



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Caroline Schmitz

**Otimização do processo de biorrefinaria aplicado à microalga *Phaeodactylum*  
*tricornutum* utilizando metabolômica e biologia computacional**

Florianópolis

2022

Caroline Schmitz

**Otimização do processo de biorrefinaria aplicado à microalga *Phaeodactylum  
tricornutum* utilizando metabolômica e biologia computacional**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Marcelo Maraschin

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Schmitz, Caroline

Otimização do processo de biorrefinaria aplicado à microalga *Phaeodactylum tricornutum* utilizando metabolômica e biologia computacional / Caroline Schmitz ; orientador, Marcelo Maraschin, Dr. , 2022.

141 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Metabolômica. 3. Microalga. 4. Bioprocessos. 5. Engenharia metabólica. I. , Marcelo Maraschin, Dr.. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Caroline Schmitz

**Otimização do processo de biorrefinaria aplicado à microalga *Phaeodactylum tricornutum*  
utilizando metabolômica e biologia computacional**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado, em 04 de julho de 2022 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. José Bonomi-Barufi, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Profa. Cristine Vanz Borges, Dra.

Universidade Alto Vale do Rio do Peixe

Prof.(a) Melissa Fontes Landell, Dra.

Universidade Federal de Alagoas

Prof. Maurício Luis Sforca, Dr.

Laboratório Nacional de Biociências – CNPq

Prof. Rubens Tadeu Duarte, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Biotecnologia e Biociências.

Prof. Glauber Wagner

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Marcelo Maraschin, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2022

Dedico este trabalho a todos os apaixonados por ficologia como eu.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Marcelo Maraschin, por acreditar e confiar em mim. Agradeço de coração a amizade, conselhos e discussões que além de me ajudarem a concretizar esse grande sonho, também me formou uma pesquisadora melhor. Foi um privilégio poder ter seus conselhos no decorrer dos meus 7 anos de academia. Seus ensinamentos serão sempre levados comigo, e que a nossa parceria perdure por muitos anos mais. Obrigada por tudo.

As queridas amigas Aline Nunes e Deise Munaro, que foram meu porto seguro em diversas vezes durante a caminhada. Obrigada pela amizade, carinho e parceria.

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial, ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), o qual me acolheu durante toda a pós-graduação e onde sempre me senti em casa. Sou grata por tantas pessoas incríveis que este ambiente me presenteou. Em especial a grandes amigas e colegas que levarei sempre no coração, vocês são demais. Obrigada especial a Cláudia Bauer e Eva Regina que fizeram parte do meu dia a dia, alegrando esta jornada.

A todos os coautores que me auxiliaram na realização das análises e escrita de artigos com muito esmero e zelo. Sem a parceria de vocês este trabalho não seria possível. Em especial ao Dr. Maurício Sforca e Dra. Silvana Rocco do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio-CNPEM) pelo valioso auxílio nas análises de RMN e toda infraestrutura e suporte oferecidos para o desenvolvimento deste trabalho, além da amável recepção nas minhas estadias junto ao laboratório.

Ao Prof. Dr. José Bonomi-Barufi minha eterna gratidão por todos os aprendizados desde o início da minha caminhada científica, todos os seus ensinamentos foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À Capes, pelo auxílio financeiro sob forma de concessão de bolsa por meio do PPG de Biotecnologia e Biociências.

Aos professores do programa PPGBTC, quem me disponibilizaram um esclarecimento científico importantíssimo para trilhar novos caminhos, em especial ao Coordenador Prof. Dr. Glauber Wagner, que sempre se mostrou disponível durante minha passagem como aluna e representante discente.

Às minhas verdadeiras inspirações para sempre ser uma pessoa melhor, meus amados irmãos Alexandra, André e Luiz Felipe. Tudo que sou ou planejo ser só consigo pois sinto a força do amor de vocês que me alimenta.

E por fim, mas não com menor importância, ao meu amado companheiro de vida. Dhioser, tu és minha inspiração, alegria e porto seguro. Obrigada por ser meu maior incentivador, por aguentar meus momentos de angústia e sempre, de forma incondicional, estar ao meu lado. Sinto-me segura em cada passo que dou, pois sei que você sempre está ao meu lado me apoiando. Cada gota de suor deste trabalho é tua também. Obrigada pelo amor e parceria que tens me dado no decorrer destes anos. Te amo por ser exatamente quem tu és!

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less” (CURIE, M.)



## RESUMO

As microalgas são consideradas modelos biotecnológicos promissores à produção de compostos de alto valor econômico. Dentre as espécies promissoras, *Phaeodactylum tricornutum* tem se destacado, por sintetizar compostos como o ácido eicosapentenóico (EPA) e o carotenoide fucoxantina (FCX). Com isto em vista, este trabalho pretende criar subsídios para gerar hipóteses que permitam otimizar o processo de biorrefinaria aplicado à *P. tricornutum*, utilizando tecnologias ômicas e biologia computacional. Para tanto, o metabolismo daquela espécie foi investigado simultaneamente através de análises direcionadas, como as cromatografias líquida e gasosa, e não direcionadas, utilizando-se as espectroscopias de infravermelho médio (FTIR) e ressonância magnética nuclear. O objetivo desta estratégia de investigação foi descrever o metaboloma de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A, a fim de encontrar padrões de dados que forneçam informações relevantes à otimização da produção dos metabólitos de interesse. O Capítulo I consiste em uma revisão de literatura do estado da arte da área de engenharia metabólica aplicada à biorrefinaria da espécie. No capítulo II foram testadas 5 metodologias de extração de ácidos graxos de interesse, i.e., Bligh e Dyer, com e sem processamentos físicos, Folch e Stanley e Selstam e Ölquist, sendo a metodologia de Bligh e Dyer a mais efetiva e prática. No capítulo III, com o auxílio de análises metabolômicas, foi avaliada a estabilidade da molécula de FCX sob determinadas condições de armazenamento, de modo a fornecer evidências sobre o seu comportamento molecular para assim estabelecer os melhores protocolos visando a qualidade das análises. No capítulo IV, com o auxílio de tecnologias ômicas, foi possível melhor compreender o metabolismo da espécie, a fim de traçar estratégias de cultivo *in vitro* à otimização da biossíntese de EPA e FCX. Buscou-se também identificar vias metabólicas potenciais para serem inibidas, a fim de aumentar a síntese dos compostos de interesse. Os resultados revelaram máximos conteúdos de EPA e FCX no 4º dia de cultivo e, dentre as vias metabólicas a inibir, o ciclo do glioxilato, da alanina e do piruvato mostraram-se mais promissores à otimização da biossíntese e acúmulo daqueles compostos. Por fim, o capítulo V apresenta os resultados de estratégias de modulação metabólica descritas no capítulo IV, de modo a aumentar os teores dos compostos de interesse. Os cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A, suplementados com cloreto de magnésio, quercetina e oxalato de amônio demonstraram grande potencial ao incremento da biossíntese e acúmulo de EPA e FCX, sendo sugerida sua avaliação em sistemas de cultivo em biorreatores de grande escala.

**Palavras-chave:** Ciências ômicas; bioprocessos; ômega-3; carotenoides; biocompostos.

## ABSTRACT

Microalgae are considered promising biotechnological models for the production of compounds of high economic value. Among the promising species, *Phaeodactylum tricornutum* has stood out, synthesizing compounds such as eicosapentaenoic acid and the carotenoid fucoxanthin (FCX). With this in mind, this work intends to create subsidies and generate hypotheses that allow optimizing the biorefinery process applied to *P. tricornutum*, using omics technologies and computational biology. Therefore, the metabolism of that species was investigated simultaneously through directed analyses, such as liquid and gas chromatography, and undirected analysis, using mid-infrared (FTIR) and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The objective of this investigation strategy was to describe the metabolome of the species of interest and to find data patterns that provide information relevant to the optimization of the production of the metabolites of interest. Chapter I consists of a literature review of the state of the art in the area of metabolic engineering applied to the biorefinery of the species. In chapter II, 5 methods of extracting fatty acids of interest were tested, i.e., Bligh and Dyer, with and without physical processing, Folch and Stanley and Selstam and Ölquist, with the Bligh and Dyer methodology being the most effective and practical. In chapter III, with the help of metabolomics analyses, the stability of the FCX molecule under certain storage conditions was evaluated, to provide evidence of its molecular behavior to establish the best processes aiming at the quality of the analyses. In chapter IV, with the help of omics technologies, it was possible to better understand the metabolism of the species and to outline in vitro culture strategies to optimize the biosynthesis of EPA and FCX. We also sought to identify potential metabolic pathways to be inhibited to increase the synthesis of compounds of interest. The results revealed maximum EPA and FCX contents on the 4th day of cultivation and, among the metabolic pathways to be inhibited, the glyoxylate, alanine, and pyruvate cycles were the most promising for optimizing the biosynthesis and accumulation of these compounds. Finally, in chapter V some of the strategies generated in chapter IV are applied, to increase the levels of the compounds of interest. The *P. tricornutum* cell cultures supplemented with magnesium chloride, quercetin, and ammonium oxalate showed great potential to increase the biosynthesis and accumulation of EPA and FCX, being suggested for its evaluation in cultivation systems in large-scale bioreactors.

**Keywords:** Omic's sciences; microalgae bioprocesses; omega-3; carotenoids; biocompounds.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

### CAPÍTULO II

**Figure 1** – Total lipids content in *P. tricornutum* CCAP 1052/1A in four different extraction protocols using filtration. Gravimetric yields (as a /g lipids / 100 mg mass and percentage of dry algal biomass) of total lipids extracted values are represented as mean  $\pm$  standard error. Different letters indicate significant differences among protocols (One-way ANOVA, post hoc Tukey test where  $P < 0.05$ ). UAE= Ultrasonic-assisted Extraction.

**Figure 2** – Fucoxanthin contents in the two phases in three different extraction protocols from *P. tricornutum* CCAP 1052/1A. Values (mg/g and percentage of dry algal biomass) are represented of three independent ( $n = 3$ ) extraction by liquid chromatography analysis (UHPLC).

### CAPÍTULO III

**Figure 1** – Workflow of the main stages of the study. Four different biomass and methanolic extract storage protocols were investigated for fucoxanthin concentration and stability.

**Figure 2** – Distribution of FCX content data (mg/g) during the storage of algae biomass and its methanolic extract at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$ . The mixed linear model constructed (in black) indicates a wide range of detected values for the variable under study. The model represents the distribution of the response variable (fucoxanthin) by species and storage form (legend) in relation to the continuous variable time (day) for *P. tricornutum*.

### CAPÍTULO IV

**Figura 1** – Conteúdo de FCX (fucoxantina) (mg/g) em biomassa de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A ao 18º dia de cultivo *in vitro*, em meio de cultura f/2. A linha cinza representa a contagem média de células durante o cultivo. Os valores representam a média de três amostras independentes. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os dias (ANOVA de uma via, teste *post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Figura 2** – Conteúdo de EPA (ácido eicosapentenoico) (mg/g) em biomassa de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A ao 10º dia de cultivo *in vitro*, em meio de cultura f/2. A linha cinza representa a contagem média de células durante o cultivo. Os valores representam a média de três amostras independentes.

**Figura 3** – Perfis espectrais de absorvâncias de FTIR ( $\lambda = 800 - 3100\text{cm}^{-1}$ ) de amostras de biomassas de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A ao 18º dia de cultivo. Seis bandas (A, B, C, D, E e F) foram identificadas como de maior interesse, segundo suas ligações de absorção. Estas ligações estão identificadas na parte superior da figura.

**Figura 4** – Representação percentual das classes de metabólitos identificados em células de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A segundo KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), utilizando as 51 vias metabólicas identificadas por  $^1\text{H}$ -RMN.

**Figura 5** – Análise de vias metabólicas (MetPA), conforme gerado por algoritmo da plataforma MetaboAnalyst. A distribuição mostra os resultados para o conjunto de dados de metabólitos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A, determinados via ressonância magnética nuclear. Todas as vias metabólicas correspondentes são exibidas como círculos. A cor de cada círculo é baseada em valores de p (cores mais escuras indicam mudanças mais significativas de metabólitos na via correspondente), enquanto o tamanho do círculo corresponde ao escore de impacto da via. As vias metabólicas mais impactadas com altos escores de significância estatística foram destacadas.

**Figura 6** – Representação da interconecção das vias metabólicas de ácidos graxos e fucoxantina com as vias sugeridas à inibição pelos estudos ômicos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A. As vias sinalizadas com X representam as inibições a serem testadas *in silico* e *in vitro*.

**Figura 7** – Via do glioxilato com as enzimas (retângulos) e metabólitos (círculos) correspondentes. As enzimas específicas que estão em destaque em vermelho correspondem a isocitrato liase (E.C. 4.1.3.1) e malato sintase (E.C. 2.3.3.9). Linhas contínuas são reações diretas e linhas pontilhadas representam diversas reações de vias associadas.

**Figura 8** – Metabolismo do piruvato com as enzimas (retângulos) e metabólitos (círculos) correspondentes. As enzimas específicas com destaque em vermelho correspondem à 2-etilmalato sintase (E.C. 2.3.3.6), 2-isopropilmalato sintase (E.C. 2.3.3.13), homocitrato sintase

(E.C. 2.3.3.14), acetil-CoA C-acetiltransferase (E.C. 2.3.1.9) e glutamato desidrogenase (E.C. 4.1.3.). Linhas contínuas são reações diretas e linhas pontilhadas representam diversas reações de vias associadas.

## CAPÍTULO V

**Figura 1** – Cultivos *in vitro* de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A no 5º dia de cultivo após a adição dos inibidores enzimáticos. O número representa a identificação (ID) segundo Tabela 2.

**Figura 2** – Valores de produtividade (g/L por dia) dos cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A calculados pela razão de biomassa em relação ao produto do volume *vs* tempo.

**Figura 3** – Biomassa total (g/L, barras cinzas) e teor de lipídios totais (%) de cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A. Os valores de rendimento relativos à biomassa da extração são apresentados em linha cinza tracejada, enquanto o rendimento total de lipídios por cultivo é indicado em linha preta, com os valores em destaque. Eixo y representa o total de lipídios em porcentagem (%) e g/L quando considerada as barras cinzas.

**Figura 4** – Conteúdo de fucoxantina (mg/g BS) em células de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A ao 6º dia de cultivo em meio de cultura f/2, com adição dos inibidores enzimáticos no 5º dia. Os valores representam a média de duas amostras independentes. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os dias (ANOVA, teste post hoc de Tukey, onde  $p < 0,05$ ). Dados referentes a duas bateladas e, portanto, o controle 1 é relacionado ao cloreto de magnésio, sulfato de amônio e nitrato de cobalto. Por sua vez, o controle 2 relaciona-se aos dados de cultivos a sua direita, i.e., quercetina e oxalato de amônio em suas duas concentrações.

**Figura 5** – Rendimentos (mg/L) dos cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A em relação à biossíntese de EPA e FCX ao 6º dia de cultivo, em meio de cultura f/2, com a adição dos inibidores enzimáticos ao 5º dia.

**Figura 6** – Rendimentos (mg/g) de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A em relação à biossíntese de EPA e FCX no 7º dia de cultivo em meio de cultura f/2, com adição de mix de inibidores enzimáticos, i.e., quercetina e cloreto de magnésio, ao 5º e 6º dia.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Table 1** – System biology and metabolic engineering strategies applied to *P. tricornutum* for production of compounds with high commercial value.

### CAPÍTULO II

**Table 1** – Fatty acid composition in the lipid fraction recovered from *P. tricornutum* according to the five extraction protocols studied. Values (%) are presented as mean of two readings of pooled sample of three independent extraction by gas chromatography analysis. Different letters indicate significances among protocols (One-way ANOVA, followed by the *post hoc* Newman Keuls test,  $p < 0.005$ ).

**Table 2** – Selectivity of extraction of saturated fatty acids from *P. tricornutum* biomass. Values (%) are represented as mean of two readings of pooled samples of three independent extraction, as measured by gas chromatography analysis.

### CAPÍTULO III

**Table 1** – Fucoxanthin contents (mg FCX/g dry weight of biomass) determined by high performance liquid chromatography (UHPLC) in lyophilized *P. tricornutum* biomass and its methanolic extract. Four different storage procedures were followed as described in the Material and Methods section. In bold, values where significant responses were found ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's post-hoc test.

**Table 2** – Linear mixed fit model: fucoxanthin range quantified from samples ( $n = 120$ ) of biomass and storage of frozen methanolic extracts at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$  of the microalgae *P. tricornutum*. Two variables were used in the model (day and storage method). In bold, values where significant responses were found ( $p < 0.05$ ).

**Table 3** – Retention times to monitor the conversion of fully trans fucoxanthin to its cis conformation during 1, 7, 21, 28 and 60 days of storage by UHPLC-UV-vis. Fucoxanthin was

extracted from *P. tricornutum* biomass following the protocols described in the Material and Methods section and summarized in Figure 1.

## CAPÍTULO IV

**Tabela 1** – Composição dos ácidos graxos majoritários na fração lipídica recuperada de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A a cada dois dias num total de 10 dias de cultivo in vitro. Os valores (%) são apresentados como média de duas leituras da amostra combinada de três extrações independentes por análise de cromatografia em fase gasosa.

**Tabela 2** – Análise de teste *t student* pareado entre as bandas *fingerprint* e suas taxas em relação ao tempo de cultivo de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A determinadas via espectroscopia de infravermelho médio. Foram consideradas seis bandas seguindo os seguintes comprimentos de onda, onde A (carboidratos) = 1064-880  $\text{cm}^{-1}$ , B (fosfomoléculas) = 1350-1190  $\text{cm}^{-1}$ , C (proteínas) = 1575-1480  $\text{cm}^{-1}$ , D (proteínas) = 1705-1575  $\text{cm}^{-1}$ , E (lipídios) = 1780-1708  $\text{cm}^{-1}$  e F (lipídios) = 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas foram submetidas a soma destes intervalos e posteriormente calculadas a razão entre estas bandas onde os resultados serão nomeados de taxas. Valores em negrito foram considerados significativos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3** – Metabólitos identificados por  $^1\text{H}$ -RMN em extratos metanólicos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram analisados utilizando a plataforma Bayesyl. Os valores de pontuação de confiança indicam, numa escala de zero a 10, a probabilidade do analito identificado no espectro ser o composto propriamente dito.

**Tabela 4** – Vias metabólicas identificadas através da análise de topologia aplicada ao conjunto de metabólitos identificados via  $^1\text{H}$ -RMN, utilizando-se algoritmo da plataforma MetaboAnalyst. O algoritmo realiza uma comparação entre os compostos identificados nos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN em relação àqueles do organismo de referência (*Chlorella variabilis*) disponibilizados em <https://www.genome.jp/kegg/> - KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

## CAPÍTULO V

**Tabela 1** – Enzimas apontadas pelos estudos metabolômicos de biologia de sistemas como estratégicas para modulação, visando redirecionar o fluxo metabólico em *P. tricornutum* CCAP 1052/1A à produção de EPA e FCX.

**Tabela 2** – Inibidores enzimáticos escolhidos para estudos nos cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A, com suas respectivas enzimas alvo e a rota metabólica a qual pertencem as enzimas.

**Tabela 3** – Perfil de ácidos graxos insaturados e somatório de ácidos graxos saturados (SAT), insaturados (INSAT) monossaturados (MUFAS) e poli-insaturados (PUFAS) de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A em cultivo de 6 dias, com a adição de inibidores enzimáticos no 5º dia. Os valores (%) são apresentados como média de duas leituras da amostra de dois cultivos independentes por análise de cromatografia em fase gasosa (FID).

**Tabela 4** – Percentual de EPA nos cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A com a adição dos inibidores enzimáticos. Em negrito são destacados os resultados sem diferença estatística em relação ao controle teste-t pareado, com ajuste de método *Bonferroni* ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5** – Efeito dos principais inibidores enzimáticos no conteúdo de EPA e de FCX, em relação à produção de biomassa seca (mg/g BS), rendimento por litro de cultivo (mg/L), produtividade total de biomassa ao 6º dia (g./L) e rendimento final dos compostos alvo por litro de cultivo.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RMN	Ressonância magnética nuclear
FTIR	Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FCX	Fucoxantina
EFMs	Modos elementares de fluxo
$\omega$ -3	Omega 3
AGs	Ácidos graxos
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência
GC	Cromatografia gasosa
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
TCA	Ciclo dos ácidos tricarbóxicos
MUFAs	Ácidos graxos monoinsaturados
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
BD	Método de Bligh e Dyer
FLS	Método de Folch, Lee e Stanley
SÖ	Método de Selstam e Öquist
FBA	Análise de balanço de fluxo metabólico
TAG	Triacilglicerol

## SUMÁRIO

1.1 INTRODUÇÃO.....	18
REFERÊNCIAS .....	23
1.2 OBJETIVOS.....	26
METABOLIC ENGINEERING APPROACH FOR OPTIMIZATION OF MICROALGAE BIOREFINERY USING <i>PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM</i> AS MODEL ORGANISM <sup>1</sup> .....	28
1.1 INTRODUCTION.....	28
1.2 METABOLIC ENGINEERING STRATEGIES APPLIED TO <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	31
1.3 CASE STUDY: GENERATING AND APPLYING METABOLIC ENGINEERING STRATEGIES TO <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	42
REFERENCES.....	47
COMPARISON OF FIVE METHODS FOR LIPID EXTRACTION FROM THE <i>PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM</i> MICROALGA AND DETERMINATION OF FUcoxANTHIN AND FATTY ACIDS PROFILES <sup>2</sup> .....	57
1.1 INTRODUCTION.....	57
1.2 MATERIAL AND METHODS.....	60
1.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	62
1.4 CONCLUSION .....	68
REFERENCES.....	69
STABILITY OF THE FUcoxANTHIN MOLECULE FROM THE MICROALGAE <i>PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM</i> STORED IN BIOMASS AND METHANOLIC EXTRACT.....	72
1.1 INTRODUCTION.....	73
1.2 MATERIAL AND METHODS.....	74
1.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	76
1.4 CONCLUSION .....	79
REFERENCES.....	80
PERFIL METABÓLICO DINÂMICO DE <i>PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM</i> CCAP 1052/1A COM ÊNFASE NA BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS E FUcoxANTINA EM CULTIVOS IN VITRO: SUBSÍDIOS À ENGENHARIA METABÓLICA.....	83
1.1 INTRODUÇÃO.....	84
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	86
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	89
1.4 CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS .....	110

ENGENHARIA METABÓLICA APLICADA À BIORREFINARIA DE <i>PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM</i> .....	113
1.1 INTRODUÇÃO.....	113
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	114
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	118
1.4 CONCLUSÃO.....	132
CONCLUSÕES FINAIS .....	134
REFERÊNCIAS .....	136

## 1.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos é possível constatar uma busca pelo desenvolvimento de sistemas sustentáveis de produção e consumo que supram os desafios de uma sociedade que sofre com problemas ambientais como as mudanças climáticas e a escassez de recursos naturais. A ideia de uma economia baseada em biomassa, com produção otimizada, redução de perdas e do impacto ao ambiente representa uma mudança significativa no sistema socioeconômico vigente. Essa mudança pode vir associada à projeção e desenvolvimento de uma bioeconomia, onde os elementos básicos para materiais, produtos químicos e energia são derivados de recursos biológicos renováveis, como fontes vegetais e animais (MCCORMICK; KAUTTO, 2013). O grande desafio se dá ao conseguir aumentar a escala de produtividade, também cumprindo as metas de sustentabilidade.

