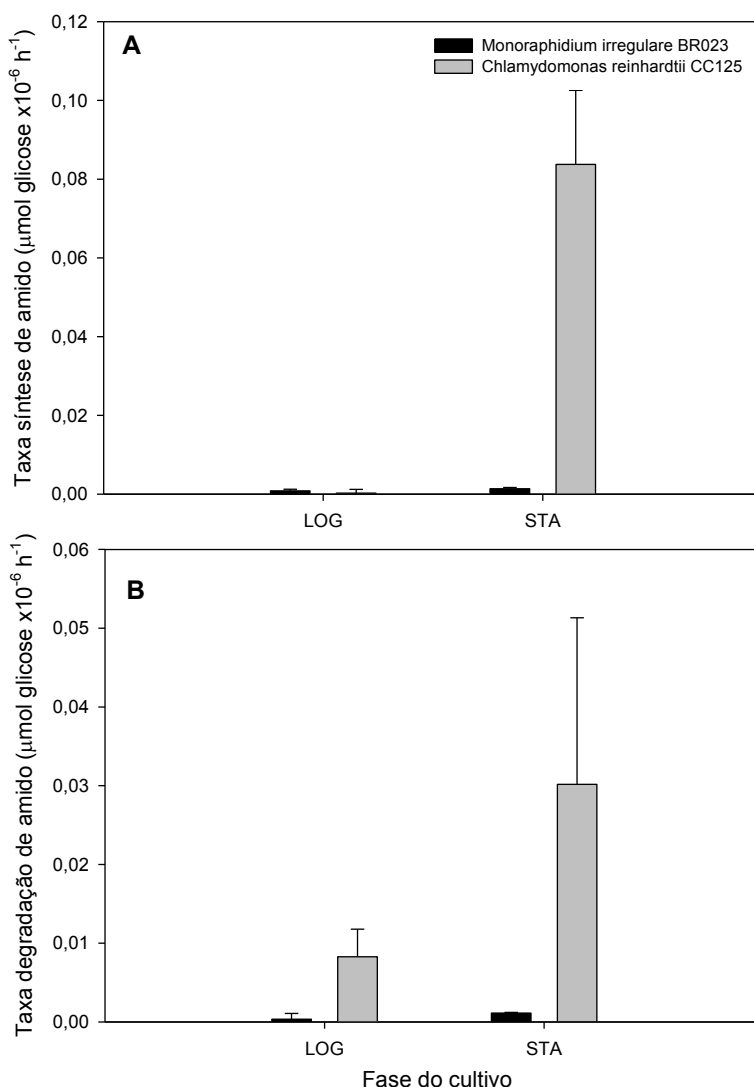


Figura 7– Taxas de (A) síntese e (B) degradação de amido nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas *Monoraphidium irregulare* BR023 e *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro). Período de escuro destacado em cinza. Taxas calculadas pela razão entre os valores máximos e mínimos de cada fase e o respectivo tempo, em horas.

### 3.6 – Taxa de Crescimento

Para verificar a relação dos metabólitos com a taxa de crescimento das cepas em estudo, foi determinada a taxa de crescimento para as duas cepas por meio dos valores da absorbância das fases LOG e STA do cultivo (TORTORA et al., 2003). O valor dessa taxa é calculado pelo log de delta da absorbância e o tempo de cultivo na fase log, em cada fase. Como os valores na fase STA dos cultivos tendem a se manterem constantes, esse valor fica próximo a zero, entretanto por meio do resultado da fase LOG, pode-se inferir uma maior taxa de crescimento de *C. reinhardtii* em relação a *M. irregulare*.

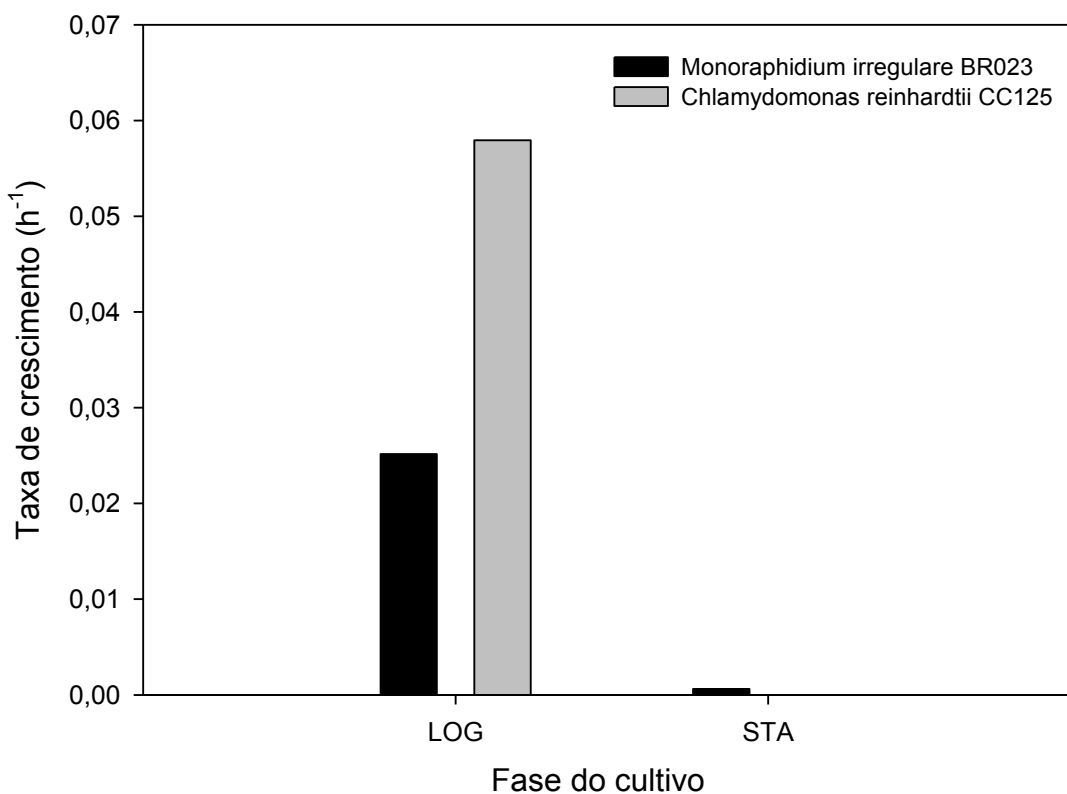


Figura 8 – Taxas de crescimento nas fases logarítmica (LOG) e estacionária (STA) para as cepas *Monoraphidium irregulare* BR023 e *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 durante um fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro).

#### 4 – DISCUSSÃO

Curvas de crescimento são importantes em estudos de cultivos de microalgas. A partir das curvas de crescimento pode-se inferir sobre comportamento da cepa de microalga em relação ao cultivo ao longo do tempo. As curvas de crescimento comumente são construídas a partir da contagem de células (ILLMAN et al., 2000) ou determinação de massa seca (LIU et al., 2011; MANDAL; MALLICK, 2009). Pode-se também monitorar a síntese de metabólitos de interesse (CHEN et al., 2009).

Em relação ao crescimento, as cepas estudadas apresentaram uma fase LAG muito curta, seguidas por uma fase LOG que variou de 24 a 36 horas, sendo portanto a fase STA a de maior duração (Figura 1). Isto pode ser atribuído ao fato de que inóculos iniciais concentrados estimulam uma melhor adaptação à nova condição de cultivo e, portanto, propiciam uma fase LAG curta e um menor período de coleta (LU, S. et al., 2012).

Microalgas que exibem curvas de crescimento curta com rápida entrada na fase STA, são desejáveis para a produção de biodiesel, uma vez que elas exibem uma tendência de acumularem lipídeos na fase STA (HU et al., 2008), pois as células reduzem seu gasto energético em sucessivas divisões e passam a sintetizar substâncias de reserva (WILLIAMS; LAURENS, 2010).

A concentração de massa seca livre de cinzas é um fator importante, pois é um indicativo da produção que pode ser obtida em cultivos contínuos para a produção de metabólitos de interesse (GRIFFITHS; HARRISON, 2009). Os dados de produção calculados por meio da massa seca livre de cinzas deste estudo (Figura 3) aumentaram da fase LOG para a STA, em que a cepa de *C. reinhardtii* CC125 obteve maiores valores de produção, corroborando com os resultados da contagem de células, assim como pode ser observado no trabalho de WILLAMME et al. (2015).