Com o desenvolvimento da biotecnologia observou-se um aumento no conhecimento e na experiência técnica e prática no uso de sistemas e processos biológicos, antes pensados apenas nos estudos da ciência da vida (OCDE, 2009). A área da biotecnologia é extremamente ampla e abrange diversas subáreas, dependendo do tipo de organismo utilizado, sendo uma delas, a biotecnologia azul. Este termo é utilizado para descrever as aplicações voltadas à biodiversidade marinha e aquática visando o desenvolvimento de novos produtos e, conseqüentemente, gerando inovação ao processo produtivo vigente (EUROPABIO, 2011; OCDE, 2009).

Neste trabalho, o enfoque será na biotecnologia azul, acreditando que quando as pesquisas com produtos naturais se voltarem mais intensamente ao mar, um novo incremento de descobertas surgirá. Com este enfoque, temos as microalgas que são consideradas uma plataforma promissora à produção de compostos com alto valor econômico. O cultivo destes organismos apresenta benefícios, como a possibilidade de aumento de suas taxas metabólicas à produção de biomassa, a existência de diversas espécies com perfis bioquímicos diversos, as perspectivas de sequestro de dióxido de carbono e, principalmente, o monopólio limitado ou quase absoluto da perspectiva das modalidades e logística de produção de alimentos (PENG et al., 2018). No entanto, para que estes cultivos sejam viáveis economicamente, se faz necessário reduzir os custos de produção e aumentar a produção e os rendimentos de cultivos, pois tais fatores têm forte impacto no crescimento e no potencial competitivo de sistemas de produção de microalgas.

Microalgas são organismos celulares fotossintetizantes amplamente distribuídos nos ecossistemas aquáticos, apresentando uma complexa diversidade metabólica entre as suas espécies e destacando-se como matrizes bioquímicas ricas em compostos bioativos (DESBOIS et al., 2008; MILIĆEVIĆ et al., 2014). No entanto, apesar do alto valor econômico de alguns compostos acumulados pelas microalgas, sua comercialização encontra problemas técnicos. Embora o cultivo de microalgas demande condições simples (i.e., controle de temperatura, nutrientes e uma fonte de luz), o processo ainda não é, em muitos casos, economicamente viável (TREDICI et al., 2015), a menos que compostos de alto valor econômico presentes nas células microalgais sejam explorados simultaneamente (CARRIJO et al., 2015).

Biorrefinarias são prioridades estreitamente relacionadas à bioeconomia. Embora não sejam um conceito totalmente novo (DE-JONG; LANGEVELD; VAN REE, 2013), é um campo jovem, no qual pesquisas e o desenvolvimento ainda estão em estágio inicial e isso se reflete na busca por uma definição apropriada (PECK et al., 2009). Neste trabalho, a extração de mais de um composto da biomassa algal em estudo enquadra-se no conceito de biorrefinaria, o qual vem crescendo em seu reconhecimento como um sistema considerado financeiramente e ambientalmente sustentável. De fato, utilizando-se o conceito de biorrefinaria, uma quantidade relativamente maior de classes de compostos é extraída, tornando os cultivos mais rentáveis. Sendo assim, reconhece-se como conceito de biorrefinaria os processos que usam de forma eficiente e flexível biomassas e tecnologias inovadoras, visando bioprodutos sustentáveis que as valorizem financeiramente e ambientalmente (FERREIRA, 2017). Os processos de biorrefinaria de microalgas atuais buscam utilizar a biomassa algal por completo, de modo a possibilitar a geração de mais de um produto ou, como no caso desta pesquisa, mais de um composto proveniente da mesma matéria-prima (SIDDIKI et al., 2022).

Para o desenvolvimento de processos biotecnológicos que se alinhem ao conceito de biorrefinaria voltada a microalgas, é necessário um conhecimento a respeito da matriz bioquímica de interesse e de como metabólitos oscilam na célula microalgal durante o período de cultivo. Para tanto, os estudos de metabolômica alinhados à biologia de sistemas são considerados ferramentas que auxiliam na elucidação de potenciais alvos metabólicos à otimização da biossíntese e acúmulo de compostos alvos. Com o uso destas ferramentas surgem novas possibilidades de otimização de processos biotecnológicos, permitindo uma descrição mais abrangente do metabolismo microalgal e sua regulação.

O estudo do metaboloma se dá pela análise qualitativa e quantitativa de todos os metabólitos celulares de baixo peso molecular ( $< 1000$  Da) (BUNDY et al., 2009), os quais oscilam de acordo com as condições fisiológicas do organismo e dos fatores ambientais.

Considerando a variedade de metabólitos celulares, as análises são usualmente realizadas utilizando plataformas analíticas constituídas por técnicas não seletivas, sendo as mais frequentes a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas, acopladas ou não a técnicas cromatográficas (XU et al., 2015). Como exemplos deste cenário, estudos utilizando a RMN na determinação do metaboloma de espécies de microalgas têm sido realizados para compreender as oscilações do metabolismo celular e até mesmo para encontrar biomarcadores em doenças complexas, fornecendo melhor compreensão destas (HE et al., 2012; ZHANG et al., 2014; 2015). De fato, a metabolômica assume uma posição especial entre as disciplinas ômicas na abordagem *top-down*, pois o metaboloma representa o ponto final dos processos biológicos, carregando marcas de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (ROSATO et al., 2018). Desta forma, reconhece-se que a metabolômica tem uma vantagem sobre as outras abordagens ômicas no que tange aos estudos sobre metabolismo. O conjunto de metabólitos celulares constitui um fenótipo bioquímico, o qual oscila de acordo com a transcrição gênica e estímulos ambientais. A análise do perfil e fluxo de metabólitos é realizada por meio de uma reconstrução em nível de biologia de sistemas, a fim de se ter uma visão mais abrangente, possibilitando assim criar estratégias de produção de um determinado metabólito de interesse biotecnológico (ORTH et al., 2010). As tecnologias metabolômicas possibilitam uma visão quali/quantitativa abrangente das moléculas de uma determinada célula, tecido ou organismo, de maneira não direcionada e não tendenciosa.

O aspecto básico desta abordagem metabolômica é que um sistema complexo pode ser entendido mais completamente se considerado como um todo, levando em consideração informações a respeito dos metabólitos (HORGAN; KENNY, 2011). Estes estudos amplos do metaboloma utilizando biologia de sistemas diferem dos estudos tradicionais, amplamente orientados por hipóteses ou contextos reducionistas. Os experimentos em biologia de sistemas geram hipóteses, usando abordagens holísticas onde *a priori* hipóteses não são conhecidas ou prescritas, mas todos os dados adquiridos são analisados e utilizados à definição de uma hipótese experimental (WESTERHOFF; PALSSON, 2004). Preferencialmente, opta-se por soluções que se supõe terem influência na produção dos compostos de interesse para a otimização do processo de biorrefinaria.

As informações obtidas neste tipo de estudo são de fundamental importância à otimização de sistemas biotecnológicos de produção de metabólitos com valor de mercado elevado, porque subsidiam o desenho de modelos de explorações industriais mais eficazes, nas quais a produtividade é maximizada pela manipulação de condições de cultivo sem a necessidade de engenharia genética. Assim, possibilita-se o desenvolvimento de estratégias

otimizadas à produção de biocompostos em maior concentração e em grande escala com menores dispêndios de tempo e recursos, comparativamente às abordagens tradicionalmente utilizadas na indústria da biotecnologia.

Dentre as espécies de microalgas marinhas consideradas promissoras à síntese de compostos com alto valor biotecnológico, *Phaeodactylum tricornerutum* tem se destacado como modelo. Esta espécie apresenta vantagens para o uso biotecnológico, tais como o genoma sequenciado (BOWLER et al., 2008), o cultivo em escala comercial (BENAVIDES et al., 2013) e biomassa com alto teor de lipídios (BELLOU et al., 2014). Atualmente, existem somente duas diatomáceas com o genoma sequenciado, a espécie *Thalassiosira pseudonana* e o organismo modelo em estudo, *P. tricornerutum*. O genoma de *P. tricornerutum* possui aproximadamente 27,4 megabases (Mb) de tamanho, servindo como um sistema modelo a investigações genéticas e bioquímicas (BOWLER et al., 2008). A espécie, de morfologia penada, é amplamente reconhecida como uma espécie marinha, porém já foi registrada sua ocorrência em um lago em Wisconsin, demonstrando a sua plasticidade metabólica (GUIRY; GUIRY, 2017). Esta ampla distribuição demonstra como a espécie está entre as microalgas mais produtivas e ambientalmente flexíveis nos oceanos contemporâneos.

Considerando o conceito de biorrefinaria, que visa o maior uso possível da biomassa produzida por uma determinada espécie, *P. tricornerutum* tem um potencial biotecnológico elevado, sintetizando compostos de alto valor comercial, como os ácidos graxos, fucoxantina e crisolaminarina (GAO et al., 2017). A classe de compostos bioquímicos que possui maior potencial para uso no processo de biorrefinaria é a lipídica, pela sua alta concentração de ácidos graxos insaturados e dos compostos carotenoides que possuem alto valor comercial. *P. tricornerutum* apresenta conteúdos apreciáveis de ácido eicosapentenoico (EPA), pertencente à classe dos ácidos ômega-3 ( $\omega$ -3), um composto nutracêutico e com aplicações na indústria de alimentos (BOROWITZKA; MOHEIMANI, 2013). De interesse, ressalta-se que o rendimento potencial anual de *P. tricornerutum* cultivada em ambiente externo sem controle e em fotobiorreatores é de 730 kg de EPA por hectare, sob condições de nutrição adequada, o que demonstra todo o seu potencial biotecnológico industrial (RODOLFI et al., 2017).

Outros compostos de alto valor econômico presentes em *P. tricornerutum* são os pigmentos, em específico a fucoxantina (FCX), um carotenoide do grupo das xantofilas encontrado somente em algas, com função associada à fotoproteção do fotossistema II. A FCX vem sendo estudada por suas propriedades antioxidantes e seu efeito mitigador do estresse oxidativo, com importantes reflexos sobre patofisiologias como o câncer e processos inflamatórios (MIYASHITA et al., 2011; MURADIAN et al., 2015). A espécie *P. tricornerutum*

tem sido apontada na literatura como potencial fonte na produção deste carotenoide (KIM et al., 2012), alcançando concentrações de até 15 mg/g de biomassa (peso seco), sob certas condições de crescimento (SACHINDRA et al., 2007).

A biossíntese de EPA e FCX sofre influências das condições de cultivo as quais células estão expostas. O efeito de indutores da síntese destes compostos pode gerar ganhos significativos no rendimento, sendo uma das estratégias utilizadas para microalgas a engenharia metabólica. O uso de indutores da biossíntese de compostos alvo, associada ao conceito de biorrefinaria, pode contribuir à redução dos custos de produção, viabilizando o cultivo de microalgas em escala comercial.

A publicação da sequência do genoma completo de *P. tricornutum* em 2008 possibilitou a ampliação de informações para explorar ferramentas de bioinformática que permitam uma maior compreensão do metaboloma da espécie. Alguns trabalhos na área de engenharia metabólica têm sido publicados utilizando modelos metabólicos de *P. tricornutum* e uma revisão abrangente é discutida no capítulo 1 deste manuscrito.

Diante do exposto, este trabalho pretende gerar subsídios e hipóteses à otimização do processo de biorrefinaria aplicado à *P. tricornutum*, utilizando abordagens metabolômicas e biologia computacional de estudo. O objetivo desta estratégia é encontrar padrões de dados que forneçam informações biológicas úteis na otimização do cultivo da espécie voltado à biorrefinaria, i.e., incremento da produção dos compostos de interesse. Sendo assim, as vias de maior impacto no metabolismo não associadas à biossíntese de EPA e FCX serão identificadas pelos estudos metabolômicos e computacionais, a fim de serem suprimidas para que um fluxo maior de carbono seja direcionado ao anabolismo dos metabólitos de interesse comercial.

Sendo assim, a tese está estruturada em cinco capítulos, os quais são compostos por artigos publicados e/ou submetidos a periódicos científicos internacionais que buscam a otimização do processo de biorrefinaria da espécie *P. tricornutum*. Os três primeiros capítulos se encontram publicados e/ou submetidos, portanto, para seguir as normas editoriais, são apresentados na íntegra e na língua de origem da publicação, i.e., língua inglesa. O capítulo III é apresentado de forma parcial, pois o artigo submetido testa 4 espécies diferentes, porém, com o objetivo de alinhar com a temática da tese, serão apresentados apenas os dados referentes a *P. tricornutum*. Os dois últimos capítulos ainda não foram submetidos a periódicos da área, optando-se então pela sua versão em português de modo a facilitar as suas futuras submissões. O primeiro capítulo foi publicado como capítulo de livro e trata de uma revisão bibliográfica referente às informações sobre o estado da arte da aplicação de biologia de sistemas e as estratégias de engenharia metabólica voltadas à *P. tricornutum*. O segundo e o terceiro capítulos



são relacionados a estudos metodológicos voltados às moléculas de interesse. O capítulo II testou a eficácia de cinco protocolos para extração de lipídios, ácidos graxos (AG) e carotenoides para a espécie, fornecendo informações relevantes sobre os protocolos mais eficientes. O capítulo III realiza o teste de estabilidade da molécula de FCX, descrevendo as condições de extração metanólica daquele pigmento da biomassa microalgal, seguido do armazenamento sob condições de baixa temperatura, i.e., -20°C e -80°C, gerando contribuições a protocolos de controle de qualidade daquele pigmento ao longo do armazenamento. O capítulo IV visa criar subsídios para otimizar o processo de biorrefinaria aplicado a *P. tricornutum* utilizando a metabolômica e a biologia computacional. Para tanto, foram realizadas análises direcionadas (cromatografia líquida e gasosa) e não direcionadas à elucidação do metaboloma microalgal (espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e ressonância magnética nuclear de prótons), ao longo das etapas de cultivo. O objetivo foi descrever o perfil metabólico de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A e suas alterações durante o cultivo celular e, assim, traçar estratégias para otimizar o processo de biorrefinaria. Por fim, no capítulo V, a partir das informações geradas no capítulo IV, foram testadas estratégias de engenharia metabólica de modo a otimizar o processo de biorrefinaria da microalga. Para tanto, foi realizada uma busca de potenciais inibidores das vias indicadas e aplicados no cultivo, de modo a validar as estratégias geradas a partir dos estudos de biologia de sistemas. Por fim, uma conclusão geral é apresentada e completa a tese.

## REFERÊNCIAS

- ALIPANAH, L. et al. Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 20, p. 6281–6296, 2015.
- ALLEN, A. E.; VARDI, A.; BOWLER, C. An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 264–273, 2006.
- BAUER, C. M. In silico predictions for fucoxanthin production by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: **International Conference on Practical Applications of Computational Biology & Bioinformatics**. Springer, p. 139–148, 2018.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 1, p. 911–917, 1959.
- BLOOM, A. J.; SUKRAPANNA, S. S.; WARNER, R. L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, v. 99, n. 4, p. 1294–1301, 1992.
- BOWLER, C. et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 239–244, 2008.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365–372, 2000.

EL-SHEEKH, M. M. et al. Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzschia perminuta*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, n. 3, p. 159–166, 2003.

GORAIN, P. et al. Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. **Environmental Technology**, v. 34, n. 13–16, p. 1887–1894, 2013.

GUILLARD, R. R. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. **Culture of Marine Invertebrate Animals**. Springer, 1975.

HORVATÍĆ, J.; PERŠIĆ, V. The effect of Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> on the growth rate of marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin: microplate growth inhibition test. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, n. 5, p. 494–498, 2007.

JAGADEVAN, S. et al. Recent developments in synthetic biology and metabolic engineering in microalgae towards biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–21, 2018.

JOHNSON, M. K.; LOO, G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 459, n. 3, p. 211–218, 2000.

LEVITAN, O. et al. Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 2, p. 412–417, 2015.

LI, S. et al. Impact of arabinoxylan on characteristics, stability and lipid oxidation of oil-in-water emulsions: Arabinoxylan from wheat bran, corn bran, rice bran, and rye bran. **Food Chemistry**, v. 358, p. 1–12, 2021.

LUSTIGMAN, B.; LEE, L. H.; WEISS-MAGASIC, C. Effects of cobalt and pH on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, n. 1, p. 65–72, 1995.

MCGINN, P. J.; MOREL, F. M. M. Expression and inhibition of the carboxylating and decarboxylating enzymes in the photosynthetic C<sub>4</sub> pathway of marine diatoms. **Plant Physiology**, v. 146, n. 1, p. 300–309, 2008.

MIDDLETON, E., Jr; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673–751, 2000.

O'FALLON, J. V. et al. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 1511–1521, 2007.

OBATA, T.; FERNIE, A. R.; NUNES-NESE, A. The central carbon and energy metabolism of marine diatoms. **Metabolites**, p. 325–346, 2013.

- OSBORN, H. L.; HOOK, S. E. Using transcriptomic profiles in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* to identify and prioritize stressors. **Aquatic Toxicology**, v. 138–139, p. 12–25, 2013.
- REES, T. A.; BEKHEET, I. A. The role of nickel in urea assimilation by algae. **Planta**, v. 156, n. 5, p. 385–387, 1982.
- REMMERS, I. M. et al. Orchestration of transcriptome, proteome and metabolome in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* during nitrogen limitation. **Algal Research**, v. 35, p. 33–49, 2018.
- RODOLFI, L. et al. Oil and eicosapentaenoic acid production by the diatom *Phaeodactylum tricorutum* cultivated outdoors in Green Wall Panel (GWP®) reactors: Oil and EPA by *P. tricorutum* Outdoors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2204–2210, 2017.
- RODRIGUES, N. Influence of spike lavender (*Lavandula latifolia* Med.) essential oil in the quality, stability and composition of soybean oil during microwave heating. **Food and Chemical Toxicology**. p. 2894–2901, 2012.
- SCHOMBURG, I.; CHANG, A.; SCHOMBURG, D. BRENDA, enzyme data and metabolic information. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 47-49, 2002.
- SILVA, D. A.; EDSON, L. Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. **FEBS Letters**, p. 405–408, 1998.
- TAKAHAMA, U. Hydrogen peroxide-dependent oxidation of flavonols by intact spinach chloroplasts. **Plant Physiology**, v. 74, n. 4, p. 852–855, 1984.
- ZANG, X. et al. Quercetin nanoformulations: a promising strategy for tumor therapy. **Food & Function**, v. 12, n. 15, p. 6664–6681, 2021.

## 1.2 OBJETIVOS

### Objetivos gerais

Otimização do processo de biorrefinaria de *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1052/1A utilizando tecnologias metabolômicas e ferramentas computacionais.

### Objetivos específicos

#### Capítulo I.

- Elaborar uma revisão bibliográfica referente às informações sobre o estado da arte das estratégias de engenharia metabólica voltadas à *P. tricornutum*.

#### Capítulo II.

- Testar protocolos de extração de ácidos graxos e fucoxantina para a espécie *P. tricornutum* visando maior eficiência nos protocolos de extração.

- Adaptar protocolo de extração de lipídios e fucoxantina para *P. tricornutum* CCAP 1052/1A.

#### Capítulo III.

- Testar estabilidade da molécula de fucoxantina quando armazenada em biomassa e em extrato metanólico para a espécie *P. tricornutum*.

#### Capítulo IV.

- Estabelecer os melhores parâmetros para o cultivo da cepa de *P. tricornutum* CCAP/1052 visando a produção de ácido eicosapentenoico (EPA) e fucoxantina (FCX);

- Descrever o perfil metabolômico dos cultivos microalgais utilizando técnicas espectroscópicas e cromatográficas;

- Identificar relações, mecanismos e vias metabólicas relevantes a partir de dados metabolômicos, a fim de identificar nestas últimas análises alvos de estudos de engenharia metabólica.

- Investigar como as vias metabólicas são alteradas em suas expressões ao longo do tempo de cultivo, utilizando da análise de super-representação de vias.

- Gerar hipóteses de supressão de vias metabólicas objetivando o incremento da biossíntese de EPA e FCX, com base nos dados ômicos.

**Capítulo V.**

- Validar as estratégias aplicadas à otimização da biorrefinaria de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A, caracterizando a alteração do perfil metabolômico.

## - CAPÍTULO I -

# METABOLIC ENGINEERING APPROACH FOR OPTIMIZATION OF MICROALGAE BIOREFINERY USING *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* AS MODEL ORGANISM<sup>1</sup>

### Abstract

In the search for raw materials from renewable sources, microalgae cultivation systems have characteristics suitable for the bioeconomy area, such as having a biochemical matrix with multiproducts of high economic value and a high rate of biomass growth. However, despite the potential of microalgae, their production currently is not economically viable unless a set of compounds is obtained simultaneously following a biorefinery concept. The advantages of using microalgae biorefinery and its integration with the economy make it an important target in the development of processes optimized for industrial purposes, since it uses a profitable and sustainable approach that makes the most of the potential of biomass as source of bioactives. Despite the numerous advantages of using the biorefinery process, research on metabolic engineering applied to model species is still scarce. In this chapter, the main approaches in systems biology and genetic engineering applied to the microalgae *P. tricornutum* are reviewed, aiming at to clarify the state of the art of searching for strains that produce multiple compounds of economic interest. Finally, to find targets for metabolic modulation, computational tools such as *in silico* metabolic models and metabolic analysis with machine learning will be presented, comparing the resulting solutions, and discussing the methodological advantages and disadvantages of each experimental approach.

### 1.1 INTRODUCTION

Modern society faces the problem of an increasing demand for consumption and production that affects the environment and is one of the main intensifiers of climate change and the scarcity of natural resources. The development of processes aligned with the circular bioeconomy, attentive to social, economic and environmental issues, has sought to meet this current need (UBANDO; FELIX; CHEN, 2020).

---

<sup>1</sup>This chapter was published in the book **The Future of Metabolic Engineering**. SCHMITZ, C. et al. Metabolic engineering approach for optimization of microalgae biorefinery using *Phaeodactylum tricornutum* as model organism. In *The Future of Metabolic Engineering*, Nova Science Publishers, v. 1, p.151-196, 2022.

Circular economy seeks to provide sustainable alternatives to the current economic model where biomass has its production optimized to reduce losses and its impact on the environment. In this context, microalga species stands out as alternative sources of biomasses with superior benefits when compared to terrestrial organisms. For example, the possibility of increasing their metabolic rate and biomass production, the existence of several biochemical profiles with high concentrations of commercial biomolecules, the prospect of bio-sequestration of carbon dioxide and photosynthetic efficiency, besides not creating competition for food crops lands that can be grown in degraded environments (CHEW et al., 2017).

Microalgae are photosynthetic organisms widely distributed in aquatic ecosystems developing a complex metabolic diversity among their species, standing out for having a biochemical matrix rich in bioactive compounds (MILICEVIC et al., 2014, DESBOIS et al., 2008), such as antimicrobial, antioxidant and stimulant of plant growth and development. The increase interest in works related to microalgae as sources of biochemical and pharmaceutical products relies on the diversity of their bioactive compounds such as carbohydrates, proteins, polyphenols, phlorotannins, pigments, unsaturated fat acids, and sterols (VENTURA et al., 2017). However, despite the high economic value of some compounds accumulated by microalgae, their commercialization faces technical problems. Although the cultivation of microalgae requires simple conditions (i.e., temperature control, nutrients, and a light source), the process is still not economically sustainable (TREDICI et al., 2015), unless multiple compounds of high economic value present in the cell's microalgae are explored simultaneously in a biorefinery process (CARRIJO et al., 2015).

The concept of biorefinery has been closely linked to the bioeconomy and has priorities also related to it. Although the concept of biorefinery is not new, research and development in microalgae biorefinery are still in the early stages (DE JONG; LANGEVELD; VAN REE, 2013; PECK et al., 2009). This might be noted in the search for an appropriate definition. The simultaneous acquisition of multiple alga's biomass compounds is related to the concept of biorefinery and is intended as a system considered financially and environmentally sustainable. Although the term biorefinery is associated with the crude oil refineries which rely on obtaining energy through the oxidation of carbon chains, microalga biorefineries involve differentiated technologies aiming to explore complex organic compounds derived from the metabolic functions of these microorganisms, e. g., proteins, carbohydrates, lipids, and pigments (SCHIANO-DI-VISCONTE et al., 2019). In fact, using the concept of biorefinery, a relatively larger number of classes of compounds has been extracted from microalgae, making their exploitation on large-scale cultivation systems more profitable. Thus, for the development of

biotechnological processes that align with the concept of biorefinery, it is necessary to have knowledge about the biochemical matrix of microalga species, i.e., their metabolomes, and how their metabolites oscillate under certain environmental conditions and over the cell cultivation.

On the other hand, the knowledge on microalga metabolism is the basis for the development and application of metabolic engineering tools that could help improving biotechnological processes for obtaining high commercial value bioproducts thereof. Nowadays, a complete and accurate mapping of microalgae' metabolic pathways is far from being elucidated considering its complexity due to the dependence on external conditions and variations in the genotypes that occur even among species. In this way, metabolic engineering not only makes use of the already established routes of metabolism, but also contributes to fill in gaps through predictions based on computational mathematics and experimental data, which may be validated in later experiments. Bioinformatics tools are fundamental for the optimization of biotechnological systems to produce metabolites with high market value since they can save time, costs and *in vitro* experiments through predictions returned by *in silico* models. The results afforded can be doubly advantageous since the *in-silico* model itself is biochemically validated in the laboratory and can be improved by the results obtained and used in future works involving the species and related problems.

Metabolic engineering techniques have become increasingly useful to improve the yield and productivity of microalga biorefineries, through the integration of knowledge and applications in the areas of systems, evolutionary and synthetic biology, rationally optimizing cellular performance. The biosynthesis of target compounds is highly influenced by the culture conditions to which cells are exposed and by inducing the synthesis of such compounds one can generate significant gains in yield of microalga cell cultures. Indeed, the use of compounds that stimulate certain desired physiological responses in the biorefinery concept can also mitigate expenses, making it possible to grow microalgae on a commercial scale.

In view of the metabolic engineering applied to microalgae biorefinery, the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is widely used as a biological model. This marine species has advantages for biotechnological uses such as its sequenced genome (BOWLER et al., 2008), potential for commercial-scale cultivation (BENAVIDES et al., 2013), and biomass with a high content of compounds with high economic value (BELLOU et al., 2014). These characteristics are highly appreciated when looking for a model organism to optimize production processes. The biorefinery concept seeks at maximum the use of the biomass produced by a given species, and *P. tricornutum* has a great potential to synthesize various compounds of high value for the society such as fatty acids, fucoxanthin, and chrysolaminarin (GAO et al., 2017). The



publication of the complete *P. triornutum*'s genome sequence in 2008 made possible to expand information to explore bioinformatics tools that combine the information already available, enabling a greater understanding of the metabolome response. *P. triornutum*'s genome is approximately 27.4 megabases (Mb) in size, serving as a model system for genetic and biochemical investigations. Additionally, the methodologies used and validated for the species can later be applied to other diatoms or even adapted to organisms of different taxonomic classifications.

Metabolic engineering has played an important role in the development of strategies to increase the biosynthesis of multiple compounds by a single strain, modulating the metabolism to drive metabolic flows to target compounds. To create and apply these strategies it is essential to know how the target compound oscillate, and this understanding is currently facilitated using metabolomics and computational tools, which help to elucidate metabolic profiles on a systems biology base. The development of machine learning tools and the increase of software dedicated to open access databases have driven the ways of finding targets for metabolic engineering applied to the optimization of biological production processes. Within this scope, this review brings a synthesis of the metabolic engineering strategies applied to the production of interest molecules by cells that can be applied to microalgae biorefinery systems. At first, a brief introduction of the metabolic engineering strategies targeted to the biosynthesis and accumulation of interest molecules by microalgae biorefinery process will be given, using *Phaeodactylum triornutum* microalga as a study model. Subsequently, two ways to find potential pathways to modulate the metabolic flow to increase the biosynthesis of the economically valuable eicosapentaenoic acid (EPA) and fucoxanthin will be explored. Finally, to find targets for metabolic modulation, computational tools such as in silico metabolic models and metabolomic analysis with machine learning will be presented, following the comparison of the resulting solutions, and discussing the methodological advantages and disadvantages of each experimental approach.

## 1.2 METABOLIC ENGINEERING STRATEGIES APPLIED TO *Phaeodactylum triornutum*

Despite the potential for producing compounds by the species *P. triornutum*, the area of metabolic engineering in microalgae is still underdeveloped when compared to other groups of organisms. However, it has been growing with advances in the molecular area such as genome sequencing and editing, understanding of the cell's biochemical and the selection of

mutant strains (FU et al., 2019). To develop strategies for optimizing the biorefinery process it is useful to develop research in two stages. At first, seeking to understand the cellular system as a whole and thus finding bottlenecks that will be targeted for optimization, and, in a second approach, to optimize strategies to guide the metabolic flow of the system to increase biosynthesis of the target compounds (HUANG; DAUBOUSSI, 2017).

The application of systems biology using approaches known as omics (e.g., metabolomics, transcriptomics, genomics, and fluxomics) has been growing since the publication of microalgae species genomes, allowing a more comprehensive description of the metabolism of microalgae and its regulation. Omics sciences are suitable tools for elucidating potential targets for metabolic engineering when seeking to optimize the production of compounds. Experiments in systems biology use holistic approaches where no hypothesis is previously known or prescribed, but all data is acquired usually through high-throughput experiments coupled with quantitative and modeling analysis, to provide an insight into the processes that contribute to the organization and cell dynamics (WESTERHOFF; PALSSON, 2004, HUANG; DAUBOUSSI, 2017). Genetic engineering techniques opened possibilities to redesign the system to improve the metabolic potential of cells (FU et al., 2019).

*P. tricornutum* is one of the most suitable models in the context of industrial production of compounds of commercial interest when aimed at biorefineries, as it has a considerable number of studies related to the metabolism of xanthophylls, lipids, and carbohydrates (Table 1). Engineering strategies to improve the production process are proving effective for this species. There is a tendency to apply metabolic engineering in the central carbon flow metabolism and further directing it to the routes of interest using nuclease addition methodologies such as TALE and CRISPR/Cas9 or carrying out gene knock-out techniques (FU et al., 2019).

The simplest way to produce a compound is to dedicate the cultivation conditions to an increase in biomass production, i.e., knowing that a given organism naturally produces a compound of interest, cultivation conditions directed to increased biomass production lead to obtain greater amounts of such a compound. For this purpose, the selection of high producing strains can also be applied. Bioprospecting to identify strains with desirable characteristics can be done in oceans, ponds, rivers and other aquatic reservoirs, laboratories. Additionally, random chemical mutagenesis experiments can also be performed before a screening process to select the modified strains with the desirable phenotype, i.e., improved biosynthesis and accumulation rates of a biotechnologically relevant compound (SCHIANO-DI-VISCONTE et al., 2019).

**Table 1** – System biology and metabolic engineering strategies applied to *Phaeodactylum tricornutum* for production of compounds with high commercial value.

Strategy	Methods	Target	Author
systems biology	genome-scale metabolic network	carbohydrates	Kroth et al., 2008
	genome-scale metabolic network	genes and metabolites	Kim et al., 2016
	genome-scale metabolic network	lipids and GPR associations	Levering et al., 2016
	proteomics and genomics	lipid in dark stress	Bai et al., 2016
	proteomics and genomics	gene annotation	Yang et al., 2018
	genomics	gene annotation	Rastogi et al., 2018
	genomics, fluxomics and metabolomics	protein and lipid	Guerra et al., 2013
	fluxomics (FBA)	fucoxanthin	Bauer et al., 2019
	fluxomics (FBA)	TAGs and nitrogen starvation	Levitan et al., 2015
	proteomics	TAGs and nitrogen starvation	Bai et al., 2016
	proteomics	TAGs and nitrogen starvation	Longworth et al., 2016
	proteomics	TAGs and nitrogen starvation	Ge et al., 2014
	transcriptomics, proteomics and metabolomics	TAGs and nitrogen starvation	Remmers et al., 2018
	transcriptomic and metabolomic	cell response to nitrogen deprivation	Alipanah et al., 2015
mutagenesis	UVC radiation	carotenoids	Yi et al. 2015
	chemical (EMS and NTG)	carotenoids	Yi et al. 2018
genetic engineering	FCP A gene promoter	chlorophyll a/c and fucoxanthin	Watanabe et al., 2018
	Vde, Vdr and Zep3 overexpressed	carotenoids	Manfello et al., 2020
	CrGES expressed	geraniol	George et al., 2020
	AtLUS and LjLUS expressed	lupeol, betulin and betulinic acid	D'adamo et al., 2019
	EF2 and luciferase gene	luciferase protein	Seo et al., 2015
	G6PDH overexpressed and antisense knockdown	lipids and growth rate	Wu et al., 2019
	PtPEPC1 overexpressed	biomass	Seo et al., 2018
	PtPTP overexpressed	biomass and lipids	Seo et al., 2020
	phosphoenolpyruvate carboxykinase knockdown	lipids	Yang et al., 2016
	DGAT2D overexpressed	lipids	Dinamarca et al., 2017
	DGAT2 and GPAT overexpressed	lipids	Zou et al., 2018
	PtME and PtD5b overexpressed	neutral lipid	Zou et al., 2019
	DGAT2 overexpressed	neutral lipid and PUFAs	Niu et al., 2013
	DGAT2B overexpressed	PUFAs	Haslam et al., 2020
	MCAT and D5b coordinated expressed	PUFAs	Wang et al., 2017
	ptTES1 disruption	TAGs	Hao et al., 2018
	UGP2 disruption	TAGs	Daboussi et al., 2014
	ptTES1 disruption	TAGs	Hao et al., 2018
	PtWS/DGAT overexpressed	TAGs	Cui et al., 2018
	GPAT1 and LPAT1 overexpressed	TAGs	Wang et al., 2018
	GPAT2 overexpressed	TAGs	Wang et al., 2020
	AGPAT1 overexpressed	TAGs and EPA	Balamurugan et al., 2017
	ER<DELTA>6FAD overexpressed	EPA	Zhu et al., 2017
	LPAAT overexpressed	EPA	Li et al., 2020
	DGAT2B expressed	EPA and DHA	Sayanova et al., 2020
	OtElo5, AppA, and PhyA expressed	EPA, DHA and recombinant phytase	Pudney et al., 2019
	OtElo5 expressed	DHA	Hamilton et al., 2014

Mutagenesis and selection of mutants are effective approaches to optimize the performance of strains aimed at the industry. This approach has been widely used because it allows a random approach without requiring prior knowledge of the biosynthetic pathways. This randomness in the production of mutants results in an expressive number of phenotypes, which can become a problem for effective selection of transformed ones. In the context of microalga species, high-yield methodologies based on fluorescence and flow cytometry techniques have been applied for screening strains with superior carotenoid biosynthesis (MENDOZA et al., 2008). This approach was applied to *P. tricornutum* cells to select photo-oxidative stress-driven mutated strains that produce more carotenoids (YI et al., 2015; YI et al., 2018). The authors induced chemically about one thousand mutants and using flow cytometry it was possible to select five strains that showed an increase in 33% of the carotenoid concentration compared to the wild type (YI et al. 2018). The method of flow cytometry in microalga strains enabled the phenotypic analysis of a high number of mutant genotypes and proved to be effective in reducing time and increasing efficiency in selection. As this technique uses fluorescence, it has been currently applied in the investigations of compounds like carotenoids and other pigments in microalga species.

### 1.2.1 Genetic engineering technologies

To increase the production of compounds of interest, genetic engineering techniques might have adopted in a first approach. However, the diploid genome of *P. tricornutum* and the lack of information about its sexual life are limitations to classical genetic approaches based on random insertion and mutagenesis, because it is very unlikely to obtain the inactivation of the two alleles of a gene simultaneously (HUANG; DABOUSSI, 2017; DABOUSSI et al., 2020). This fact, coupled with the need to link genes and physiological processes, has guided studies in diatoms to use reverse genetic engineering such as RNAi (RNA interference) and the targeted genome engineering technique DSB (double-strand DNA break), repair mechanisms with the site-specific nucleases MNs (meganucleases), TALENs (transcription activator-like effector nucleases), and CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced palindromic sequences/Cas9) (HUANG; DABOUSSI, 2017). Unlike traditional random mutation, targeted genome engineering techniques permit gene editing at known sites in the genome. In this field CRISPR-Cas9 is a technology based on the immune system of prokaryotes and has revolutionized the genetic engineering of several organisms, especially eukaryotes, for its simplicity and, since it

allows simple engineering and site-specific activity when compared to conventional genetic tools (CHAE et al., 2017).

Diatoms can be genetically transformed at the level of nucleus, chloroplasts, and mitochondria, since its genome is contained in these compartments. Despite the lack of a proper transformation toolbox, the species *P. tricornutum* already has a genetic toolbox with very diverse elements of promoters and terminators, selectable markers to identify transformed cells, and tools to ensure the stability of the inserted vectors.

*Lhcf* (light harvesting complex) promoters, also called *fcp* (fucoxanthin chlorophyll a/c binding protein) and NR (nitrate reductase) are among the promoters used for *P. tricornutum* engineering. *Lhcf* promoters are efficiently used in *P. tricornutum* but are light dependent, which becomes an obstacle when it is necessary to express genes in dark conditions. NR promoter functions as an inducible promoter that can switch on and off transgene expressions and have been widely used in diatoms (HUANG; DABOUSSI, 2017). Several other promoters have been designed for *P. tricornutum* engineering, e.g., *EF2* (elongation factor 2) (SEO et al., 2015), PtAPase (alkaline phosphatase) (LIN et al., 2017), V-ATPase C (vacuolar ATP synthase 16-kDa proteolipid subunit) (WATANABE et al., 2018), Pt211 (ZOU et al., 2018), *HASPI* (highly abundant secreted protein 1) (ERDENE-OCHIR et al., 2019), and the iron responsive promoters *Isi1* (iron starvation induced protein1), *FBP1* (ferrichrome binding protein1) and *Fld* (flavodoxin) (YOSHINAGA et al., 2014).

Selectable markers to identify *P. tricornutum* transformed strains include zeocin antibiotic resistance (APT et al., 1996), nourseothricin (ZASLAVSKAYA et al., 2001), and blasticidin-S (BUCK et al., 2018). Methods for gene delivery in *P. tricornutum* include particle bombardment or biolistic (APT et al., 1996, FALCIATORE et al., 1999), conjugation (KARAS et al., 2015), and electroporation (NIU et al., 2012, ZHANG; HU, 2014, XIE et al., 2014).

RNAi has been used in *P. tricornutum* species for, e.g., knockdown expression and activity of NR (nitrate reductase) in order to obtain enhanced lipid biosynthesis (LEVITAN et al., 2015), identification of uridine-5'-monophosphate synthase gene (SAKAGUCHI et al., 2011), knockdown of phosphoenolpyruvate carboxykinase for lipid biosynthesis (YANG et al., 2016), identification and localization of carbonic anhydrase in thylakoids (KIKUTANI et al., 2016), knockdown of a gene encoding lipid droplet associated protein to examine its function (WANG et al., 2017), and overexpression and knockdown of PGRL1 (proton gradient regulation 5-like photosynthetic phenotype 1) for investigation of its role in photosynthesis (ZHOU et al., 2020), among others. In their turn, MNs, TALENs, and CRISPR/Cas9 have been used in *P. tricornutum* engineering to enhance TAG (triacylglycerol) production (DABOUSSI

et al., 2014, HAO et al., 2018), photosynthesis mechanisms (MANN et al., 2017, BUCK et al., 2019), multiple simultaneously gene knock-outs (SERIF et al., 2018), and CRISPR/Cas9 application and optimization for this species (NYMARK et al., 2016, STUKENBERG et al., 2018, RUSSO et al., 2018, SLATTERY et al., 2018, SHARMA et al., 2018, MADHURI et al., 2019).

Importantly, for engineered strains of microalgae it is relevant to highlight that a series of precautions must be taken not only to guarantee food security, for instance, but also the strain must be proven environmentally safe. Besides, a series of precautions must be taken to prevent these strains from leaking into the environment. Similarly, there are considerable bottlenecks in designing engineered strains as, for instance, antibiotic resistance, a widely used selection marker, should be substituted as soon as possible in the protocols to avoid possible consequences of antibiotic resistance.

### **1.2.2 Genome-scale metabolic reconstruction and flux balance analysis (FBA)**

A genome-scale metabolic network reconstruction is a collection of genomes encoded metabolic functions based on the genome annotation of the target organism and biochemical databases considering hypothetical data and experimental evidence (THIELE; PALSSON, 2010). Enzyme commission (E.C.) numbers, KEGG, and BRENDA databases are important sources to the identification of gene products for the metabolic models.

Genomic engineering through genome mapping and gene expression, silencing and deletion, enabled the development and application of metabolic engineering shedding light on the metabolism of organisms. The nuclear genome of diatoms contains genes of bacterial origins and genes originated of the secondary endosymbiosis (ALLEN et al., 2011). The genome sequencing of *P. tricornutum* (BOWLER et al., 2008) made it possible to develop and make use of various genome-scale computational models and genetic engineering tools bringing up several characteristics about the metabolism of this species, some putative and others not. For example, the presence of an ornithine-urea cycle in diatoms (ALLEN et al., 2011), the prokaryotic Entner-Doudoroff glycolytic and phosphoketolase pathways (FABRIS et al., 2012), and C4-like photosynthesis (KROTH et al., 2008).

A genome-scale metabolic network reconstruction is, however, subjected to missing, wrong or incomplete annotations and needs to be manually refined along its development (THIELE; PALSSON, 2010). Enzymes listed in the biochemical databases are mostly not specific to an organism and may not be present in the target organism (THIELE; PALSSON,

2010). Compartmentalization may also differ between organisms and transport reactions are needed for metabolite transport between membranes. For example, *Chlamydomonas reinhardtii*, a green alga, stores carbohydrates in the plastids while *P. tricornutum* accumulate them in vacuoles (GRUBER; KROTH, 2017). Membrane transport systems are more complex systems because they involve different transport mechanisms requiring further studies, and therefore less experimental data is available. In this sense, the annotation of the genome and consequently the genome-scale metabolic model of a given species assumes a dynamic process, being refined as long as new data and tools are obtained for the species. To be more precise, genome-scale metabolic models need to constantly integrate missing metabolic functions, signaling, transport and network, and update incorrect annotations. Novel annotations for *P. tricornutum* genome were made over the last years (YANG et al., 2018, RASTOGI et al., 2018), providing novel information for this species like revised genes and identification of novel genes and proteins.

Fluxomics is an important area in metabolic engineering as one aim at obtaining biotechnological products, since it is capable of making predictions of the flow of metabolites. An important *in silico* investigation tool obtained due to genome-scale metabolic network reconstruction is FBA (flux balance analysis) which avows simulations and optimizations of desired phenotypes. This tool allows the analysis of the flow of metabolites once it contains all known metabolic reactions and genes that encode each enzyme for an organism, thus making it possible to predict the growth rate of an organism or the rate of production of a certain metabolite of biotechnological interest (ORTH et al., 2010). Constraint-based algorithms are constructed to predict intracellular fluxes in wild-types and genetically modified strains by gene knockout and amplification. MOMA (minimization of metabolic adjustment) and OptKnock are two popular algorithms to identify gene knockout targets and they have been widely used to enhance production of various chemicals in microorganism strains (CHAE et al., 2017).

Two important genome-scale metabolic models for *P. tricornutum* were published and made available (KIM et al., 2016, LEVERING et al., 2016). Among other features, these models predicted intracellular fluxes under autotrophic, mixotrophic, and heterotrophic growth conditions (KIM et al., 2016), as well as a full range of metabolic reactions for the lipid metabolism and GPR (gene protein reaction) associations (LEVERING et al., 2016). As wild-type strains of *P. tricornutum* are not capable of growing on organic carbon sources, mixotrophic and heterotrophic modeling are especially useful for transformed lines phenotype simulations. Information provided about gene-protein-reaction (GPR) associations enables phenotype simulations at gene and enzyme levels.