A biomassa é composta principalmente de proteínas, carboidratos e lipídeos e a proporção dos mesmos pode variar conforme a espécie e as condições de cultivo utilizadas (VIGEOLAS et al., 2012).

As vias metabólicas de carbono e nitrogênio consomem a maior parte do carbono fotossintetizado da célula e dos recursos energéticos. O metabolismo do carbono e do nitrogênio estão ligados porque eles compartilham o carbono orgânico e a energia fornecida diretamente do transporte de elétrons na fotossíntese e a fixação de CO<sub>2</sub>, ou compartilham na respiração o carbono fixado via glicólise, o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. A integração

destes dois importantes processos metabólicos envolve uma extensa regulação entre as duas vias (HUPPE et al., 1994).

Considerando o metabolismo do N, os conteúdos de aminoácidos totais foram, de uma maneira geral, maiores para a cepa de *C. reinhardtii* CC125 quando comparada a cepa de *M. irregulare* BR023 (Figura 5B). Entretanto, como já descrito em outros estudos (MONTGOMERY et al., 2014), as quantidades de aminoácidos totais são muito menores em comparação com os outros metabolitos analisados neste estudo. De acordo com dados de WILLAMME et al. (2015), a reiniciação da síntese de proteínas após a divisão celular ocorre antes que a síntese de aminoácidos livres seja reiniciada. Células filhas poderiam, assim, encontrar, nos aminoácidos livres, um estoque útil para começar rapidamente novamente a síntese de proteínas. Do mesmo jeito em que a maior quantidade de aminoácidos livres antes da divisão celular pode ser explicado pela detenção de vias anabólicas em que estão envolvidas, isto é, principalmente, a síntese de proteínas, antes da divisão celular, permitindo seu acúmulo.

No presente estudo, verificou-se que os teores de proteína apresentaram uma tendência de diminuição com o aumento do teor de biomassa para ambas as cepas, sendo menores nas fases STA para as duas (Figura 5A). Tal fato se dá devido a elevadas taxas de crescimento contribuírem para o acúmulo destes compostos, em relação às células sob baixas taxas (BERMÚDEZ et al., 2004), como pode ser verificado ao se comparar os teores de proteínas na fase LOG das duas cepas em estudo (Figura 5Ai e 5Aii). A quantidade de proteína na biomassa após a extração de óleo para a produção de biodiesel é de grande interesse comercial, pois estas proteínas podem ser utilizadas na alimentação humana, e além de produtos nutracêuticos de valor comercial (SPOLAORE et al., 2006)

Assim como as proteínas e os aminoácidos os pigmentos são utilizados como reserva de N pela célula. A clorofila é um composto rico em N e facilmente acessível, que é utilizado para manter o crescimento celular e produção de biomassa, quando ocorre limitação de N no meio de cultivo (ÖRDÖG et al., 2011). No presente estudo foram observadas diferenças entre as duas cepas para a quantidade de clorofila a e b, bem como para as duas fases do cultivo. Para *C. reinhardtii* CC125 o conteúdo de Chl a diminuiu da fase LOG para a STA, enquanto que para Chl b os maiores valores obtidos foram na fase STA em relação a fase LOG. O mesmo comportamento de queda no teor de clorofila a da fase LOG para a STA foi observado na cepa de *M. irregulare* BR023.

A proporção de Chl a/Chl b não houve alteração significativa para nenhuma das cepas avaliadas.

Esses dados são consistentes com os verificados por (JUERGENS et al., 2015), que relatou uma interrupção na síntese de novo de clorofila logo após a deficiência de N. Essa interrupção juntamente com o crescimento contínuo verificado pelo aumento no crescimento celular além do aumento da biomassa, assim como visto no trabalho atual, é suficiente para explicar as grandes diminuições no conteúdo de clorofila ao longo do cultivo. Ainda segundo GEIDER et al. (1998) a degradação de Chl ocorre tanto para a remobilização de N (clorofila e proteínas associadas) quanto para reduzir o estresse luminoso. Trabalhos demonstraram ainda que, mutantes de *C. reinhardtii*, com complexo antena reduzido, gerados por supressão na síntese de clorofila b aumentam à penetração de luz no meio de cultura líquido, tornando mais eficiente a conversão de energia solar em biomassa, aumentando assim o rendimento dos mesmos (PERRINE et al., 2012; ROSENBERG et al., 2008).