### 1.2.3 Biotechnological potential for high value compounds production and biorefinery process

Potential biotechnological compounds naturally produced by *P. tricornutum* strains are fatty acids like PUFAs (EPA, DPA, DHA), pigments (carotenoids), its siliceous cell walls known as frustules, proteins, carbohydrates, and sterols (brassicasterol and campesterol) (FABRIS et al., 2014, JARAMILLO-MADRID et al., 2020). MUFAs and PUFAs gained attention due to their potential application to biofuels and source of omega-3-rich oil for human health, respectively (CUI et al., 2019). Among the pigments produced by this microalga, fucoxanthin has gained prominence because its important biological functions reported in countless works, e.g., antitumor (HOSOKAWA et al., 1999), anti-diabetic and anti-obesity (MAEDA et al., 2007), anti-inflammatory and antioxidant (SHIRATORI et al., 2005, PANGESTUTI et al., 2011, D'ORAZIO et al., 2012, XIA et al., 2013). Defatted biomass of *P. tricornutum* is also a potential source of high-value protein (CUI et al., 2019), which can constitute a valuable residue in the biorefinery concept. Diatom cell walls, namely the frustules, have potential applications in nanotechnology due to the high quality of its structure that has not yet been achieved by our technology and can be useful as nanometric filters among other potential applications on a nanometric scale (SAADE; BOWLER, 2009). In addition, other studies have shown the possibilities of producing other important biotechnological products by modified strains of *P. tricornutum*, like the monoterpene geraniol (FABRIS et al., 2020, GEORGE et al., 2020) and the triterpenoids lupeol and betulin (D'ADAMO et al., 2019).

As, at first, microalgae proved to be good producers of omega-3 fatty acids and carotenoids, metabolic engineering tools have been developed for the synthesis of these metabolites in *P. tricornutum*, in addition to microalgae biofuels which have been in fact driven the studies concerning biorefinery processes applied to microalgae. In the case of *P. tricornutum*, the great majority of works applying metabolic engineering has been focused on PUFAs for their high economic value, as well as on neutral lipids for biofuel production.

Due to the accumulation of PUFAs with high commercial value, most studies to date seek to increase the synthesis of lipids by overexpressing key lipogenic genes (Table 1) in *P. tricornutum* strains. The most studied genes to date are glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) and diacylglycerol acyltransferase (DGAT), which are involved in the triacylglycerol biosynthesis. DGATs genes encode a key transmembrane protein that has an enzymatic function. This protein is essential for lipid metabolism, as it catalyzes the terminal and unique step involved in the synthesis of triacylglycerol using diacylglycerol and fatty acyl-CoA as



substrates. The GPAT gene esterifies the acyl group of acyl-ACP to the sn-1 position of glycerol-3-phosphate, an essential step in glycerolipid biosynthesis (UniProt Consortium, 2019). These two overexpressed genes increase the lipid content without affecting cell growth and photosynthetic efficiency, orchestrating even the expression of other important photosynthetic and lipogenic genes. In a biorefinery context, thinking about increasing simultaneously lipids and carotenoids sounds as a promising strategy (ZOU et al., 2018; WANG et al., 2018).

There are countless other possibilities to produce valuable compounds from microalgae given that, in some aspects, not only marine organisms are more recently studied in relation to terrestrial organisms, but also the field of metabolic engineering still has a lot to be explored. *P. tricornutum* has been used as a platform for recombinant protein studying. For instance, phytase is a phosphatase enzyme that acts in the hydrolysis of phytic acid, an undigested plant phosphorus source for monogastric animals and it has been widely used as an additive in animal feed. Pudney et al. (2019) engineered *P. tricornutum* strains to co-express  $\Delta 5$ -elongase from *Ostreococcus tauri* and phytase from *Escherichia coli* and *Aspergillus niger* to obtain co-production of omega-3 LC-PUFAs and recombinant phytase. According those authors, besides the enhanced omega-3 LC-PUFAs production it was also possible to achieve phytase activity sufficient to treat up to 20 Kg of Atlantic salmon feeds by the same engineered strain. Interestingly, *P. tricornutum* has also been engineered to secrete monoclonal IgG antibodies against Marburg virus, which is relative to Ebola virus (HEMPEL et al., 2017).

Biorefinery processes can be designed in many ways. Downstream processes and the final destination of the compounds obtained at the end of the production line are crucial to define a project. For example, high-value compounds as fucoxanthin and proteins for pharmaceutical purposes are best extracted first to avoid contamination. In addition to the possibility of producing and obtaining pigments and lipids in the biorefinery process, other configurations are proposed. Branco-Vieira et al., 2020 proposed three different biorefinery processes: *i*) a structure to produce biofuels from lipids (biodiesel), *ii*) carbohydrates fermentation (bioethanol), and *iii*) residual biomass (biomethane). Another configuration considers multiple high-value compounds productions (proteins, fucoxanthin, and silica) and a third option considers the production of fucoxanthin as the main product, and proteins, lipids and carbohydrates as co-products from *P. tricornutum* cell cultures. Zhang et al. (2018) proposed an integrated process for fucoxanthin, EPA (eicosapentaenoic acid) and chrysolaminarin production and extraction from *P. tricornutum* biomass. Interestingly,

microalgal carbohydrates are more suitable for biofuels production because the absence of lignin associated with their chemical structures facilitates fermentation.

More complexity is added to metabolic engineering due to the fact that microorganisms can produce not one, but several important compounds with high economic value simultaneously, e.g., carotenoids and PUFAs. For evolutionary reasons, the increase in the production of one compound not rarely occurs at the expense of another or at the expense of cellular growth. This is especially true in the case of TAG accumulation under nitrogen starvation. Many studies have shown that *P. tricornutum* suffers cycle arrest while accumulating TAG under nitrogen starvation (BREUER et al., 2012; KIM et al., 2017; REMMERS et al., 2018) a phenotype possibly related to carbon reallocation by downregulation of Calvin cycle, decreased biosynthesis of chrysolaminarin, and upregulation of TCA cycle and pyruvate metabolism (LEVITAN et al., 2015; ALIPANAH et al., 2015; LONGWORTH et al., 2016; BAI et al., 2016; KIM et al., 2016; BUTLER et al., 2020). Indeed, this is one of the bottlenecks for microalgae biofuels industrial scale-up. Guerra et al. (2013) studying the metabolite pool in *P. tricornutum* nitrogen starved cells, suggests that a key point controlling carbon allocation under nitrogen starvation resides in GS-GOGAT (glutamine synthetase-glutamate synthase) and GDH (glutamate dehydrogenase) pathways, in a way that the ratio AKG/GL(N/U)( $\alpha$ -ketoglutarate/glutamine/glutamate) reports the nitrogen availability to the cell triggering gene responses which together with a high NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio increase lipid biosynthesis.

CO<sub>2</sub> also plays a key role when dealing with photoautotrophic microorganisms, not only because of its importance in central carbon metabolism, but also because of its high costs for microalgae cultivation on industrial scale. Under CO<sub>2</sub> starvation, *P. tricornutum* cells increased carbon flux toward PEP (phosphoenolpyruvate) and/or pyruvate biosynthesis (HEYDARIZADEH et al., 2017; HEYDARIZADEH et al., 2019). Under low-light conditions, PEP and/or pyruvate were directed to provide substrates for respiration, as under high-light exposure microalgal cells directed toward lipids and proteins (HEYDARIZADEH et al., 2017) showing that *P. tricornutum* drives its metabolism toward lipid biosynthesis under carbon starvation as well.

There are successful studies in increasing the production of target compounds without affecting normal cell growth and development. Wang et al. (2017) applied a metabolic engineering strategy to *P. tricornutum* to increase PUFA production, expressing two key enzymes, i.e., malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase and delta 5 fatty acid desaturase simultaneously, and were successful without affecting growth and photosynthetic yield of the

microalgae. D'adamo et al. (2019) utilized metabolic pathway engineering to produce lupeol and betulin, two plant triterpenoids in *P. tricornutum*, expressing plant enzymes, and found no significant differences between wild-types and transformed strains for growth performance. Wu et al., 2019 engineered *P. tricornutum* for overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) which resulted in increased lipid content and growth. Besides, the transcript abundance and activity of G6PDH increased even more under high CO<sub>2</sub> cultivation leading to a greater biosynthesis of EPA. Also, regarding nitrogen metabolism, Trentacoste et al. (2013) were able to increase lipid yields in *Thalassiosira pseudonana* by the knockdown of a multifunctional gene for lipase, phospholipase and lysophosphatidic acyltransferase activities without impairing growth.

Most likely the penalty on cell growth occurs in cases where the accumulation of lipids occurs due to a lack of certain limiting nutrients like nitrogen, which are important for the biosynthesis of primary metabolism compounds. Metabolic engineering makes it possible to intervene in key points of metabolism so that they are might be diverted to the production of compounds of interest without affecting the normal growth of cells. Consequently, the accumulation of biomass is not penalized. Thus, a challenge encountered in the biorefinery process is to find a balance in the simultaneous production of various compounds in order to maintain the process with the highest possible yield of targeted compounds and not affecting the normal cellular growth. Metabolic engineering plays a key role to understand in which situations metabolism sacrifices the production of certain compounds for the increasing synthesis of others.

Transporters are of key importance in intra-membrane and intracellular transport, but they have been scarcely studied in diatoms and also put complexity to the systems. Regarding intracellular transport, diatoms have the peculiarity of having plastids with four membranes being the external one continuous with the endoplasmic reticulum (ER), which means that proteins nuclear encoded to be imported into plastids have firstly to pass ER (GRUBER; KROTH, 2017). As an example, we can cite the overexpression of a hypothetical gene for a pyruvate transporter. Pyruvate is a key metabolite for many important compounds like amino acids, terpenoids, and fatty acids. Seo et al. (2020) overexpressed a putative plastidial pyruvate transporter in *P. tricornutum* using particle bombardment to compartmentalize pyruvate in plastids and were able to enhance biomass, lipids, and growth up to 21.9%, 30%, and 8% respectively.

### 1.3 CASE STUDY: GENERATING AND APPLYING METABOLIC ENGINEERING STRATEGIES TO *Phaeodactylum tricornutum*

To create metabolic engineering strategies for the optimization of biorefinery processes two studies were performed using *P. tricornutum* as a model species. The first one applied systems analysis using metabolomics and bioinformatics tools to elucidate potential pathways to be inhibited or elicited, directing the metabolic flow to the synthesis of target compounds, i.e., eicosapentaenoic acid and fucoxanthin. The second study improved two models on a genomic scale seeking to predict ways based on restrictions and flow balance analysis to increase fucoxanthin synthesis.

#### 1.3.1 Metabolomics

To create strategies for metabolic engineering using metabolomics focused on systems biology, biochemical data mining tools were used aiming at suppressing certain metabolic pathways for increasing the biosynthesis of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin. For this purpose, supervised analyzes were performed, such as liquid and gas chromatography to quantify the compounds of interest, as well as unsupervised ones, e.g., vibrational infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR). The analytical platform adopted intended to metabolically profile *P. tricornutum* cells during cultivation to detect eventual data patterns that provide metabolic information that will assist in the optimization of the microalgae biorefinery process.

Supervised analyzes provided an overview of the contents of metabolites during the cell cultivation, showing stability in the fucoxanthin amounts and an oscillation in EPA concentration. In its turn, unsupervised analysis using FTIR spectroscopy gave rise to fingerprint regions in the spectra associated to the compounds of interest. Besides, it was noted that if the cell culture protocol aims at the maximum EPA production, it would indicate to interrupt the cultivation by the end of the logarithmic phase of cell growth. Regarding fucoxanthin, its contents were higher and somewhat stable from the end of the logarithmic phase until the end of the stationary phase. The stability of this oxycarotenoid when in relation to the cell biomass implies that this compound has a lot of potential to be worked in biorefinery processes. In their turn, protein contents showed augmented in the logarithmic phase of cell growth and further decreased over cultivation. Finally, at the end of the cultivation higher amounts of carbohydrates were detected to accumulate. This information is important to

understand the oscillation of primary and secondary metabolites during cell cultivation, eventually subsidizing their analysis in large-scale industrial processes, focusing on the cell growth phases of higher amounts of target compounds as previously *in vitro* identified.

In a follow-up study to shed lights on metabolic engineering of *P. tricornutum* cells, NMR spectroscopy was applied to investigate the microalgal endometabolome. Such an approach allowed identifying a set of cell metabolites with the aid of the Bayesil software (RAVANBAKHSI et al., 2015). However, the identification of the metabolite can also be carried out by other platforms or even manually with programs specific to the NMR spectra, such as Chenomx (WISHART et al., 2017). Importantly, a database containing reference NMR spectra for the metabolites found makes easier the annotation and identification of compounds, especially whether the NMR spectra have been recorded under similar experimental conditions to the samples in study. In the case of diatoms, the database DiatomCyc (FABRIS et al., 2012) and KEGG (KANEHISA et al., 2007) are extremely relevant for this purpose.

After the identification of the compounds in the biochemical matrix of *P. tricornutum*, it was possible to investigate the main metabolic pathways and perform analysis of pathway topology and over-representation through the MetaboAnalyst platform (CHONG; WISHART; XIA, 2015). The main results from the NMR analysis indicated that the metabolic models developed led to the greatest impact on the carbohydrate and amino acid metabolism of *P. tricornutum*. Currently, with the support of computational platforms and databases that assist in the study of the metabolic pathways with high impact on cell metabolism, one can highlight which of them present the greatest potential for the optimization of a biorefinery process through metabolic engineering. However, this systems biology approach is generalist, disregarding the target compound(s) and requiring prior knowledge to select metabolic pathways that could afford higher amounts of a given compound of interest, without disturbing the whole cell's metabolism. This selection eventually might not be possible depending on the algorithms adopted, since many consider only the microalgal metabolism as a whole, hindering their usage under a biorefinery process analysis. This is, of course, a disadvantage of applying systems biology in the context of biorefineries, being inevitable the selection of pathways by researchers, or even by developing and validating machine learning models that perform this selection.

The metabolomics analysis performed by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy revealed that *P. tricornutum*'s biosynthetic pathways with the greatest impact and potential for application in metabolic engineering are concerned to alanine, glyoxylate, and pyruvate. These are important metabolites regarding the cell's thermodynamic state, also related to the synthesis of acetyl-

CoA, a well-known building block of fat acids. Thus, it is speculated that higher amounts of these molecules available to the cell's metabolism might foster the biosynthesis of EPA and fucoxanthin. On the other hand, metabolic engineering strategies to inhibit the distribution of these molecules to other metabolic pathways require care, since they may negatively interfere on the cell metabolism in a way leading to the collapse of cell's functions and death.

These strategies generated from systems biology generate subsidies for metabolic engineering and can be applied to changes in synthetic levels, altering or synthetically blocking pathways with changes in the genetic level, or even more simplistically, using enzyme inhibitors specific to pathways that are not part of the synthesis of the compounds of interest, at determined times of cultivation.

The systems biology studies have advanced a lot, in confluence with the development of computational platforms and databases, thus facilitating the processing and understanding of omics data sets. Metabolomics allows one to overview the cell's metabolism and the understanding as a whole of the biochemical machinery of cells in its dynamics, being a relevant way of rationally validate *in-silico* metabolic models following a biorefinery concept of production.

### **1.3.2 Fluxomics: FBA applied to fucoxanthin metabolism**

Fluxomics is one of the most accurate and predictable tools for controlling metabolic flow and for genetic engineering purposes it is considered a much more reliable process of analysis. This type of application requires prior knowledge of cell metabolism with the use of genome-scale metabolic network reconstruction, allowing simulations and optimizations of desired phenotypes *in silico*. Strategies that can be carried out *in silico* are the most recommended, because they increase the predictability and are more ecological by reducing the use of reagents.

Two genome-scale metabolic models for the species *P. tricornutum* (KIM et al., 2016; LEVERING et al., 2016) were utilized by Bauer et al. (2019) to predict ways to enhance fucoxanthin production using FBA. For that, firstly the metabolic model proposed by Kim et al., (2016) lacking reactions for carotenogenesis was completed to reach fucoxanthin biosynthesis, following its importation along with the metabolic model of Levering et al., (2016) into OptFlux software (ROCHA et al., 2010) for FBA analysis. *In-silico* simulations with these models predicted increased biomass flux up to 67% and 77%, by doubling the supply of inorganic carbon ( $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$ ) and urea, respectively. For optimizations, FBA on

OptFlux were carried out under MOMA (minimization of metabolic adjustment) algorithm and good optimization solutions for fucoxanthin biosynthesis pointed out to the knockout of genes/enzymes involved in the metabolism of important precursors for the non-mevalonate methylerythritol pathway - MEP (mostly pyruvate and glyceraldehyde-3-phosphate - G3P).

Fucoxanthin metabolism has yet to be fully elucidated, however some important points of this path are potentially established. In addition to the importance of the availability of precursors of the MEP pathway like pyruvate and G3P, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) (EILERS et al., 2016), phytoene synthase (PSY) (KAUR; SPILLANE, 2015; EILERS et al., 2016), and a violaxanthin de-epoxidase-like (VDL) (DAUTERMANN et al., 2020; GAIDARENKO et al., 2020), have been shown to be important bottlenecks in fucoxanthin biosynthesis. DXS catalyzes the initial step of the MEP pathway and PSY guides the metabolic flux into carotenogenesis. VDL is closely related to the formation of allenic carotenoids diverting carotenoids function towards light harvesting in the evolution of marine algae including diatoms (DAUTERMANN et al., 2020). According to Dautermann et al. (2020) VDL is related to the enzyme violaxanthin de-epoxidase-like which in turn catalyzes the formation of neoxanthin leading to the formation of diadinoxanthin and fucoxanthin.

Violaxanthin de-epoxidase (VDE) and VDE-related (VDR) which convert violaxanthin into zeaxanthin or diadinoxanthin into diatoxanthin, as well as zeaxanthin epoxidase 3 (ZEP3), responsible for the reversed reactions, also seem to be important in carotenoid formation. Transgenic strains of *P. tricornutum* designed to simultaneously overexpress these three genes increased carotenoid amounts up to 4-fold in fucoxanthin, 3-fold in diatoxanthin and up to 2-fold in  $\beta$ -carotene (MANFELLOTTI et al., 2020), as silencing VDE reduced diatoxanthin synthesis (LAVAUD et al., 2012).

Regarding carotenogenesis pathways, other branches besides the formation of carotenoids, such as the synthesis of hormones, exist and thus these models can still be completed in these pathways for better optimization results. Otherwise, computational models have to be constantly updated with novel information about *P. tricornutum* metabolome.

## 1.4 CONCLUSION

The development of metabolic engineering applied to microalgae has been growing in the last decade with the genome sequencing of some model species that facilitate studies in systems biology and thus, enable the understanding of algal metabolism as a whole. Systems

biology analysis (e.g., genomic scale models and omics analysis), together with the increased availability of databases and open-access software, allow more precisely the discovery of bottlenecks in microalgal metabolism that can serve as targets for metabolic engineering.

*P. tricornutum* is considered the model species when looking at to produce more than one compound of high commercial value in a biorefinery process. With the publication of its genome in 2008, work in the field of metabolic engineering grew at an accelerated pace. The species is considered a model for the biorefinery because it produces a high content of lipids with a fatty acid profile rich in PUFAs of commercial interest (e.g., EPA and linoleic acid), highly antioxidant pigments (i.e., fucoxanthin), and carbohydrates such as chrysolaminarin. In addition to these compounds of biotechnological interest, the insertion of recombinant genes was effective in the production of other metabolites to enrich the cell-matrix of the culture, directing it to its application. Besides, the size of the *P. tricornutum*'s genetic material makes it an attractive system for metabolic engineering and enables the creation of successful transgenic strains.

Among the metabolic engineering strategies in *P. tricornutum*, those that use the knowledge of systems biology and apply genetic engineering are the most promising. Nonetheless, regarding the biorefinery concept applied to this species, it is crucial to understand the points of control and regulation of biosynthetic pathways of multiple compounds of biotechnological interest. In this sense, omics science technologies are truly useful because they aim to understand the systems as a whole.

The case studies herein reported where omics sciences were applied to understand the metabolism of *P. tricornutum* in connection to generate strategies aiming at an improved biorefinery process have shown promising targets. In the first case, metabolomics analysis allowed to have an overview of the oscillation of the metabolic profiles during cell cultivation. This approach intended to gain insights of the microalgal metabolism having more than one target class of compounds and facilitate mainly biotechnological processes that are not aimed at genetic engineering, but rather the optimization of an industrial cultivation process. The second case study applied fluxomics analysis to the *P. tricornutum*'s cell metabolism and gave important information to guide further *in vitro* experiments that seek the production of desired compounds and the understanding of their metabolism. Indeed, as such, fluxomics analysis coupled to biochemical investigations is thought as a two-way street that allows the constant improvement of methodological strategies to optimize the biosynthesis and accumulation of biotechnologically relevant molecules, reducing the need for practical experiments.



Finally, it is evident the need to develop a lot the biorefinery concept applied to *P. tricornutum* cell cultures in industrial scale. In the last decade, there has been an increase in metabolic engineering work that aims to increase the synthesis of compounds by *P. tricornutum*, however, there are few works addressing the biorefinery concept in a robust manner. Thus, in the future studies should focus on, for instance, multiple and simultaneous knock-outs genes, which makes metabolic modification complex but more promising, and understanding the regulatory networks of the microalga metabolism. The main challenge that must be overcome is to be able to balance the production of more than one compound without penalizing the cell growth of biomass.

Even though the idea of biorefinery is highly attractive, numerous advances and adjustments are still needed to make microalgae biorefinery economically feasible. The concept itself involves not only a multiplicity of products, but also protocols that range from the genetic engineering of organisms to upstream and downstream processes until obtaining the final products with the desired quality. Advances have occurred in all areas of the biorefinery process and need to be refined and evaluated on an industrial scale to become biotechnologically relevant.

## REFERENCES

ALIPANAH, L. et al. Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 20, p. 6281–6296, 2015.

ALLEN, A. E. et al. Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 203–207, 2011.

APT, K. E.; KROTH-PANCIC, P. G.; GROSSMAN, A. R. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Molecular & General Genetics: MGG**, v. 252, n. 5, p. 572–579, 1996.

BAI, X. et al. Proteomic analyses bring new insights into the effect of a dark stress on lipid biosynthesis in *Phaeodactylum tricornutum*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

BALAMURUGAN, S. et al. Occurrence of plastidial triacylglycerol synthesis and the potential regulatory role of AGPAT in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2017.

BAUER, C. M. et al. *In Silico* Predictions for Fucoxanthin Production by the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: **Practical Applications of Computational Biology and Bioinformatics**, 12th International Conference. Cham: Springer International Publishing, v. 12, p. 139–148, 2019.

BELLOU, S. et al. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1476–1493, 2014.

SILVA-BENAVIDES, A. M. et al. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. **Biomass & Bioenergy**, v. 54, p. 115–122, 2013.

BOWLER, C. et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 239–244, 2008.

BRANCO-VIEIRA, M. et al. Biotechnological potential of *Phaeodactylum tricorutum* for biorefinery processes. **Fuel**, v. 268, n. 117357, p. 1-13, 2020.

BREUER, G. et al. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 217–226, 2012.

BUCK, J. M. et al. Blasticidin-S deaminase, a new selection marker for genetic transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Bioinformatics and Genomics**, v. 6, n. e5884, p. 1-13, 2018.

BUCK, J. M. et al. Lhcx proteins provide photoprotection via thermal dissipation of absorbed light in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2019.

BUTLER, T.; KAPOORE, R. V.; VAIDYANATHAN, S. *Phaeodactylum tricorutum*: A Diatom Cell Factory. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 606–622, 2020.

CARRIJO, R. D. S. et al. Uso de microalgas para a produção de biodiesel: vantagens e limitações. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 5, n. 1, p. 23–33, 2015.

CHAE, T. U. et al. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 47, p. 67–82, 2017.

CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 68, n. 1, p. 1-128, 2019.

CUI, Y. et al. Characterization and engineering of a dual-function diacylglycerol acyltransferase in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2018.

CUI, Y.; THOMAS-HALL, S. R.; SCHENK, P. M. *Phaeodactylum tricorutum* microalgae as a rich source of omega-3 oil: Progress in lipid induction techniques towards industry adoption. **Food Chemistry**, v. 297, n. 124937, p. 1-9, 2019.

DABOUSSI, F. et al. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricorutum* for biotechnology. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2014.

D'ADAMO, S. et al. Engineering the unicellular alga *Phaeodactylum tricornerutum* for high-value plant triterpenoid production. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 1, p. 75–87, 2019.

DAUTERMANN, O. et al. An algal enzyme required for biosynthesis of the most abundant marine carotenoids. **Science Advances**, v. 6, n. 10, p.1-12, 2020.

DE-JONG, Ed; LANGEVELD, H; RENE V. R. Biorefinery. Biorefineries: giving value to sustainable biomass use. In: **The Biobased Economy**. Routledge, p. 132-151, 2013.

DESBOIS, A. P. et al. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornerutum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 755–764, 2008.

DINAMARCA, J. et al. Overexpression of a diacylglycerol acyltransferase gene in *Phaeodactylum tricornerutum* directs carbon towards lipid biosynthesis. **Journal of Phycology**, v. 53, n. 2, p. 405–414, 2017.

D'ORAZIO, N. et al. Fucoxanthin: A treasure from the sea. **Marine Drugs**, v. 10, n. 12, p. 604–616, 2012.

EILERS, U. et al. Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricornerutum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 123–129, 2016.

ERDENE-OCHIR, E. et al. Identification and characterisation of the novel endogenous promoter HASP1 and its signal peptide from *Phaeodactylum tricornerutum*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

FABRIS, M. et al. The metabolic blueprint of *Phaeodactylum tricornerutum* reveals a eukaryotic Entner-Doudoroff glycolytic pathway: The *Phaeodactylum tricornerutum* metabolic blueprint. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, v. 70, n. 6, p. 1004–1014, 2012.

FABRIS, M. et al. Tracking the sterol biosynthesis pathway of the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. **The New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 521–535, 2014.

FABRIS, M. et al. Extrachromosomal genetic engineering of the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* enables the heterologous production of monoterpenoids. **ACS Synthetic Biology**, v. 9, n. 3, p. 598–612, 2020.

FALCIATORE, A. et al. Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms. **Marine Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 239-251, 1999.

FU, W. et al. Advances in microalgal research and engineering development. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 59, p. 157–164, 2019.

GAIDARENKO, O. et al. Overexpression of *Thalassiosira pseudonana* violaxanthin de-epoxidase-like 2 (VDL2) increases fucoxanthin while stoichiometrically reducing diadinoxanthin cycle pigment abundance. **BioRxiv**. v. 7, n. 1, p. 1-49, 2020

GAO, W. et al. Characteristics studies of molecular structures in drugs. **Saudi Pharmaceutical Journal**: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society, v. 25, n. 4, p. 580–586, 2017.

GE, F. et al. Methylcrotonyl-CoA carboxylase regulates triacylglycerol accumulation in the model diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 4, p. 1681–1697, 2014.

GEORGE, J. et al. Metabolic engineering strategies in diatoms reveal unique phenotypes and genetic configurations with implications for algal genetics and synthetic biology. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1-19, 2020.

GRUBER, A.; KROTH, P. G. Intracellular metabolic pathway distribution in diatoms and tools for genome-enabled experimental diatom research. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Series B- Biological Sciences**, v. 372, n. 1728, p. 1-11, 2017.

GUERRA, L. T. et al. Regulatory branch points affecting protein and lipid biosynthesis in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. **Biomass & Bioenergy**, v. 59, p. 306–315, 2013.

HAMILTON, M. L. et al. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornerutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. **Metabolic Engineering**, v. 22, p. 3–9, 2014.

HAO, X. et al. Enhanced triacylglycerol production in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* by inactivation of a Hotdog-fold thioesterase gene using TALEN-based targeted mutagenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2018.

HASLAM, R. P. et al. Overexpression of an endogenous type 2 diacylglycerol acyltransferase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* enhances lipid production and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1-17, 2020.

HEMPEL, F. et al. From hybridomas to a robust microalgal-based production platform: molecular design of a diatom secreting monoclonal antibodies directed against the Marburg virus nucleoprotein. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2017.

HEYDARIZADEH, P. et al. Response of CO<sub>2</sub>-starved diatom *Phaeodactylum tricornerutum* to light intensity transition. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Series B- Biological Sciences**, v. 372, n. 1728, p. 1-9, 2017.

HEYDARIZADEH, P. et al. Carbon orientation in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*: The effects of carbon limitation and photon flux density. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-16, 2019.

HOSOKAWA, M. et al. Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HL-60. **Food Science and Technology Research**, v. 5, n. 3, p. 243–246, 1999.

HUANG, W.; DABOUSSI, F. Genetic and metabolic engineering in diatoms. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Series B- Biological Sciences**, v. 372, n. 1728, p. 1-10, 2017.

JARAMILLO-MADRID, A. C. et al. Overexpression of key sterol pathway enzymes in two model marine diatoms alters sterol profiles in *Phaeodactylum tricornerutum*. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 12, p. 1-19, 2020.

KANEHISA, M. et al. KEGG for linking genomes to life and the environment. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database, p. 480-484, 2007.

KARAS, B. J. et al. Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2015.

KAUR, S.; SPILLANE, C. Reduction in carotenoid levels in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* by artificial microRNAs targeted against the endogenous phytoene synthase gene. **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2015.

KIKUTANI, S. et al. Thylakoid luminal  $\theta$ -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 35, p. 9828-9833, 2016.

KIM, J. et al. Flux balance analysis of primary metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, v. 85, n. 1, p. 161-176, 2016.

KIM, J. et al. Effect of cell cycle arrest on intermediate metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 38, p. 1-10, 2017.

KROTH, P. G. et al. A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* deduced from comparative whole genome analysis. **PloS One**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2008.

LAVAUD, J. et al. Silencing of the violaxanthin DE-epoxidase gene in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* reduces diatoxanthin synthesis and non-photochemical quenching. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. 1-13, 2012.

LEVERING, J. et al. Genome-scale model reveals metabolic basis of biomass partitioning in a model diatom. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. 1-22, 2016.

LEVERING, J. et al. Integrated regulatory and metabolic networks of the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* predict the response to rising CO<sub>2</sub> levels. **mSystems**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2017.

LEVITAN, O. et al. Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* under nitrogen stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 2, p. 412-417, 2015.

LI, S. et al. Over-expression of LPAAT gene in *Phaeodactylum tricornerutum* enhances fatty acid accumulation and increases fatty acid chain length. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 1, p. 19-25, 2020.

LIN, H.-Y. et al. Alkaline phosphatase promoter as an efficient driving element for exogenic recombinant in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. **Algal Research**, v. 23, p. 58–65, 2017.

LONGWORTH, J. et al. Proteome response of *Phaeodactylum tricornerutum* during lipid accumulation induced by nitrogen depletion. **Algal Research**, v. 18, p. 213–224, 2016.

MADHURI, S. et al. A strategy to complement PtAUREO1a in TALEN knockout strains of *Phaeodactylum tricornerutum*. **Algal Research**, v. 39, n. 101469, p. 1-9, 2019.

MAEDA, H. et al. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. **Molecular Medicine Reports**, v. 02, n. 6, p. 1-6, 2009.

MANFELLOTTI, F. et al. Engineering the unicellular alga *Phaeodactylum tricornerutum* for enhancing carotenoid production. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 1-13, 2020.

MANN, M. et al. PtAUREO1a and PtAUREO1b knockout mutants of the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* are blocked in photoacclimation to blue light. **Journal of Plant Physiology**, v. 217, p. 44-48, 2017.

MENDOZA, H. et al. Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 1-13, 2008.

MILIĆEVIĆ, D. et al. The role of total fats, saturated/unsaturated fatty acids and cholesterol content in chicken meat as cardiovascular risk factors. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2014.

NIU, Y.-F. et al. Transformation of diatom *Phaeodactylum tricornerutum* by electroporation and establishment of inducible selection marker. **BioTechniques**, v. 52, n. 6, p. 1-3, 2012.

NIU, Y.-F. et al. Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. **Marine Drugs**, v. 11, n. 11, p. 4558-4569, 2013.

NYMARK, M. et al. A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-6, 2016.

ORTH, J. D.; THIELE, I.; PALSSON, B. Ø. What is flux balance analysis? **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 245–248, 2010.

PANGESTUTI, R.; KIM, S.-K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 255–266, 2011.

PECK, P. et al. Examining understanding, acceptance, and support for the biorefinery concept among EU policy-makers. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining: Biofpr**, v. 3, n. 3, p. 361–383, 2009.

- PUDNEY, A. et al. Multifunctionalizing the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum* for sustainable co-production of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids and recombinant phytase. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.
- RASTOGI, A. et al. Integrative analysis of large-scale transcriptome data draws a comprehensive landscape of *Phaeodactylum tricoratum* genome and evolutionary origin of diatoms. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2018.
- RAVANBAKHS, S. et al. Accurate, fully-automated NMR spectral profiling for metabolomics. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. 1-15, 2015.
- REMMERS, I. M. et al. Orchestration of transcriptome, proteome and metabolome in the diatom *Phaeodactylum tricoratum* during nitrogen limitation. **Algal Research**, v. 35, p. 33–49, 2018.
- ROCHA, I. et al. OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering. **BMC Systems Biology**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2010.
- RUSSO, M. T. et al. Assessment of genomic changes in a CRISPR/Cas9 *Phaeodactylum tricoratum* mutant through whole genome resequencing. **Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology**, v. 6, n. 5507, p. 1-20, 2018.
- SAADE, A.; BOWLER, C. Molecular tools for discovering the secrets of diatoms. **Bioscience**, v. 59, n. 9, p. 757–765, 2009.
- SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: History and perspective. In: **Regulatory T Cells**. NJ: Humana Press, v. 707, p. 3–17, 2011.
- SCHIANO-DI-VISCONTE, G. et al. The microalgae biorefinery: A perspective on the current status and future opportunities using genetic modification. **Applied Sciences**, v. 9, n. 22, p. 1-15, 2019.
- SEO, S. et al. Development of a new constitutive expression system for the transformation of the diatom *Phaeodactylum tricoratum*. **Algal Research**, v. 11, p. 50–54, 2015.
- SEO, S. et al. Enhanced biomass production by *Phaeodactylum tricoratum* overexpressing phosphoenolpyruvate carboxylase. **Algal Research**, v. 31, p. 489–496, 2018.
- SEO, S. et al. Enhanced pyruvate metabolism in plastids by overexpression of putative plastidial pyruvate transporter in *Phaeodactylum tricoratum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2020.
- SERIF, M. et al. One-step generation of multiple gene knock-outs in the diatom *Phaeodactylum tricoratum* by DNA-free genome editing. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2018.
- SHARMA, A. K. et al. Transgene-free genome editing in marine algae by bacterial conjugation – comparison with biolistic CRISPR/Cas9 transformation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

- SHIRATORI, K. et al. Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. **Experimental Eye Research**, v. 81, n. 4, p. 422–428, 2005.
- SLATTERY, S. S. et al. Plasmid-based complementation of large deletions in *Phaeodactylum tricorutum* biosynthetic genes generated by Cas9 editing. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.
- STUKENBERG, D. et al. Optimizing CRISPR/Cas9 for the Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–11, 2018.
- THIELE, I.; PALSSON, B. Ø. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 1, p. 93–121, 2010.
- TREDICI, M. R. et al. Energy balance of algal biomass production in a 1-ha “Green Wall Panel” plant: how to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high net energy ratio. **Applied Energy**, v. 154, p. 1103–1111, 2015.
- TRENTACOSTE, E. M. et al. Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 49, p. 19748–19753, 2013.
- UBANDO, A. T.; FELIX, C. B.; CHEN, W.-H. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 299, n. 122585, p. 1–18, 2020.
- THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. 506–515, 2019.
- VENTURA, S. P. M. et al. Extraction of value-added compounds from microalgae. In: **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**. Elsevier, p. 461–483, 2017.
- WANG, X. et al. Enrichment of long-chain polyunsaturated fatty acids by coordinated expression of multiple metabolic nodes in the oleaginous microalga *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 35, p. 7713–7720, 2017.
- WANG, X. et al. Dual expression of plastidial GPAT1 and LPAT1 regulates triacylglycerol production and the fatty acid profile in *Phaeodactylum tricorutum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2018.
- WANG, X. et al. TAG pathway engineering via GPAT2 concurrently potentiates abiotic stress tolerance and oleaginicacy in *Phaeodactylum tricorutum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2020.
- WATANABE, Y. et al. Development of endogenous promoters that drive high-level expression of introduced genes in the model diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Marine Genomics**, v. 42, p. 41–48, 2018.
- WESTERHOFF, H. V.; PALSSON, B. O. The evolution of molecular biology into systems biology. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1249–1252, 2004.



WISHART, D. S. et al. **Automatic identification of compounds in a sample mixture by means of NMR spectroscopy**. US Patent, 13 Mar. 2007. Acesso em: 20 fev. 2020.

WU, S. et al. Elevated CO<sub>2</sub> improves both lipid accumulation and growth rate in the glucose-6-phosphate dehydrogenase engineered *Phaeodactylum tricornerutum*. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1-16, 2019.

XIA, S. et al. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. **Marine Drugs**, v. 11, n. 7, p. 2667–2681, 2013.

XIE, W.-H. et al. Construction of novel chloroplast expression vector and development of an efficient transformation system for the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. **Marine Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 538–546, 2014.

YANG, J. et al. Knockdown of phosphoenolpyruvate carboxykinase increases carbon flux to lipid synthesis in *Phaeodactylum tricornerutum*. **Algal Research**, v. 15, p. 50–58, 2016.

YANG, M. et al. Genome annotation of a model diatom *Phaeodactylum tricornerutum* using an integrated proteogenomic pipeline. **Molecular Plant**, v. 11, n. 10, p. 1292–1307, 2018.

YI, Z. et al. Photo-oxidative stress-driven Mutagenesis and adaptive evolution on the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* for enhanced carotenoid accumulation. **Marine Drugs**, v. 13, n. 10, p. 6138–6151, 2015.

YI, Z. et al. Chemical Mutagenesis and fluorescence-based high-throughput screening for enhanced accumulation of carotenoids in a model marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. **Marine Drugs**, v. 16, n. 8, p. 1-16, 2018.

YOSHINAGA, R. et al. Characterization of iron-responsive promoters in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. **Marine Genomics**, v. 16, p. 55–62, 2014.

ZASLAVSKAIA, L. A. et al. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. **Journal of Phycology**, v. 36, n. 2, p. 379–386, 2001.

ZHANG, C.; HU, H. High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* by electroporation. **Marine Genomics**, v. 16, p. 63–66, 2014.

ZHANG, W. et al. An integrated biorefinery process: Stepwise extraction of fucoxanthin, eicosapentaenoic acid and chrysolaminarin from the same *Phaeodactylum tricornerutum* biomass. **Algal Research**, v. 32, p. 193–200, 2018.

ZHOU, L. et al. PGRL1 overexpression in *Phaeodactylum tricornerutum* inhibits growth and reduces apparent PSII activity. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, v. 103, n. 5, p. 1850–1857, 2020.

ZHU, B.-H. et al. Overexpression of endogenous delta-6 fatty acid desaturase gene enhances eicosapentaenoic acid accumulation in *Phaeodactylum tricornerutum*. **Process Biochemistry**, v. 57, p. 43–49, 2017.

ZOU, L.-G. et al. High-efficiency promoter-driven coordinated regulation of multiple metabolic nodes elevates lipid accumulation in the model microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2018.

ZOU, L. G. et al. Potentiation of concurrent expression of lipogenic genes by novel strong promoters in the oleaginous microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 11, p. 3006–3015, 2019.

## - CAPÍTULO II -

### COMPARISON OF FIVE METHODS FOR LIPID EXTRACTION FROM THE *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* MICROALGA AND DETERMINATION OF FUCOXANTHIN AND FATTY ACIDS PROFILES<sup>2</sup>

#### ABSTRACT

In this study the effectiveness of five protocols for lipid (FA) and carotenoid extraction from the *Phaeodactylum tricornutum* microalga was assayed. The protocols of Folch, Lee and Stanley, Bligh and Dyer, and Bligh and Dyer + UAE (ultrasound-assisted extraction) showed the higher yields of total lipids determined through gravimetric analysis. Folch, Lee and Stanley protocol was more effective in extracting fucoxanthin in the methanolic phase. It is noteworthy that there was no significant difference in fucoxanthin extraction in chloroform phases among the methods evaluated. On the other hand, the Folch, Lee and Stanley method showed to be more selective for MUFAs recovery from the microalgal biomass. However, following the market demands for efficient extraction of oils rich in omega-3, Bligh and Dyer and Bligh and Dyer + UAE protocols are recommended. The protocol established by Bligh and Dyer + UAE can be recommended as an effective methodology in biomedical oil extraction.

#### 1.1 INTRODUCTION

Microalgae produce a large number of bioactive compounds that can be used by society as natural supplements. These bioproducts have been gaining ground in the market due to their broad panel of bioactivities. Marine bioactive compounds in a broad-sense, can be polysaccharides, pigments, proteins, vitamins, and lipids with several activities, among them, anti-tumor, antioxidants, antibiotics and photoprotectors (HAUGAN; JENSEN, 1994; MOLINSKI et al., 2009; MARTINS et al., 2014). These bioproducts have been marketed as encapsulated fatty acids, amino acids, and pigments for human consumption and pharmaceutical and cosmetic industries. Despite the increasing market of microalgae bioproducts, the raw material for the extraction of bioactive molecules of aquatic organisms has in fish stock biomass its main source yet (BERGÉ; BARNATHAN, 2005).

---

<sup>2</sup> This chapter was published in the journal **Advances in Biotechnology & Microbiology**. SCHMITZ, C. et al. Comparison of Five Methods for Lipid Extraction from the *Phaeodactylum tricornutum* Microalga and Determination of Fucoxanthin and Fatty Acids Profiles, Profiles. Adv Biotechnol Microbiol., v. 14, n. 3, 2019.

Due to sustainability concerns of fish farming systems, microalga cultivation systems are claimed as a viable alternative to obtain oils rich in omega-3 fatty acids ( $\omega$ -3). Currently the slow development at industrial scale of cultivation systems for microalgae has been related to the limited growth of these organisms in open ponds and the high costs of these cultures in photobioreactors (COONEY; YOUNG; NAGLE, 2009). Other problems are associated with the processing of biomass, which, when not improved, has a direct relationship with the yield of this crop. One of the obstacles to the extraction of microalgae's oil fraction is the nonexistence in the target species of an optimized method to recover that fraction, despite several reports in the literature. Therefore, more studies are necessary to fit a standard method specifically directed to the species of interest in this study (i.e., a tailored protocol), considering their structural differences (i.e., chemical composition of the cell wall) and metabolic differences between microalgal biomasses traditionally used as raw materials (COONEY; YOUNG; NAGLE, 2009).

Furthermore, the works related to the evaluation of extraction methods are commonly directed to green microalgae and cyanobacteria, as they are species already cultivated for this purpose. Among microalgae of biotechnological interest, *Phaeodactylum tricorutum* has been extensively exploited for its interesting traits such as:

- a. to store large amounts of neutral lipids, i.e., about 30% of its dry weight (RADMANN; COSTA, 2008),
- b. a short cropping cycle (JORQUERA et al., 2010),
- c. to synthesize nutraceutical pigments (KIM et al., 2012),
- d. adaptability, modifying its shape according to the environment conditions (MARTINO et al., 2007),
- e. not demanding an organic carbon source for growth in culture medium, surpassing the productivity of any agricultural crop (RONGA et al., 2019), and
- f. its genome has been sequenced, being a relevant model for metabolic engineering studies involving the biosynthesis and accumulation of molecules of biotechnological importance as fucoxanthin, for instance (BOWLER et al., 2008).

One attractive bioproduct in *P. tricorutum* is its high added value lipid fraction, due to its content in  $\omega$ -3 fatty acids, named long chain Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) such as Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA), (RYCKEBOSCH; MUYLAERT; FOUBERT, 2008). These metabolites play important biochemical roles in the brain and retina, augment the absorption of fat-soluble vitamins, and still exhibit anti-inflammatory action (MULLEN; LOSCHER; ROCHE, 2010, SIMOPOULOS, 2002,

SIMOPOULOS, 2013). Besides, in the lipid fraction of microalgal biomasses the carotenoid compounds are also highlighted.

In this context, the diatom *P. triornutum* has fucoxanthin as its major carotenoid and, due to its nonpolar trait, such secondary metabolite is usually found associated to the lipid fraction in that species. This pigment has a potent antioxidant action, preventing diseases associated with the damage effects of free radicals in cells such as cancer (NISHINO et al., 2002) The aforementioned bioproducts, i.e., fatty acids and carotenoids, are already commercially available from the ingestion of the microalgal matrix of species such as *Chorella* spp. and *Spirulina* spp., being used in human food. Additionally, they can also be extracted from microalgae to be sold separately, or in formulations containing the microalgal lipid extract, the last one seeking the synergism of its benefits to the human health. Importantly, studies have suggested that a diet rich in fatty acids may increase the absorption of fucoxanthin in human beings, for instance (PANGESTUTI; KIM, 2011). This occurs because esterified fucoxanthin is probably incorporated into the lipid core and transported to a variety of tissues, facilitating their absorption and enhancing the bioavailability, given its highly apolar nature (PANGESTUTI; KIM, 2011). This occurs due to a connection to an esterification process of those metabolites in cells of the human and mice intestine, facilitating their absorption and enhancing the bioavailability, given the highly apolar nature described in models (SUGAWARA et al., 2009).