O amido e o lipídeo são os principais compostos de reserva em algas verdes e constituem os dois maiores drenos de carbono em células com baixa taxa de divisão celular, e portanto, apresentam uma competição por este recurso (SIAUT et al., 2011). Quando o crescimento celular diminui a fotossíntese continua, mesmo que em taxas menores, e ocorre uma mudança no metabolismo, de modo que os fotoassimilados são armazenados em compostos de reserva garantindo a sobrevivência da alga em condições desfavoráveis (ÖRDÖG et al., 2011). Essas reservas celulares requerem muito gasto energético e a interação entre a biossíntese de ácidos graxos e carboidratos e sua regulação em microalgas têm sido investigados.

Quanto aos compostos de reserva, o maior teor de amido no presente estudo encontrado foi na cepa *C. reinhardtii* CC125. Essa cepa é amplamente reconhecida como organismo modelo para investigar várias funções biológicas incluindo metabolismo de amido, na qual frequentemente são encontrados altos teores de amido (SIAUT et al., 2011).

O amido é considerado o principal carboidrato de reserva em muitas algas e plantas, sendo que síntese deste carboidrato compartilha muitos precursores com a síntese de lipídeos, como os intermediários do ciclo de Calvin (gliceraldeído -3 fosfato, 3- fosfoglicerato). Muitas algas, especialmente as verdes, utilizam amido como composto de reserva e altas taxas de síntese de TAG ocorrem apenas quando a oferta de carbono excede a capacidade de síntese de amido ou na ausência de produção de

carboidratos de reserva (FAN et al., 2012). Portanto, que a disponibilidade de carbono é um fator chave que controla a síntese das reservas de óleo e o fluxo de carbono entre o amido e lipídios em *Chlamydomonas* (LI, Y. et al., 2010).

No presente trabalho observou-se que a cepa *C. reinhardtii* apresenta uma elevada capacidade de sintetizar e degradar o amido. O trabalho de RAL et al. (2006) mostrou que o metabolismo do amido está sob o controle do relógio circadiano em *C. reinhardtii*. As oscilações testemunhadas em *Chlamydomonas* são fortemente correlacionados com aquelas da AGPase. A análise da transcrição ou da abundância de proteína e de atividade enzimática sugere que o controle exercido pelo relógio circadiano pode ser ao nível da transcrição e não através da regulação redox, como em plantas superiores. Considerando que a atividade da AGPase explica a taxa observada de síntese de amido, outras atividades enzimáticas devem explicar as taxas de degradação. Por analogia com os recentes progressos feitos na compreensão da maior degradação do amido em folhas da planta, glucano água dicinase (GWDs) e  $\beta$ -amilases são candidatos óbvios para explicar as taxas observadas na degradação do amido (RITTE et al., 2002).

Curiosamente, GWDs e uma  $\beta$ -amilase plastidial recentemente têm sido postulado para ser regulada pelo controle redox em plantas (RAL et al., 2006), enquanto que a abundância de transcritos correspondente ao dessas enzimas foram demonstrados como estando sob o controle do relógio circadiano em *Arabidopsis thaliana* (LU, Y. et al., 2005). Em um desses estudos, por exemplo, demonstrou-se que a inativação da AGPase de um mutante que não produz amido em *Chlamydomonas* pode levar a um aumento de 10 vezes nos teores de TAGs (RECHT et al., 2014).

Já para os conteúdos de lipídeos, também foram observadas variações entre as cepas analisadas, em que a *M. irregulare* BR023 obteve valores mais elevados em relação a reserva de amido. Vários autores têm reportado variações nos teores de óleos de microalgas, dependendo da cepa e das condições de cultivo, com valores variando de 10 à 30 % da biomassa. Geralmente os teores de óleo são inversamente proporcionais a produção de biomassa devido ao alto custo metabólico da biossíntese de lipídeos (GRIFFITHS; HARRISON, 2009; RODOLFI et al., 2009). Estes resultados corroboram com os dados obtidos no presente estudo, pois a maior intensidade de fluorescência na quantificação de lipídeos foi encontrada para a cepa BR023, a qual apresentou menor produtividade de biomassa.

A cepa de *C. reinhardtii*, por outro lado, obteve valores mais elevados de amido em relação a reserva de lipídeo. De acordo com os resultados apresentados por (SIAUT et al., 2011), parece que *C. reinhardtii* pode usar lipídeos e amido como reserva, mas que existe uma diferença na mobilização destes dois tipos de reservas, como observado no presente estudo. A observação de que o acúmulo de amido, bem como a degradação apresenta uma taxa mais rápida do que o acúmulo e a degradação de TAG é consistente com a ideia de que amido e lipídeo em *C. reinhardtii* tem efeitos diferentes, sendo o amido de reserva preferencialmente sintetizados e mobilizado e o lipídeo representando um longo prazo de armazenamento em caso de escassez prolongada ou estresse.

As microalgas têm uma ampla gama de taxas de crescimento, dependendo da espécie e as condições de crescimento. Índices de produtividade de biomassa variam de 15-30 g de peso seco m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>. Em geral, há frequentemente um trade-off, no entanto, entre as taxas de divisão celular e o acúmulo de produtos de armazenamento de energia, incluindo carboidratos de armazenamento (como o amido e glicogênio) e TAGs (SUBRAMANIAN et al., 2013).

Em geral, no entanto, a energia necessária para a síntese de armazenamento de carboidratos é dominada pela energia necessária para a redução do carbono pelo Ciclo de Calvin-Benson. No total, a energia necessária para a síntese de amido é de 4,2 de ATP / carbono e 2 NADP + / lipídeo (SUBRAMANIAN et al., 2013). A biossíntese de lipídeos é um processo competitivo com a biossíntese de carboidratos (por exemplo, polissacarídeos, amido). Há evidências de que o deslocamento de fluxo de carbono a partir de carboidratos para a biossíntese de lipídeos em espécies de microalgas é possível. A demanda de energia para a biossíntese de lipídeos é muito mais elevada do que a de carboidratos (lipídeos tem um valor muito mais elevado de energia, cerca de 2,25 vezes). Lipídeos, portanto, podem servir como um armazenamento de energia e de carbono eficaz fornecendo uma reserva maior para a energia disponível, especialmente quando a luz é superior ao requisito para o crescimento (HE et al., 2015; LI, YANTAO et al., 2011; NORICI et al., 2011).

## 5 – CONCLUSÃO

De fato, foi verificado uma diferença entre o acúmulo de metabólitos nas diferentes fases para as duas cepas. Os teores dos metabólitos presentes (proteína, clorofila, aminoácidos totais e ácidos graxos) foram maiores em fase logarítmica em relação a fase estacionária.

Foi possível demonstrar que o teor de amido apresenta um perfil de acúmulo ao longo do dia para ambas as cepas, sendo que *C. reinhardtii* apresenta maior acúmulo quando comparada a cepa de *M. irregulare*, onde ambas as cepas apresentam um pico máximo no meio do dia. Esse acúmulo é maior na fase estacionária quando comparada a fase logarítmica, o que pode ser explicado com um maior investimento no crescimento da cepa quando em fase logarítmica.

Por meio da avaliação das taxas de síntese e degradação de amido, verificou-se ainda que a cepa *C. reinhardtii* tem uma maior capacidade de sintetizar e degradar esse composto quando comparada a *M. irregulare*.

Em relação ao teor de lipídeo, conclui-se que ocorre um maior acúmulo para a cepa de *M. irregulare* em relação a cepa de *C. reinhardtii*. Entretanto não verificou-se alteração no conteúdo ao longo do dia.

Foi possível observar uma relação dos compostos de reserva de ambas as cepas com a taxa de crescimento. *C. reinhardtii* obteve uma maior taxa de crescimento apresentando um maior teor de amido e *M. irregulare* com uma taxa de crescimento menor apresentou maior teor de lipídeo.