The choice of the extraction methodology can directly impact the design of microalgae production bioprocesses, with positive repercussions on the possibility of expanding the market of bioproducts containing fatty acids and carotenoids to human food, i.e., nutraceuticals. Based on the above, it is assumed as a working hypothesis that a standardized protocol for the extraction of the oil fraction eventually containing carotenoids of *P. triornutum* biomass is relevant to improve the process for the recovery of those high added value metabolites. In this sense, this study aimed to determine and to compare the extraction efficiency of five protocols in recovering the lipid fraction, fatty acids, and carotenoids from *P. triornutum* biomass. For that, gravimetric and chromatographic analytical techniques were applied to determine the yields of the extraction protocols and the fatty acids and fucoxanthin profiles in the organosolvent samples thereof.

## 1.2 MATERIAL AND METHODS

### 1.2.1 Culture and biomass preparation

The marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*, strain CCAP 1052/A, was cultured in 500 ml Erlenmeyer flasks for 7 days in f/2 culture medium, following the protocol of (GUILLARD, 1975). Initial concentration of cells per flask was 22k cells/mL/L, receiving  $65\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  of irradiance on average. At the beginning, the culture medium presented pH values  $\sim 8$  and 31 salinity. No relevant changes occurred in these variables over the cultivation period, i.e., seven days. At the end of the experiment (day 7<sup>th</sup>), the cell cultures were collected, centrifuged (2276g, 9 min) and the supernatant rejected. The collected biomass was desalinated by quickly washing it with 0.5M ammonium formate solution, following freeze-drying (36 h, 0.001 mbar) and storage at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until extraction. This biomass will serve as a pool for lipid extraction of three independent experiments, according to three protocols (BLIGH; DYER, 1959; FOLCH; LEE; STANLEY, 1959; SELSTAN; ÖQUIST, 1985). Hereafter, such protocols will be assigned in the text to the acronyms BD, FLS, and SÖ, respectively. Additionally, the BD protocol was performed three times by adding a pre-treatment of cell disruption with the aid of microwaves and Ultrasound- Assisted Extraction (UAE).

### 1.2.2 Extraction of total lipids

Using the BD method, 100mg of dry microalgal biomass were added of 3ml methanol (MeOH), 3 ml chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) and stirred (vortex) for 30s. In the sequence, 1ml  $\text{CHCl}_3$  1ml MeOH and 2ml water were added, following incubation for 10 min, with eventual shaking (vortex, 30s, every 2 min). Subsequently the extract was filtered. The filter was rinsed with 4 ml  $\text{CHCl}_3$  to allow a better recovery of the lipid fraction. This process resulted in a three-phase extract of chloroform, methanol and water, roughly at ratio 2: 2: 1.8 (v/v/v). This procedure was repeated three times, two of them by performing a pre-treatment for cell disruption using microwaves (557 W) for 1 min and ultrasound using a sonicator for 30 minutes (47 160kHz, 60 W, Branson B-2200) before adding solvents.

In the FLS method, a sample of *P. tricornutum* biomass (100mg dry weight) was homogenized in a  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (2: 1, v/v) solution, following shaking (vortex) for 1 minute. The extract was filtered, and the biomass resuspended with the extract solution above described. Subsequently, a 0.7% aqueous NaCl solution was added, affording a final solvent system of

CHCl<sub>3</sub>: MeOH: water (2: 1: 0.8, v/v/v). As this protocol requires small amounts of biomass and solvent, it was necessary to adapt it in order to be able to collect the extract after filtering. Thus, the extract was withdrawn and a new resuspension with 3 ml CHCl<sub>3</sub> was carried out in the vacuum flask in order to recover a larger amount of extract.

The method of SÖ was followed keeping in mind the adaptations proposed by Axelsson and Gentili (2014) For that, a sample of 100mg microalgal biomass was homogenized with a mixture of CHCl<sub>3</sub> and a solution of methanol: aqueous 0.7% NaCl (4: 1, v/v), resulting in extract of chloroform: methanol: water (1: 2: 0.5, v / v / v). The solvent solution was added, resulting in a solution of chloroform: methanol: water (2: 3.6: 0.9, v / v / v) that was centrifuged. Finally, a solution of chloroform: methanol and aqueous solution (0.73% NaCl) was added, resulting a system of chloroform: methanol: water (1:1:0.8, v / v / v). i.e., After the extraction, the CHCl<sub>3</sub> phase was concentrated under reduced pressure (rotaevaporator), at 40 °C, until dryness. After this procedure, the flasks were weighed in order to determine the lipid fraction content by gravimetry.

### 1.2.3 Fatty acid analysis

For the analysis of fatty acids, the lipids were extracted and quantified following the methods specified above. After measuring the lipid fraction of samples by gravimetry, an aliquot (0.3g) was collected and the fatty acid methyl esters were obtained according to O'Fallon, (2007). Methyl esters were injected (1.0 µL) into a gas-liquid chromatograph (Agilent 7890B series GC system) equipped with an automatic injector (240 °C), a fused silica RTx 2330 column (90% biscyanopropyl/10% cyanopropylphenyl polysiloxane - 105 m x 0.25 mm internal diameter x 0.20 µm) at 120 °C, and an FID detector (300 °C). For the chromatography of the methyl derivatives of fatty acids, the column was initially thermostated at 120 °C, increasing to 186°C at a rate of 3 °C/min following injection and held for 5 min; then ramped at 3 °C/min to a final temperature of 231°C. Helium as carrier gas was used at 2.5 ml/min flow rate and samples were injected in a 1: 40 split ratios. The composition of fatty acids was determined by comparing the retention times of the peaks with those of the respective fatty acid standard (C23: 0 - Sigma Aldrich, MO USA) and normalization area, being expressed as percentage for quantitation purpose.

#### 1.2.4 Fucoxanthin analysis

High-performance liquid chromatography (HPLC) was used for fucoxanthin quantification in both the methanolic fraction and chloroformic one (lipid phase) of the *P. tricornutum* extract. The later fraction was previously dried in a speed-vac apparatus and resuspended in MeOH. An aliquot of each sample (10  $\mu\text{L}$ ,  $n = 3$ ) was injected into a liquid chromatograph (Shimadzu LC-10 A), equipped with a C18 reverse phase column (Vydac 218TP54, 250 mm x 4.6 mm,  $\emptyset$  5  $\mu\text{m}$ , 30  $^{\circ}\text{C}$ ), protected by a C18 reverse-phase guard column (Vydac 218GK54,  $\emptyset$  5  $\mu\text{m}$ ), and a UV-vis detector (450 nm). Elution was performed with MeOH/ CH<sub>3</sub>CN (90: 10, v/v) at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. Fucoxanthin identification was performed using its retention time and co-chromatography of analytical standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Metabolite quantification was based on standard curve of fucoxanthin (1 - 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ;  $y = 0.0513x$ ;  $R^2 = 0.999$ ). Readings were taken in triplicate and results were expressed in mg/g.

#### 1.2.5 Statistical analyzes

Data were collected, summarized, and submitted to the analysis of variance ANOVA, followed by the post hoc Tukey test, when appropriate. The results were considered significant at  $p < 0.05$ . Statistical analyzes were conducted using scripts written in R language (v. 3.1).

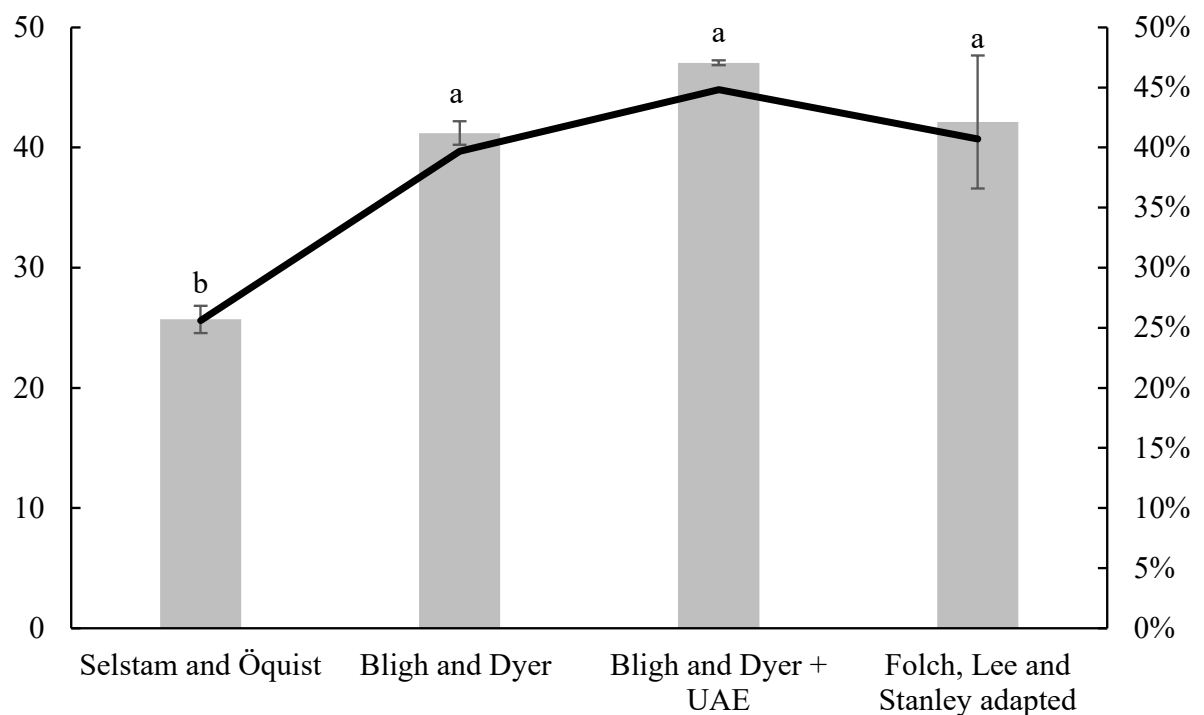
### 1.3 RESULTS AND DISCUSSION

The total lipid content of *Phaeodactylum tricornutum* extracts is shown in Figure 1. The most effective protocols for the extraction of total lipids were BDyer and FLS. The lipid yield increased when ultrasound was added to the process, though the results did not differ statistically. The phenomenon of cell disruption is observed with the aid of ultrasound and occurs through cavitation bubbles formed into the organosolvent extraction solution (RAJAN; PANDIT E; MOHOLKAR, 2001). In liquids exposed to sonication at high intensities, the sound waves that propagate into the liquid media result in alternating high- and low-pressure cycles. During the low-pressure cycle, high-intensity ultrasonic waves create small vacuum bubbles or voids in the liquid. When the bubbles attain a volume at which they can no longer absorb energy, they collapse violently during a high-pressure cycle giving rise to the cavitation phenomenon (SUSLICK et al., 1998). In our study, the protocol associating ultrasound with chemical



extraction (i.e., UAE) increased the yield and reproducibility of the method since considerably lower standard deviation value has been found.

**Figure 1** – Total lipids content in *P. tricornutum* CCAP 1052/1A in four different extraction protocols using filtration. Gravimetric yields (as a /g lipids / 100 mg mass and percentage of dry algal biomass) of total lipids extracted values are represented as mean  $\pm$  standard error. Different letters indicate significant differences among protocols (One-way ANOVA, post hoc Tukey test where  $P < 0.05$ ). UAE= Ultrasonic-assisted Extraction.



The FLS's protocol when performed as originally described presented the lowest yield of extraction, affording only 18% of lipids on average of the dry biomass. The work of ARAÚJO et al., (2013), that also investigated the yield of lipidic extraction in *Chlorella vulgaris* found similar values to the ones presented here. *C. vulgaris* presented yields around 40% and 15% in BD method and FLS, respectively, as in this study. However, the low yield of FLS method could be related to the fact of being the only method that uses the recovered mixture for washing the paper filter in the protocol's second step. In order to reduce the steps and increase the recovery content, the FLS protocol has been adapted. For this, the recovery step of the extract in the filtration was performed with additional 3 ml of chloroform. With this protocol adaptation the lipid content was increased from 18% to 41%. In the other methods the

paper filter is washed with pure solvent, what reduces the number of filtration steps. This additional stage of recovery and washing influenced extractions in small quantities considering the volatility of the solvents used. When the protocol was adapted with the addition of 3 ml chloroform for washing the paper filter, the yield increased, resembling Bligh and Dyer extraction. This difference in yield may imply that when using a small number of solvents, it is necessary to add a washing step of the filtration system with pure solvents. The FLS protocol presented the lowest yield of extraction, affording only 26% lipids on average from the *P. tricornutum* dry biomass. Araújo and collaborators (2013) found a recovery of the *Chlorella vulgaris*' lipidic fraction close (i.e., 15%) to the one herein described by using the FLS protocol (data not shown).

On the other hand, those authors achieved a lipid yield around 40% using the BD method as in this study. The low yield of FLS protocol could be related to the fact of being the only method that uses the recovered mixture to wash the filter in the second step. In the other methods the filter is washed with pure solvent which reduces the number of filtration steps. This additional stage of recovery and washing might influence negatively the extractions of small quantities of target compound(s) due to the volatility of the solvents used. As above described in our study, the FLS's protocol was adapted with the addition of 3 mL chloroform for washing the paper filter, allowing to improve the recovery of metabolites and resembling the performance of the BD extraction method. This differences in the yield values observed may imply that when using a small number of solvents, it is necessary to add a washing step of the filtration system with pure solvents to improve the recovering of the analyte of interest.

The yield extraction was lower with the SÖ protocol that afforded about 26% lipids from dry algal biomass, representing a reduction of almost 20% in relation to the highest yield method, i.e., FLS. Axelsson and Gentili (2014) also adopted the SÖ protocol with modifications to extract lipids from four cultured microalga species (*Scenedesmus dimorphus*, *Chlorella protothecoides*, *Selenastrum minutum* and a polyculture) obtaining the highest income from the later one. This demonstrates the influence cell genotype on the yield of the lipid fraction recovered according to the microalga species.

*P. tricornutum*'s fatty acids profiles determined by gas chromatography showed to be in accordance to previous reports (YANG et al., 2017) Table 1 shows the composition of fatty acids in the lipidic fractions recovered from the microalga samples according to the extraction protocols investigated. Nine saturated and fourteen unsaturated fatty acids were identified in the *P. tricornutum*'s metabolic profile, Interestingly, the fatty acid profiles detected seem to be

protocol-dependent, since a more complete profile was got by recovering the lipidic fraction through the BD method.

The palmitoleic acid (C16:2n4), an omega-7 monounsaturated fatty acid, was the main compound detected in the lipidic fractions studied, varying from 29% to 35% depending on the extraction protocol adopted. Interestingly, palmitoleic acid and a minor compound also detected in the *P. tricornutum*'s lipidome, i.e., the hexadecatrienoic acid (C16:3n4 - HTA) were reported as antibacterial against *Staphylococcus aureus*, with IC50 of 10-20  $\mu\text{M}$  and 20-40  $\mu\text{M}$ , respectively (DESBOIS et al., 2008). The sum of these two FAs in *Phaeodactylum tricornutum* may represent at least 30% of the lipidic fraction in this study. Since palmitoleic acid is active against *S. aureus* in micromolar concentrations (DESBOIS et al., 2008), one could speculate that such high content of antibacterial fatty acids might confer a potential value of that microalga extract in the biotechnology market. Finally, following the extraction protocols investigated in this study, no meaningful differences were detected among BD, FLS, and SÖ methods regarding the recovery of palmitoleic acid (i.e., ~ 35%) from the microalgal biomass. However, the BD protocols when performed assisted with physical methods (ultrasound and microwave exposure) showed significantly lower yields (Table 1).

Significant amounts of palmitic (C16:0, > 19%) and eicosapentaenoic (C20: 5n3, > 14%) acids were also found in the *P. tricornutum* profile, with minor amounts of other saturated and unsaturated fatty acids. Palmitic acid is one of the most common saturated fatty acids found in animals, plants, and microorganisms, being the first fatty acid produced in the biosynthesis pathway of those primary metabolites and the precursor of longer fatty acids (WISHART et al., 2018). Consequently, it commonly appears as one of the major fatty acids in various organisms. The third most abundant fatty acid detected in microalgal samples was eicosapentaenoic acid (C20:5n3-EPA) with concentrations varying from 14% to 17% according to the extraction method (Table 1). The EPA extraction was positively influenced by the physically and chemically assisted extraction processes. Thus, samples exposure to UAE prior to the chemical extraction allowed to increase the yield of fatty acid recovery from 14% to 17%. For instance, the UAE assisted extraction of  $\omega$ -3 DHA (C22:6n3) enabled the BD protocol yield to an increase from 0.79% (non-assisted) to 0.91%. Balasubramanian, Doan and Obbard (2013) also observed increases of yield total lipids by gravimetry when using UAE-assisted extraction methods in studies with *Nannochloropsis* sp. extraction protocols. The data (Figure 1) infers that even when using a small amount of biomass and solvents, it seems advantageous to use a physical method to increase yield. The lipid extraction efficiency is augmented when cell

membranes are lysed by the microwave or ultrasound exposure, facilitating the permeation of solvent and improving the recovery of the target analyte(s).

**Table 1** – Fatty acid composition in the lipid fraction recovered from *P. tricornutum* according to the five extraction protocols studied. Values (%) are presented as mean of two readings of pooled sample of three independent extraction by gas chromatography analysis. Different letters indicate significances among protocols (One-way ANOVA, followed by the *post hoc* Newman Keuls test,  $p < 0.005$ ).

Fatty acids	Bligh and Dyer	Bligh and Dyer + M	Bligh and Dyer + UAE	Selstam and Ochist	Folch, Lee and Stanley
<b>C8:0</b>	1.21 ± 0.001	NA	0.46 ± 0.004	NA	NA
<b>C10:0</b>	0.92 ± 0.032	NA	NA	NA	NA
<b>C12:0</b>	0.71 ± 0.022	0.66 ± 0.019	0.82 ± 0.048	0.25 ± 0.256	0.48 ± 0.016
<b>C13:0</b>	0.52 ± 0.046	0.46 ± 0.001	0.57 ± 0.028	NA	NA
<b>C14:0</b>	7.15 ± 0.011	7.10 ± 0.132	7.52 ± 0.036	7.28 ± 0.040	7.84 ± 0.111
<b>C16:0</b>	20.48 ± 0.159	20.84 ± 0.213	19.27 ± 0.096	21.91 ± 0.164	21.09 ± 0.053
<b>C 16:2n4</b>	35.38 ± 0.277	33.07 ± 0.058	29.64 ± 0.322	35.28 ± 0.038	35.63 ± 0.050
<b>C16:3n4</b>	0.47 ± 0.010	0.47 ± 0.020	0.51 ± 0.014	0.48 ± 0.015	0.49 ± 0.003
<b>C17:0</b>	0.22 ± 0.228	0.44 ± 0.005	0.57 ± 0.001	0.43 ± 0.001	0.46 ± 0.007
<b>C17:1n7</b>	0.92 ± 0.001	0.95 ± 0.003	1.10 ± 0.028	0.95 ± 0.002	0.95 ± 0.007
<b>C18:0</b>	1.15 ± 0.0001	1.46 ± 0.004	1.52 ± 0.010	1.22 ± 0.013	1.10 ± 0.018
<b>C18:1n9t</b>	2.61 ± 0.057	2.85 ± 0.012	3.33 ± 0.017	2.78 ± 0.008	2.79 ± 0.029
<b>C18:1n9</b>	5.69 ± 0.007	5.83 ± 0.005	5.88 ± 0.031	5.81 ± 0.024	5.95 ± 0.019
<b>C 18:1n7</b>	1.61 ± 0.001	1.73 ± 0.002	2.22 ± 0.013	1.71 ± 0.023	1.85 ± 0.034
<b>C18:2n6</b>	1.08 ± 0.001	1.18 ± 0.004	1.56 ± 0.008	1.15 ± 0.053	1.08 ± 0.017
<b>C18:3n6</b>	0.51 ± 0.018	0.51 ± 0.00	0.51 ± 0.015	0.50 ± 0.003	0.53 ± 0.002
<b>C18:4n3</b>	0.83 ± 0.009	0.78 ± 0.005	0.73 ± 0.009	0.78 ± 0.0003	0.84 ± 0.009
<b>C20:3n3</b>	0.29 ± 0.293	0.79 ± 0.008	0.48 ± 0.480	0.68 ± 0.015	0.75 ± 0.006
<b>C20:4n3</b>	0.35 ± 0.002	0.38 ± 0.011	0.20 ± 0.201	0.39 ± 0.003	0.20 ± 0.203
<b>C20:5n3</b>	14.30 ± 0.037	15.80 ± 0.369	17.41 ± 0.128	14.76 ± 0.058	14.78 ± 0.048
<b>C24:1n9</b>	0.44 ± 0.038	0.46 ± 0.00	0.56 ± 0.035	0.20 ± 0.201	NA
<b>C24:0</b>	0.72 ± 0.007	1.04 ± 0.002	1.38 ± 0.025	1.20 ± 0.008	0.98 ± 0.017
<b>C22:6n3</b>	0.79 ± 0.024	0.83 ± 0.010	0.91 ± 0.003	0.80 ± 0.020	0.83 ± 0.019
<b>ΣSFA</b>	33.36	32.03	32.15	32.32	31.99
<b>ΣPUFAt</b>	18.66	20.79	22.34	19.59	19.53
<b>ΣSFA/ΣUFA</b>	0.51	0.49	0.49	0.49	0.48

ND= not detected; SFA= saturated fatty acids; PUFA= polyunsaturated fatty acids; UFA= unsaturated fatty acids; M= microwave; UAE= Ultrasonic- assisted Extraction.