## 6 - REFERÊNCIAS

BALL, S. G.; MORELL, M. K. From bacterial glycogen to starch: Understanding the Biogenesis of the Plant Starch Granule. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 207-233, 2003.

BERMÚDEZ, J.; ROSALES, N.; LORETO, C.; BRICENO, B.; MORALES, E. Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine microalga *Chroomonas* sp. in semicontinuous cultures. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 20: 179 – 183, 2004.

BICUDO, C.E.M. e BICUDO, R.M.F. In: Bicudo, C.E.M. (Ed.). Algas de águas continentais brasileiras: Chave ilustrada para identificação de gêneros. São Paulo: Editora USP, 1970.

BRADFORD, M. M. **Anal. Biochem.** 12,248-254, 1976.

CALDANA, C.; LI, Y.; LEISSE, A.; ZHANG, Y.; BARTHOLOMAEUS, L.; FERNIE, A. R.; WILLMITZER, L.; GIAVALISCO, P. Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J**, v. 73, n. 6, p. 897-909, Mar 2013.

CHEN, W.; ZHANG, C.; SONG, L.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. **Journal of Microbiological Methods**, v. 77, n. 1, p. 41-47, 2009.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 5, p. 461-465, 2004.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, 2009.

COOKSEY K., GUCKERT J., WILLIAMS S., CALLIS P. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile red. **J Microbiol Meth** 6(6):333–345, 1987

FAN, J.; YAN, C.; ANDRE, C.; SHANKLIN, J.; SCHWENDER, J.; XU, C. Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Cell Physiol**, v. 53, n. 8, p. 1380-90, Aug 2012.

FERNIE A. R.; ROSCHER A.; RATCLIFFE R.G.; KRUGER N. J. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, 212: 250-263, 2001.

GARDNER, R.; PETERS, P.; PEYTON, B.; COOKSEY, K. E. Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 6, p. 1005-1016, 2010.

GEIDER, R.; MACINTYRE; GRAZIANO, L.; MCKAY, R. M. Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. **European Journal of Phycology**, v. 33, n. 4, p. 315-332, 1998.

GIBON, Y.; BLAESING, O. E.; HANNEMANN, J.; CARILLO, P.; HOHNE, M.; HENDRIKS, J. H.; PALACIOS, N.; CROSS, J.; SELBIG, J.; STITT, M. A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3304-25, Dec 2004.

GRIFFITHS, M. J.; GARCIN, C.; VAN HILLE, R. P.; HARRISON, S. T. L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 2, p. 119-123, 5// 2011.

GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 493-507, 2009.

GRUNDEL, M.; SCHEUNEMANN, R.; LOCKAU, W.; ZILLIGES, Y. Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 12, p. 3032-43, Dec 2012.

HARRIS, E.H. The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. **Academic Press**, San Diego, 780pp, 1989.

HE, Q.; YANG, H.; WU, L.; HU, C. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. **Bioresour Technol**, v. 191, p. 219-28, Sep 2015.

HICKS, G. R.; HIRONAKA, C. M.; DAUVILLEE, D.; FUNKE, R. P.; D'HULST, C.; WAFFENSCHMIDT, S.; BALL, S. G. When Simpler Is Better. Unicellular Green Algae for Discovering New Genes and Functions in Carbohydrate Metabolism. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1334-1338, 2001.

HOLBROOK, G. P.; DAVIDSON, Z.; TATARA, R. A.; ZIEMER, N. L.; ROSENTRATER, K. A.; SCOTT GRAYBURN, W. Use of the microalga *Monoraphidium* sp. grown in wastewater as a feedstock for biodiesel: Cultivation and fuel characteristics. **Applied Energy**, v. 131, p. 386-393, 2014.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant J**, v. 54, n. 4, p. 621-39, May 2008.

HUPPE, H. C.; TURPIN, D. H., Integration of carbon and nitrogen metabolism in algal cells. **Plant Physiol**. 45:577-607, 1994.

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, 11/1/ 2000.

JOHNSON, X.; ALRIC, J. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 6, p. 776-93, Jun 2013.