The extraction methods herein investigated demonstrated selectivity regarding the recovery of MUFAs and PUFAs (Table 2) from the microalgal biomass, while no significant differences were noted in the yield of saturated FA recovered. Methods that did not adopted physical treatment of the samples, i.e., microwave and ultrasonic bath previously to the

chemical extraction afforded higher yield of MUFAs, 47.18%. Contrarily, the assisted methods using UAE and microwave and have lower yields, 44.93% for MUFA, respectively. In respect to the PUFA extraction, the addition of physical methods increased up to 4% the yield of the chemical extraction protocols. These results may infer that MUFAs are more sensitive than PUFA to the use of a physical method such as microwave and UAE, previously to the chemical extraction. The proportion of SFAs and PUFAs was around 0.48 to 0.51. The recommended ratio of PUFAs to SFAs for feed should be above 0.4 (MILIĆEVIĆ et al., 2014).

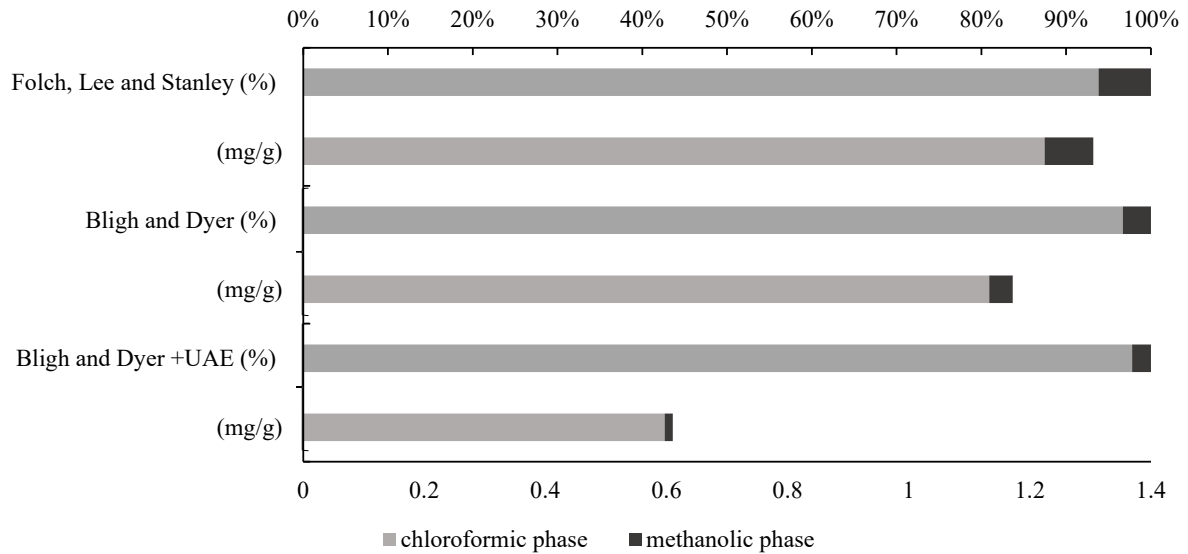
**Table 2** – Selectivity of extraction of saturated fatty acids from *P. tricornutum* biomass. Values (%) are represented as mean of two readings of pooled samples of three independent extraction, as measured by gas chromatography analysis.

	BD	BD+M	BD+UAE	SÖ	FLS
ΣSFA	33.13	32.03	32.15	32.32	31.99
ΣMUFA	46.69	44.93	42.76	46.75	47.18
ΣMUFA+PUFA	65.35	65.72	65.09	66.34	66.71
ΣPUFA <sub>t</sub>	18.66	20.79	22.34	19.59	19.53
ΣPUFA-ω3	17.06	19.09	20.26	17.93	17.91
ΣPUFA-ω6	1.60	1.70	2.08	1.66	1.62
ΣPUFA-ω7	37.93	35.77	32.97	37.95	38.44
ΣPUFA-ω9	8.76	9.16	9.79	8.80	8.74
SATURATED/ UNSATURATED	0.51	0.49	0.49	0.49	0.48
ω6/ω3	0.09	0.09	0.10	0.09	0.09

SFA= saturated fatty acids; PUFA= polyunsaturated fatty acids; UFA= unsaturated fatty acids

In a second approach, and taking into account the extraction protocols that resulted in higher efficiency of recovery of *P. tricornutum*'s lipid fraction (i.e., FLS, BD, and BD + UAE), samples were analyzed regarding their fucoxanthin contents both in CHCl<sub>3</sub> (lipid phase) and MeOH (non-lipid phase) extracts (Figure 2). As expected, due to the hydrophobic nature of this oxycarotenoid, the CHCl<sub>3</sub> phase shown to be quite richer in fucoxanthin (0.6-1.4 mg g<sup>-1</sup> +/- 0.003 dry mass) than the MeOH one, where negligible amounts were found (~0.10 mg g<sup>-1</sup>). For the CHCl<sub>3</sub> phase, the extraction of fucoxanthin did not differ (p> 0.05) among the FLS and BD methods, recovering on average 1.22 mg g<sup>-1</sup> of that pigment. However, in the methanol phase, the extraction of fucoxanthin was superior only in the FLS method extracting 0.08 mg. g<sup>-1</sup> fucoxanthin.

**Figure 2** – Fucoxanthin contents in the two phases in three different extraction protocols from *P. triornutum* CCAP 1052/1A. Values ( $\text{mg. g}^{-1}$  and percentage of dry algal biomass) are represented of three independent ( $n = 3$ ) extraction by liquid chromatography analysis (UHPLC).



#### 1.4 CONCLUSION

When choosing a method for oil and fucoxanthin extraction from *Phaeodactylum triornutum* some protocols are available, eventually with distinct yield performances. The Folch, Lee and Stanley, Bligh and Dyer, and Bligh and Dyer + UAE methods afforded superior lipid recovery yields by gravimetric analysis. Importantly, the Folch, Lee and Stanley method showed to be more selective for MUFAs extraction. On the other hand, the Bligh and Dyer-based protocols are recommended due to their greater selectivity for PUFAs, increasing the nutraceutical value of extracts. Thus, the later protocols seem to be more suitable as effective methodologies for oil extraction, with potential application in food industry, for instance. In respect to the recovery of carotenoids from the microalgal biomass, it is noteworthy that similar results were detected in the relative extraction yield (%) of fucoxanthin in the chloroform phase among the methods studied, the same not being true regarding the extraction performance based on algal biomass ( $\text{mg. g}^{-1}$ ), where the Bligh and Dyer + UAE showed the lowest values. Finally, the microalga *P. triornutum* is a rich source of nutraceutical substances as seen in the course of this work. It has been claimed that a diet based on fatty acids such as EPA and xanthophylls like fucoxanthin can help preventing various chronic diseases that affect millions of people worldwide.

## REFERENCES

- ARAUJO, G. S. et al. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 95–98, 2013.
- AXELSSON, M.; GENTILI, F. A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. 1-6, 2014.
- BALASUBRAMANIAN, R. K.; YEN DOAN, T. T.; OBBARD, J. P. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 929–936, 2013.
- BERGÉ, J.-P.; BARNATHAN, G. Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 96, p. 49–125, 2005.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BOWLER, C. et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 239–244, 2008.
- COONEY, M.; YOUNG, G.; NAGLE, N. Extraction of bio-oils from microalgae. **Separation and Purification Reviews**, v. 38, n. 4, p. 291–325, 2009.
- DESBOIS, A. P. et al. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 755–764, 2008.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.
- GUILLARD, R. R. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. **Culture of Marine Invertebrate Animals**. Boston, MA: Springer, 1975.
- HAUGAN, J. A.; LIAAEN-JENSEN, S. Algal carotenoids 54. Carotenoids of brown algae (Phaeophyceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 1, p. 31–41, 1994.
- JORQUERA, O. et al. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1406–1413, 2010.
- KIM, S. M. et al. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 7, p. 1843–1855, 2012.

MARTINO, A. D. et al. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) accessions. **Journal of Phycology**, v. 43, n. 5, p. 992-1009, 2017.

MARTINS, A. et al. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1066–1101, 2014.

MILIĆEVIĆ, D. et al. The role of total fats, saturated/unsaturated fatty acids and cholesterol content in chicken meat as cardiovascular risk factors. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 1, p. 42, 2014.

MOLINSKI, T. F. et al. Drug development from marine natural products. Nature reviews. **Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 69–85, 2009.

MULLEN, A.; LOSCHER, C. E.; ROCHE, H. M. Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 5, p. 444–450, 2010.

NISHINO, H. et al. Carotenoids in cancer chemoprevention. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 21, n. 3–4, p. 257–264, 2002.

O FALLON, J. V. et al. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 1511–1521, 2007.

PANGESTUTI, R.; KIM, S.-K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 255–266, 2011.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. Lipid content and fatty acids composition variation of microalgae exposed to CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> and NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609–1612, 2008.

RANJAN, A.; PATIL, C.; MOHOLKAR, V. S. Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 6, p. 2979–2985, 2010.

RONGA, D. et al. Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. **Agronomy**, v. 9, n. 4, p. 192, 2019.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, p. 189–198, 2012.

SELSTAM, E.; ÖQUIST, G. Effects of frost hardening on the composition of galactolipids and phospholipids occurring during isolation of chloroplast thylakoids from needles of scots pine. **Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology**, v. 42, n. 1, p. 41–48, 1985.

SIMOPOULOS, A. P. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients**, v. 5, n. 8, p. 2901–2923, 2013.



SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 495–505, 2002.

SUGAWARA, T. et al. Brown algae fucoxanthin is hydrolyzed to fucoxanthinol during absorption by Caco<sup>-2</sup> human intestinal cells and mice. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 5, p. 946–951, 2002.

SUGAWARA, T. et al. Esterification of xanthophylls by human intestinal Caco<sup>-2</sup> cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 483, n. 2, p. 205–212, 2009.

SUSLICK, K. S. et al. Acoustic cavitation and its chemical consequences. **Philosophical Transactions: Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 357, n. 1751, p. 335–353, 1999.

WISHART, D. S. et al. HMDB 4.0 - The Human Metabolome Database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. 608–617, 2018.

YANG, Y.-H. et al. Fatty acid and lipid class composition of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Oil Science**, v. 66, n. 4, p. 363–368, 2017.

### - CAPÍTULO III -

## STABILITY OF THE FUcoxANTHIN MOLECULE FROM THE MICROALGAE *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* STORED IN BIOMASS AND METHANOLIC EXTRACT <sup>3</sup>

### ABSTRACT

The analysis of fucoxanthin (FCX) in algal biomass presents some limitations, especially regarding the sample preservation after collection until extraction of the pigment. FCX degradation was evaluated in *Phaeodactylum tricornutum* biomass and extract samples. Algal biomass and their methanolic extracts were stored in freezers at -20°C and -80°C, for 60 days. Fucoxanthin was quantified through UHPLC-DAD. The methanolic extract of the microalga biomass stored at low temperatures, i.e., -20°C and -80°C, were more effective in preserving FCX, compared to the algal biomass. The linear model regarding the FCX content over storage time demonstrated that the temperature affected the carotenoid stability and concentration either in the algal biomass or their methanolic extracts. Besides, the chromatographic analysis showed an increase in the FCX's peak retention time along with the sample storage, possibly due to the *trans* → *cis* isomerization of the molecule. Finally, *P. tricornutum* presented the highest amounts of FCX compared to other species that also synthesis, reinforcing the importance of this species in biotechnological prospecting. The results indicate that methanolic extract was the best way to preserve the FCX molecule at -80°C. When FCX is stored in biomass, lower temperatures are required so that the FCX content is not affected, with biomass at -20°C being the most harmful form of content according to the mixed linear models. This information is relevant in terms of choosing the best storage protocol to be applied for preserving at most FCX, especially because the geometric conformations of the molecule might change over storage, a trait that strongly affects its biological activities.

---

<sup>3</sup> This chapter is part of an article submitted to the journal **Food Chemistry**. SCHMITZ, C. et al., Evaluation of fucoxanthin stability in micro and macroalgae biomass and in methanolic extracts using four low-temperature storage methods.

## 1.1 INTRODUCTION

The carotenoid market is projected to reach USD 1.53 billion in 2021, essentially concentrated on the production of astaxanthin,  $\beta$ -carotene and lutein (YABUZAKI, 2017; NOVOVESKÁ et al., 2019).

Among the various organisms that synthesize carotenoids, microalgae are recognized as the most effective source due to their high biosynthesis and accumulation (BUTLER et al., 2018). The technological application of carotenoids can be associated, for example, with the nutraceuticals, food and natural pigments markets (AMBATI et al., 2019; HONDA, 2020).

The commercial applications of carotenoids are directly related to their pharmacological properties in the prevention of human diseases, including cardiovascular and other chronic diseases (CHRISTAKI, et al. 2013; TEIXEIRA; FEIO; FIGUEIRA, 2014; WOOD et al., 2005; HEO et al., 2005; HEO et al., 2010). In this sense, carotenoids have been widely used in industry, both as ingredients, additives, food supplements and cosmetics, mainly for their photoprotective effect (AMBATI et al., 2019; RODRIGUEZ-CONCEPCION et al., 2018; PANGESTUTI; SIAHAAN; KIM, 2018). In biotechnology, carotenoids from algae are recognized as potent and can be sources of natural antioxidants, performing the elimination of singlet molecular oxygen and peroxy radicals due to their molecular structure composed of a system of conjugated double bonds that gives them this bioactivity (FOO et al., 2017). Xanthophylls, one of the most important classes of carotenoids in algae, have shown positive effects on the neurological, immune and ophthalmological systems, which translate them into new matrices for the pharmaceutical field (AZIZ et al., 2020).

Among the most studied xanthophylls, FCX represents 10% of biogenic carotenoids, being found in greater amounts in brown algae and diatoms (MATSUNO, 2001; MIKANI; HOSOKAWA, 2013). FCX is a tetraterpenoid with a characteristic linear C<sub>40</sub> molecular skeleton containing up to 11 conjugated double bonds, including an allenic bond, an epoxide and a conjugated carbonyl group in the polyene chain of the molecule (RODRIGUEZ-CONCEPCION et al., 2018; MIKANI; HOSOKAWA, 2013). The presence of conjugated double bonds in its structure contributes to the process of isomerization of the molecule. In nature, FCX is mainly found in all *trans* forms, as *cis* conformers are regularly more thermodynamically unstable and subject to isomerization (NAKAZAWA et al., 2009). The molecular conformation of this compound is relatively unstable and sensitive to light, heat, oxygen, storage conditions and time. Thus, FCX can be altered or even destroyed in biological samples, for example, depending on their storage conditions. The molecule can be altered by

enzymatic or non-enzymatic oxidation and by isomerization, rearrangement, or other chemical reactions over storage time (SCHOEFS, 2002, PIOVAN et al., 2013; BRITTON; KHACHIK, 2009).

Drying and freezing strategies are very relevant and influence the preservation and maintenance of the predictable application of carotenoids in samples and commercialized products, avoiding oscillation in their content and degradation. The choice of method to preserve them must take into account the consequences for the molecules, the costs and procedures involved. Usually, lyophilization has been pointed out as a more effective method to dry and conserve carotenoids in biological samples until the moment of their extraction. In laboratories, FCX molecules can also be extracted with organic solvents and stored at low temperatures until use (RYCKEBOSCH et al., 2011).

In this study, the stability of FCX was investigated, over an experimental period of 60 days, in samples of in vitro cultured cells of the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin (Bacillariophyceae). For this, the lyophilized biomass and its methanolic extract were stored in freezers at -20 °C and -80 °C, after determining their FCX levels to identify the best way to preserve that pigment for 60 days. It is important to emphasize that the species of algae studied has FCX as its main carotenoid, reinforcing the importance of understanding the best strategy for the preservation of this carotenoid in this marine organism (PENG et al., 2011).

## 1.2 MATERIAL AND METHODS

### 1.2.1 Acquisition of biomass

The microalgae Bacillariophyceae *Phaeodactylum tricornerutum* CCAP 1052/1A was cultivated in 500 mL Erlenmeyer flasks for seven days (end of log phase) followed the specifications of MARTINO et al., (2007), where a detailed study of several strains of distinct isolates of *P. tricornerutum* was carried out. Cells were cultured with  $\sim 65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  photon irradiance, provided by cool white fluorescent lamps and a 12h:12h (light: dark) photoperiod at 21°C. Cells were grown in f/2 medium, without additional silicic acid, for routine cell growth (GUILLARD, 1975). The initial concentration of cells per Erlenmeyer was  $22\cdot 10^6$  cells/mL. The culture medium presented pH values around 8 and salinity 31. At the end of the experiment, the cell cultures were collected, centrifuged (2276g, 9 min) and the supernatant discarded. The collected biomass was desalted, washing it quickly with 0.5M ammonium formate solution, followed by lyophilization (36 h, 0.001 mbar).

### 1.2.2 Sample drying and storage

Two thermal storage conditions in a freezer were tested (Figure 1). Initially, the fresh biomass was lyophilized for 55h and after drying, separated into two samples. The first was submitted to an extraction protocol with organosolvent, with subsequent storage in freezers at  $-80^{\circ}\text{C}$  or  $-20^{\circ}\text{C}$ . The second aliquot of algal biomass without further processing after its lyophilization was transferred to dark falcon tubes and stored in freezers at  $-80^{\circ}\text{C}$  and  $-20^{\circ}\text{C}$ . In addition, on sampling days (1, 7, 21, 28 and 60) FCX was extracted from the biomass that was stored dry and directed to quantification analysis along with extracts aliquots, in order to determine the most efficient type of sample for storage, i.e., biomass or extract.

### 1.2.3 Extraction and quantification of fucoxanthin

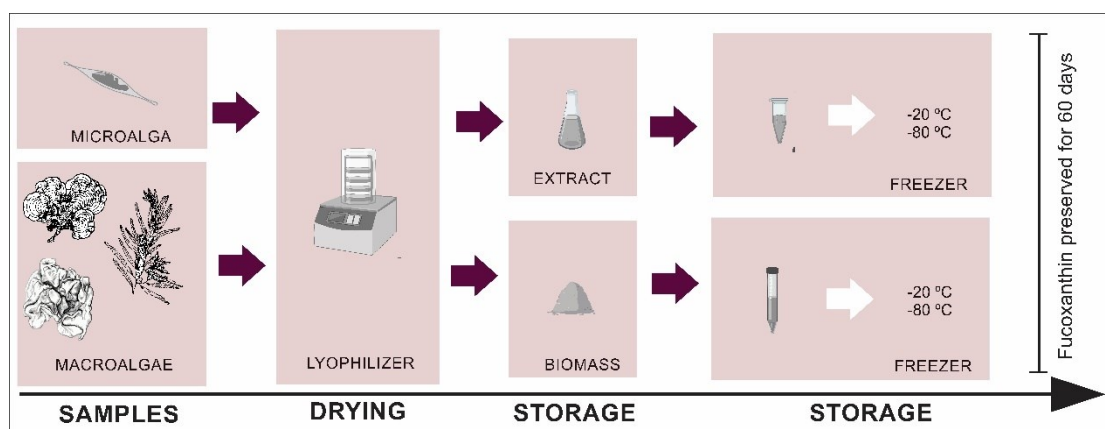
Oxycarotenoid was extracted for 24h using methanol (P.A.) in a 1:50 ratio of dry biomass (mg) and solvent (mL). After extraction, the FCX content in the organosolvent extracts was determined chromatographically on days 1, 7, 21, 28 and 60 (Figure 1). An aliquot of each extracted sample (10  $\mu\text{L}$ ,  $n = 4$ ) was injected into high performance liquid chromatography (Shimadzu LC-10 A), equipped with a C18 reversed phase column (Vydac 218TP54, 250 mm x 4.6 mm,  $\emptyset$  5  $\mu\text{m}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ), protected by a C18 reversed-phase guard column (Vydac 218GK54,  $\emptyset$ 5  $\mu\text{m}$ ) and a UV-vis detector ( $\lambda = 450$  nm). Elution was performed with MeOH:CH<sub>3</sub>CN (90:10, v/v) at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. FCX identification was performed using retention time and analytical standard co-chromatography (fucoxanthin all-trans, CASS number 3351868 - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The quantification of metabolites was based on the FCX standard curve (1-25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $y = 0.0513x$ ;  $R^2 = 0.999$ ). Readings were taken in quadruplicate and results were expressed as mean (mg FCX / g dry biomass)  $\pm$  standard deviation.

### 1.2.4 Data analysis

Chromatographic data were collected, summarized and submitted to one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-hoc test ( $p < 0.05$ ) to verify the variation of FCX concentration during storage days. Data were analyzed by mixed linear models and the correlation coefficient ( $R^2$ ) was calculated to determine the goodness of fit between the

experimental and predicted values. A mixed effects linear regression model was used to evaluate the influence of time and storage, as well as their interaction term on FCX concentrations. The metabolite concentration was used as a dependent variable, time, temperature and its interaction term as a fixed effect and the repeated measurement as a random effect. For this, the scripts were written in R language (v. 4.1.0).

**Figure 1** – Workflow of the main stages of the study. Four different protocols with biomass and methanolic extract storage were investigated for fucoxanthin concentration and stability.



### 1.3 RESULTS AND DISCUSSION

Four protocols for the storage of biomass and its methanolic extract were investigated for their suitability for the conservation of FCX. The methanolic extract was more effective in preserving the molecule compared to dry biomass storage (Table 1). After 60 days, the smallest reduction in FCX concentration observed was 0.1 mg/g, thus demonstrating that the storage of extracts at low temperatures seems to be adequate to protect the molecule from degradation processes. The FCX concentration presented values of 8.1 mg / g of dry biomass. In fact, the microalga species studied proved to be very effective in the synthesis and accumulation of FCX, which reinforces its importance in the biotechnological sciences.