JUERGENS, M. T.; DESHPANDE, R. R.; LUCKER, B. F.; PARK, J. J.; WANG, H.; GARGOURI, M.; HOLGUIN, F. O.; DISBROW, B.; SCHAUB, T.; SKEPPER, J. N.; KRAMER, D. M.; GANG, D. R.; HICKS, L. M.; SHACHAR-HILL, Y. The regulation of photosynthetic structure and function during nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiol**, v. 167, n. 2, p. 558-73, Feb 2015.

KRISHNAN, A.; KUMARASWAMY, G. K.; VINYARD, D. J.; GU, H.; ANANYEV, G.; POSEWITZ, M. C.; DISMUKES, G. C. Metabolic and photosynthetic consequences of blocking starch biosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* sta6 mutant. **Plant J**, v. 81, n. 6, p. 947-60, Mar 2015.

LI, Y.; HAN, D.; HU, G.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnol Bioeng**, v. 107, n. 2, p. 258-68, Oct 1 2010.

LI, Y.; HAN, D.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 1, p. 123-129, 1// 2011.

LIU, J.; HUANG, J.; SUN, Z.; ZHONG, Y.; JIANG, Y.; CHEN, F. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 1, p. 106-10, Jan 2011.

LU, S.; WANG, J.; NIU, Y.; YANG, J.; ZHOU, J.; YUAN, Y. Metabolic profiling reveals growth related FAME productivity and quality of *Chlorella sorokiniana* with different inoculum sizes. **Biotechnol Bioeng**, v. 109, n. 7, p. 1651-62, Jul 2012.

LU, Y.; GEHAN, J. P.; SHARKEY, T. D. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. **Plant Physiol**, v. 138, n. 4, p. 2280-91, Aug 2005.

LV, J. M.; CHENG, L. H.; XU, X. H.; ZHANG, L.; CHEN, H. L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 17, p. 6797-804, Sep 2010.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 84, n. 2, p. 281-91, Aug 2009.

MICHIELSEN, M. J. F.; MEIJER, E. A.; WIJFFELS, R. H.; TRAMPER, J.; BEEFTINK, H. H. Kinetics of d-Malate Production by Permeabilized *Pseudomonas Pseudoalcaligenes*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 7, p. 621-628, 5/15/1998.

MILLER, R.; WU, G.; DESHPANDE, R. R.; VIELER, A.; GARTNER, K.; LI, X.; MOELLERING, E. R.; ZAUNER, S.; CORNISH, A. J.; LIU, B.; BULLARD, B.; SEARS, B. B.; KUO, M. H.; HEGG, E. L.; SHACHAR-HILL, Y.; SHIU, S. H.; BENNING, C. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. **Plant Physiol**, v. 154, n. 4, p. 1737-52, Dec 2010.

MITTAG, M.; KIAULEHN, S.; JOHNSON, C. H. The circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. What is it for? What is it similar to? **Plant Physiol**, v. 137, n. 2, p. 399-409, Feb 2005.

MIYAGAWA Y.; TAMOI M.; SHIGEOKA S. Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth. **Nature Biotechnol**. 19(10):965–969, 2001.

MOELLERING, E. R.; BENNING, C. RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 1, p. 97-106, Jan 2010.

MONTGOMERY, B. L. The Regulation of Light-Harvesting Impacts the Use of Cyanobacteria as Biotechnology Platforms. **Front Bioeng. Biotechnol**, v. 2, p. 22, 2014.

NORICI, A.; BAZZONI, A. M.; PUGNETTI, A.; RAVEN, J. A.; GIORDANO, M. Impact of irradiance on the C allocation in the coastal marine diatom *Skeletonema marinoi* Sarno and Zingone. **Plant Cell Environ**, v. 34, n. 10, p. 1666-77, Oct 2011.

ÖRDÖG, V.; STIRK, W. A.; BÁLINT, P.; VAN STADEN, J.; LOVÁSZ, C. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 907-914, 2011.

PARMAR, A.; SINGH, N. K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 22, p. 10163-72, Nov 2011.

PERRINE, Z.; NEGI, S.; SAYRE, R. T. Optimization of photosynthetic light energy utilization by microalgae. **Algal Research**, v. 1, n. 2, p. 134-142, 2012.

RAL, J. P.; COLLEONI, C.; WATTEBLED, F.; DAUVILLEE, D.; NEMPONT, C.; DESCHAMPS, P.; LI, Z.; MORELL, M. K.; CHIBBAR, R.; PURTON, S.; D'HULST, C.; BALL, S. G. Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiol**, v. 142, n. 1, p. 305-17, Sep 2006.

RAWSTHORNE, S. Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 2, p. 182-196, 3// 2002.

RECHT, L.; TOPFER, N.; BATUSHANSKY, A.; SIKRON, N.; GIBON, Y.; FAIT, A.; NIKOLOSKI, Z.; BOUSSIBA, S.; ZARKA, A. Metabolite profiling and integrative modeling reveal metabolic constraints for carbon partitioning under nitrogen starvation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **J Biol Chem**, v. 289, n. 44, p. 30387-403, Oct 31 2014.

RITTE, G.; LLOYD, J. R.; ECKERMANN, N.; ROTTMANN, A.; KOSSMANN, J.; STEUP, M. The starch-related R1 protein is an alpha -glucan, water dikinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 10, p. 7166-71, May 14 2002.

ROCHA, R. P. Caracterização metabólica, fisiológica e bioquímica de cepas de microalgas verdes. **Dissertação**, Universidade Federal de Viçosa, 2015.

RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnol Bioeng**, v. 102, n. 1, p. 100-12, Jan 1 2009.

ROSENBERG, J. N.; OYLER, G. A.; WILKINSON, L.; BETENBAUGH, M. J. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Curr Opin Biotechnol**, v. 19, n. 5, p. 430-6, Oct 2008.

SIAUT, M.; CUINE, S.; CAGNON, C.; FESSLER, B.; NGUYEN, M.; CARRIER, P.; BEYLY, A.; BEISSON, F.; TRIANTAPHYLIDES, C.; LI-BEISSON, Y.; PELTIER, G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnol**, v. 11, p. 7, 2011.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **J Biosci Bioeng**, v. 101, n. 2, p. 87-96, Feb 2006.

SUBRAMANIAN, S.; BARRY, A. N.; PIERIS, S.; SAYRE, R. T. Comparative energetics and kinetics of autotrophic lipid and starch metabolism in chlorophytic microalgae: implications for biomass and biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, 6:150, 2013.

SUN, J. D., OKITA, T. W. and EDWARDS, G. E. Modification of carbon partitioning, photosynthetic capacity, and O<sub>2</sub> sensitivity in arabidopsis plants with low ADP-glucose pyrophosphorylase activity. **Plant Physiol**, 119, (1), 267-276, 1999.

SZECOWKA, M.; HEISE, R.; TOHGE, T.; NUNES-NESE, A.; VOSLOH, D.; HUEGE, J.; FEIL, R.; LUNN, J.; NIKOLOSKI, Z.; STITT, M.; FERNIE, A. R.; ARRIVAUULT, S. Metabolic Fluxes in an Illuminated Arabidopsis Rosette. **The Plant Cell**, v. 25, n. 2, p. 694-714, 2013.

TORTORA, G; FUNKE, B; CASE, C. Microbiologia 6<sup>a</sup>. Ed. São Paulo Artmed, p. 154-171, 2003.

VIGEOLAS, H.; DUBY, F.; KAYMAK, E.; NIESSEN, G.; MOTTE, P.; FRANCK, F.; REMACLE, C. Isolation and partial characterization of mutants with elevated lipid content in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus*. **J Biotechnol**, v. 162, n. 1, p. 3-12, Nov 30 2012.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 9// 1994.

WESELAKE, R. J.; TAYLOR, D. C.; RAHMAN, M. H.; SHAH, S.; LAROCHE, A.; MCVETTY, P. B. E.; HARWOOD, J. L. Increasing the flow of carbon into seed oil. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 866-878, 11// 2009.

WILLAMME, R.; ALSAFRA, Z.; ARUMUGAM, R.; EPPE, G.; REMACLE, F.; LEVINE, R. D.; REMACLE, C. Metabolomic analysis of the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated under day/night conditions. **J Biotechnol**, May 2 2015.

WILLIAMS, P. J. L. B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, v. 3, n. 5, p. 554, 2010.