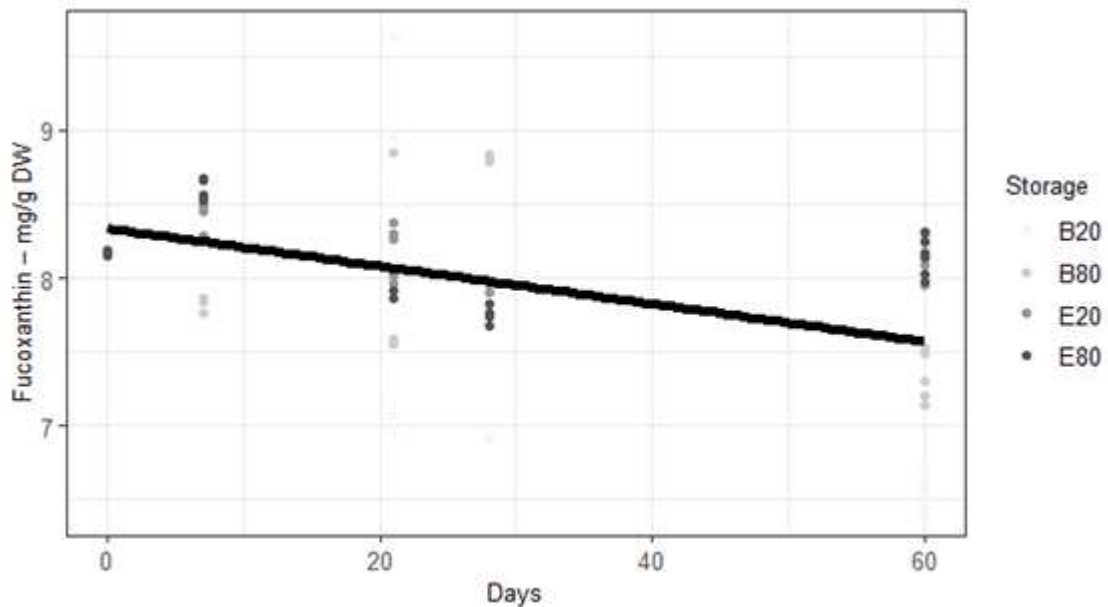
The results demonstrate that by storing freeze-dried microalgae biomass, even in a low temperature freezer (i.e. -20°C), reduction in FCX loss can be achieved to some extent. *P. tricornutum* showed a significant reduction in its FCX contents in biomass stored at -20°C and -80°C. Its lyophilized biomass showed FCX losses, ranging from 8.1 mg / g to 6.5 mg / g (~ 20%) and 7.2 mg / g (~ 11%) after 60 days stored at -20 °C and -80 °C.

**Table 1** – Fucoxanthin contents (mg FCX/g dry weight of biomass) determined by high performance liquid chromatography (UHPLC) in lyophilized *P. tricorutum* biomass and its methanolic extract. Four different storage procedures were followed as described in the Material and Methods section. In bold, values where significant responses were found ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's post-hoc test.

Storage	Days					Pr(>F)
	1	7	21	28	60	
Biomass (-20)	8.1 ± 0.01 ab	8.5 ± 0.03 a	9.1 ± 0.3 a	6.9 ± 0.06 ab	6.5 ± 0.1 c	<b>7.9e-06</b>
Biomass (-80)	8.1 ± 0.01 ab	7.8 ± 0.03 ab	7.2 ± 0.4 b	8.6 ± 0.3 a	7.2 ± 0.1 b	<b>0.04</b>
Extract (-20)	8.1 ± 0.1 ab	8.2 ± 0.1 a	8.2 ± 0.03 a	7.9 ± 0.02 b	8.0 ± 0.08 ab	0.12
Extract (-80)	8.1 ± 0.01 b	8.5 ± 0.05 b	8.6 ± 0.03 a	7.8 ± 0.07 b	8.1 ± 0.1 b	0.44

Temperature was a key factor in the degradation of the molecule over time of storage. The linear models indicate the continuous degradation of FCX in the biomass samples and methanolic extracts over the experimental time of 60 days (Figure 2). To understand how time (measured in days) and storage method change the FCX content individually, a linear mixed-effect model by constrained maximum probability was performed. These models allow us to describe a time trend considering the correlation between successive measures. The model result ( $R^2 = 0.44$ ,  $p = 6.708e^{-11}$ ) corroborates the results of the analysis of variance of the storage methods (Table 2). In the model, the FCX content data correlated negatively with the day factor with a coefficient of  $-0.0338$  ( $p = 1.78e^{-12}$ ). The extracts reserved at  $-80^\circ\text{C}$  showed significant results when the coefficients of positive values related to the storage method were verified (Table 2). For samples stored in biomass, temperature was the limiting factor, it is possible to observe that the FCX content was more stable when stored at  $-80^\circ\text{C}$ . In summary, the model indicates that the best method to preserve the FCX molecule is in extract at  $-80^\circ\text{C}$ . When FCX is stored in biomass, lower temperatures are required so that the FCX content is not affected, with biomass at  $-20^\circ\text{C}$  being the most harmful form of storage according to the models.

**Figure 2** – Distribution of FCX content data (mg/g) during the storage of algae biomass and its methanolic extract at -20°C and -80°C. The mixed linear model constructed (in black) indicates a wide range of detected values for the variable under study. The model represents the distribution of the response variable (fucoxanthin) by species and storage form (legend) in relation to the continuous variable time (day) for *P. tricornutum*.



It has been reported that temperature influences the oxidative degradation of fully trans molecules and allows their isomerization in the cis conformation (ZHAO et al., 2014). This is because the effect of temperature on FCX causes more intense geometric isomerization, producing more unstable Z isomers, while the total oxycarotenoid content is not significantly altered, but is more prone to generate apocarotenoids (APARICIO-RUIZ; MÍNGUEZ-MOSQUERA; GANDUL-ROJAS, 2011).

**Table 2** – Linear mixed fit model: fucoxanthin range quantified from samples (n = 120) of biomass and storage of frozen methanolic extracts at -20°C and -80°C of the microalgae *P. tricornutum*. Two variables were used in the model (day and storage method). In bold, values where significant responses were found ( $p < 0.05$ ).

Residual	R <sup>2</sup>	F value	p-value	variable	Estimate	SD	t value	Pr(> t )
0.4829	0.44	11.7	<b>6.708E-11</b>	Intercept	8.650	0.1304	66.335	<b>2.00E-16</b>
				day	-0.033	0.0042	-8.007	<b>1.78E-12</b>
				Biomass -80°C	-0.463	0.1861	-2.487	<b>0.0144</b>
				Extract -20°C	-0.404	0.1844	-2.196	<b>0.0303</b>
				Extract -80°C	-0.385	0.1905	-2.022	<b>0.0457</b>
				day: Biomass -80°C	0.022	0.0059	3.799	<b>0.0002</b>
				day: Extract -20°C	0.031	0.0059	5.324	<b>5.89E-07</b>
				day: Extract -80°C	0.029	0.0059	4.991	<b>2.42E-06</b>



Regarding the amounts of FCX found in this study, it can be noted that the storage of this pigment in organosolvents, that is, methanol, seems to be the best way to preserve it compared to algal biomass. However, when analyzing the HPLC profiles, it was possible to notice an increase in the retention time of this compound for all investigated samples, eventually demonstrating a change in the molecular conformation of FCX (Table 3). The increase in retention times of compounds in liquid chromatography methods is typically found as a result of the conversion of *trans* to *cis* isomers (NAKAZAWA et al., 2009; BRITTON; KHACHIK, 2009).

In Nakazawa's work, FCX was extracted from *Fucus* sp. and more than 80% of the pigment content occurred as E (*trans*) isomers. When stored at low temperature (5 °C) for two months, the FCX molecule underwent geometric isomerization to the Z (*cis*) conformation, increasing its retention time, corroborating the findings of this study. These authors, using HPLC and NMR spectroscopy, indicated that the main *cis* isomers found were 13-*cis*, 13'-*cis* and 9'-*cis*. Thus, the storage of FCX at low temperatures influences the geometric conformation of the molecule, eventually without expressive reduction in its content in the samples. Importantly, the isomerization of the molecule can subsequently affect its stability in the extract.

**Table 3** – Retention times to monitor the conversion of fully trans fucoxanthin to its *cis* conformation during 1, 7, 21, 28 and 60 days of storage by UHPLC-UV-vis. Fucoxanthin was extracted from *P. tricornutum* biomass following the protocols described in the Material and Methods section and summarized in Figure 1.

Storage	Retention time				
	1	7	21	28	60
Biomass (-20)	2.053	2.057	2.090	2.107	2.083
Biomass (-80)	2.053	2.063	2.093	2.113	2.083
Extract (-20)	2.053	2.067	2.093	2.103	2.083
Extract (-80)	2.053	2.073	2.097	2.107	2.083

## 1.4 CONCLUSION

The methanolic extracts kept at -20°C and -80°C preserved the FCX levels for longer than the biomass of the species studied. In addition, the type of geometric conformation of the

FCX resulting from each form of storage, that is, biomass or extract, must also be considered, knowing that the conformation of the molecule strongly determines its bioactivity. This information is relevant in connection with quality control protocols for stored samples containing that pigment, especially since the bioactivity of the different geometric conformations of the molecule is well known and important for its applications in biotechnological products and processes. For the purpose of the work, where the objective is solely the quantification and its extraction does not exceed the limit of 21 days, the chosen storage method was biomass at -80°C.

## REFERENCES

- AMBATI, R. R. et al. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and prospects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 12, p. 1880–1902, 2019.
- APARICIO-RUIZ, R.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; GANDUL-ROJAS, B. Thermal degradation kinetics of lutein,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin in virgin olive oils. **Journal of Food Composition and Analysis**: an official publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems, v. 24, n. 6, p. 811–820, 2011.
- AZIZ, E. et al. Xanthophyll: Health benefits and therapeutic insights. **Life Sciences**, v. 240, n. 117104, p. 1-12, 2020.
- BRITTON, G.; KHACHIK, F. Carotenoids in Food. In: **Carotenoids**. Basel: Birkhäuser Basel, p. 45–66, 2009
- BUTLER, T. O. et al. Media screening for obtaining *Haematococcus pluvialis* red motile macrozooids rich in astaxanthin and fatty acids. **Biology**, v. 7, n. 1-16, 2017.
- CHRISTAKI, E. et al. Functional properties of carotenoids originating from algae: Functional properties of algal carotenoids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 1, p. 5–11, 2013.
- FOO, S. C. et al. HPLC fucoxanthin profiles of a microalga, a macroalga and a pure fucoxanthin standard. **Data in Brief**, v. 10, p. 583–586, 2017.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: **Culture of Marine Invertebrate Animals**. Boston, MA: Springer US., p. 29–60, 1975
- HEO, S.-J. et al. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, v. 48, n. 8–9, p. 2045–2051, 2010.

HONDA, M. Nutraceutical and Pharmaceutical Applications of Carotenoids. **Pigments from Microalgae Handbook**. p. 449–469, 2020.

MARTINO, A. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions 1. **Journal of Phycology**, n. 5, p. 992–1009, 2007.

MATSUNO, T. Aquatic animal carotenoids. **Fisheries Science: FS**, v. 67, n. 5, p. 771–783, 2001.

MIKAMI, K.; HOSOKAWA, M. Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13763–13781, 2013.

NAKAZAWA, Y. et al. Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 1, p. 88–97, 2009.

NOVOVESKÁ, L. et al. Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. **Marine Drugs**, v. 17, n. 11, p. 1–22, 2019.

PANGESTUTI, R.; SIAHAAN, E. A.; KIM, S.-K. Photoprotective substances derived from marine algae. **Marine Drugs**, v. 16, n. 11, p. 1–16, 2018.

PENG, J. et al. Fucoxanthin, a marine carotenoid presents in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. **Marine Drugs**, v. 9, n. 10, p. 1806–1828, 2011.

PIOVAN, A. et al. Fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*: photostability and coextractive effects. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6298–6310, 2013.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. et al. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. **Progress in Lipid Research**, v. 70, p. 62–93, 2018.

RYCKEBOSCH, E. et al. Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11063–11069, 2011.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 11, p. 361–371, 2002.

TEIXEIRA, J.; FEIO, M.; FIGUEIRA, M. L. O papel do stress oxidativo no envelhecimento e na demência. **Psilogos: Revista do Serviço de Psiquiatria do Hospital Fernando Fonseca**, v. 12, p. 43–57, 2014.

WOOD, L. G. et al. Airway and circulating levels of carotenoids in asthma and healthy controls. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24, n. 6, p. 448–455, 2005.

YABUZAKI, J. Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. **Database: the journal of biological databases and curation**, v. 2017, 2017.

ZHAO, D. et al. Effects of heating, aerial exposure and illumination on stability of fucoxanthin in canola oil. **Food Chemistry**, v. 145, p. 505–513, 2014.

## - CAPÍTULO IV -

### **PERFIL METABÓLICO DINÂMICO DE *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* CCAP 1052/1A COM ÊNFASE NA BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS E FUCOXANTINA EM CULTIVOS IN VITRO: SUBSÍDIOS À ENGENHARIA METABÓLICA**

#### **RESUMO**

As microalgas têm se destacado na busca por fontes alternativas de matérias-primas e bioprodutos, acumulando compostos de alto valor econômico. Mais recentemente, seus sistemas de produção têm se concentrado no conceito de biorrefinaria para viabilizar o cultivo em escala comercial. Para o desenvolvimento de processos biotecnológicos seguindo uma abordagem de biorrefinaria, é necessário conhecer a matriz bioquímica das microalgas e como os metabólitos oscilam nas células durante o cultivo. Dentre as espécies promissoras, *Phaeodactylum tricornutum* tem se destacado, sintetizando compostos como o ácido eicosapentenoico (EPA) e o carotenoide fucoxantina (FCX). Este trabalho visa criar subsídios para otimizar o processo de biorrefinaria aplicado a *P. tricornutum* CCAP 1052/1A utilizando metabolômica e biologia computacional. Para tanto, foram realizadas análises direcionadas (cromatografia líquida e gasosa) e não direcionadas (espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e ressonância magnética nuclear de prótons) ao longo das etapas de cultivo. O objetivo foi descrever o perfil metabolômico de microalgas para melhor compreensão das alterações metabólicas durante o cultivo celular e, assim, traçar estratégias para otimizar o processo de biorrefinaria. Análises direcionadas mostraram que a maior concentração de EPA ocorre no último dia da fase logarítmica de crescimento, com acentuada redução na fase estacionária, enquanto a FCX permanece estável desde o início da fase logarítmica até o início da fase estacionária. As análises não direcionadas permitiram obter perfis metabólicos atribuindo grupos funcionais às suas bandas de absorvância, para então analisar como as classes metabólicas oscilam durante o cultivo. Fosfolipídios, amidos e lipídios foram as classes químicas mais explicativas, com maior intensidade de banda nos espectros de FTIR no final da fase logarítmica, enquanto a banda de carboidratos apresentou os maiores valores durante a fase estacionária. Ao acoplar esta informação à estratégia de cultivo visando melhorar os teores intracelulares de EPA e FCX, o melhor momento para finalizar o cultivo celular é no final da fase logarítmica, devido à estabilidade do teor de FCX e à diminuição dos teores de EPA na fase estacionária. Na análise de <sup>1</sup>H-NMR foram destacadas, por análise computacional, três potenciais vias metabólicas para otimizar a biossíntese de EPA e FCX em *P. tricornutum*, i.e.,

Alanina, Piruvato e Glioxilato. A maioria das estratégias projetadas *in silico* mostrou estar diretamente relacionada à regulação negativa de certas vias biossintéticas, disponibilizando mais acetil-CoA e piruvato para serem canalizados pelas células para a síntese de EPA e FCX. Tanto o acetil-CoA quanto o piruvato são moléculas altamente energéticas que participam de diversas vias metabólicas, tornando complexa a sua modulação no metabolismo celular, e demonstrando o maior potencial para otimizar a biossíntese e acúmulo de EPA e FCX. Assim, acoplando metabolômica e biologia computacional parece possível otimizar o sistema de biorrefinaria de microalgas, sendo uma ferramenta promissora na melhoria de processos biotecnológicos que visam a modulação metabólica.

## 1.1 INTRODUÇÃO

A busca por novos recursos biológicos tem aumentado globalmente para atender aos desafios de desenvolver sistemas sustentáveis de produção e consumo em uma sociedade que sofre com problemas como o esgotamento dos recursos naturais, a crise energética e as mudanças climáticas. O cultivo de microalgas tem sido reivindicado como um sistema de produção mais sustentável para novas matérias-primas biológicas e produtos químicos, com potencial para mitigar o impacto ambiental do manejo agrícola convencional (SINGH; DHAR, 2019). Embora as microalgas produzam compostos de alto valor econômico, o processo ainda não é economicamente sustentável (TREDICI et al., 2015), a menos que tais compostos sejam explorados simultaneamente seguindo uma abordagem de biorrefinaria com produtos multifinal (CARRIJO et al., 2015). Assim, a extração de mais de um metabólito da biomassa algal se enquadra no conceito de biorrefinaria, que vem sendo continuamente reconhecido como um modelo de produção econômica e ambientalmente sustentável. Reduzir custos e aumentar rendimentos são ações que afetam diretamente o crescimento e o potencial competitivo dos sistemas de cultivo de microalgas.

Para o desenvolvimento de processos biotecnológicos alinhados ao conceito de biorrefinaria, é necessário conhecer melhor a matriz bioquímica da microalga e como os metabólitos alvo oscilam nas células cultivadas. Com o rápido desenvolvimento de tecnologias metabolômicas, novas possibilidades estão surgindo para uma descrição mais abrangente do metabolismo de microalgas e seus mecanismos de regulação com base em dados de biologia de sistemas derivados de análises ômicas e de rotulagem (JAGADEVAN et al., 2018). Dentre as espécies de microalgas marinhas consideradas promissoras para a biossíntese de compostos de

alto valor agregado, *Phaeodactylum tricornerutum* tem se destacado como modelo biológico. Essa espécie apresenta vantagens para uso biotecnológico, como o genoma sequenciado (BOWLER et al., 2008), cultivo em escala comercial (BENAVIDES et al., 2013) e alta produção de biomassa com acúmulo de lipídios (BELLOU et al., 2014). Considerando o conceito de biorrefinaria, que visa maximizar o aproveitamento da biomassa produzida por uma determinada espécie, *P. tricornerutum* possui alto potencial biotecnológico, sintetizando compostos de alto valor econômico como o ácido eicosapentenoico (EPA) e o oxicarotenoide fucoxantina (FCX) (GAO et al., 2017).

A biossíntese desses compostos é influenciada pelas condições de cultivo às quais as células são expostas. O efeito dos indutores na biossíntese do metabólito alvo pode gerar ganhos significativos de rendimento. Assim, o uso de indutores que alteram o fluxo metabólico em a conexão com o conceito de biorrefinaria pode mitigar custos, possibilitando o cultivo de microalgas em escala comercial de forma rentável. A alteração dos fluxos metabólicos é uma estratégia que visa projetar o aumento da eficiência da síntese dos compostos desejados e é reconhecida como engenharia metabólica. O aumento das pesquisas nessa área está associado à sua capacidade de prever determinados fenótipos, sob diferentes condições ambientais e genéticas (ROCHA et al., 2010). Com o objetivo de promover uma otimização desses processos, este trabalho faz uso das ciências ômicas para melhor compreender o perfil metabólico dinâmico de *P. tricornerutum*, identificando potenciais alvos metabólicos para o aprimoramento do método de produção *in vitro* e em larga escala.

A fim de promover a otimização do processo de biorrefinaria da espécie, este trabalho faz uso da metabolômica para melhor compreender o perfil metabólico dinâmico de *P. tricornerutum* CCAP 1052/1A, identificando potenciais alvos metabólicos ao aprimoramento do método de produção. Para tanto, foram realizadas análises direcionadas através das cromatografias líquida e gasosa, a fim de quantificar os compostos de interesse, bem como análises não direcionadas, via espectroscopia no infravermelho médio e ressonância magnética nuclear, buscando identificar as oscilações metabólicas ao longo do crescimento das culturas. O objetivo desta estratégia é descrever o perfil metabolômico da microalga, a fim de encontrar padrões de dados que forneçam informações metabólicas que auxiliem na otimização do processo de biorrefinaria de *P. tricornerutum*.

A partir dos perfis bioquímicos detectados foi possível melhor compreender a oscilação dos metabólitos celulares e assim, com o auxílio de ferramentas computacionais, traçar estratégias de quais vias metabólicas e em qual momento da cultura a engenharia metabólica deverá ser aplicada. Neste trabalho, seguindo primeiramente uma abordagem de biologia de

sistemas, onde ferramentas de mineração de dados foram adotadas para apoiar a formulação de hipóteses à identificação e supressão de vias metabólicas alvo, i.e., associadas ao aumento da biossíntese de compostos de alto valor econômico (e.g., EPA e FCX), otimizando assim o processo de biorrefinaria aplicado à *P. tricornutum*. Assim, a abordagem de estudo aplicou ferramentas de metabolômica e bioinformática para elucidar possíveis vias a serem inibidas ou eliciadas, direcionando o fluxo metabólico para a síntese de compostos alvo.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 Cultura e preparação de biomassa

As condições de cultivo de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A seguiram as especificações de Martino et al., (2007). As células foram cultivadas com irradiância de  $\sim 65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de fótons, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias e um fotoperíodo de 12h:12h (claro: escuro), à 21°C. As células foram cultivadas em meio f/2, sem ácido silícico adicional, para o crescimento celular de rotina (GUILLARD, 1975). A concentração inicial de células por Erlenmeyer de 500 mL foi de  $22 \cdot 10^6$  células/mL. O meio de cultura apresentou valores de pH em torno de 8 e salinidade 31. No final do experimento, as culturas celulares foram coletadas, centrifugadas (2276 xG, 9 min) e o sobrenadante descartado. A biomassa coletada foi dessalinizada, lavando-a rapidamente com solução de formiato de amônio 0,5M, seguido de liofilização (36 h, 0,001 mbar) e armazenamento à -80°C até a extração. O cultivo foi realizado por bateladas isoladas e repetido quatro vezes para gerar biomassa para as análises metabolômicas, gerando um *pool* de amostras para cada dia de cultivo.

### 1.2.2 Curva de crescimento

Os cultivos para análise de parâmetros cinéticos utilizaram as condições descritas em MARTINO (2007). Para obter os dados durante um período experimental de 18 dias, foram tomadas alíquotas diárias de 1 mL do cultivo fixadas com lugol para contagem celular, e medidas de pH e salinidade do meio. A contagem de células na câmara de Neubauer foi realizada em microscópio óptico e em aumento de 40X, expressando-se os valores em células por litro (célula. mL<sup>-1</sup>).



### 1.2.3 Extração de lipídios

Considerando os resultados apresentados no capítulo 2, utilizou-se o método BLIGH; DYER (1959) à extração lipídica microalgal. Para tal, foram adicionados a 300 mg de biomassa liofilizada de microalgas, 3 mL de metanol (MeOH) e 3 mL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), seguido de agitação (vórtex) por 30s. Na sequência, foram adicionados 1 mL de CHCl<sub>3</sub>, 1 mL de MeOH e 2 mL de água, após incubação por 10 min, com eventual agitação (vórtex, 30s, a cada 2 min). Posteriormente, o extrato foi centrifugado por 13 minutos (2276 xG, 9 min). Esse processo resultou em um extrato trifásico de clorofórmio, metanol e água, aproximadamente na razão 2:2:1,8 (v/v/v). A fase clorofórmica foi selecionada e o restante descartado.

### 1.2.4 Análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa

Para a análise de ácidos graxos, os lipídios foram extraídos e quantificados seguindo os métodos especificados acima (1.2.3). Após a extração da fração lipídica, uma alíquota foi coletada e os ésteres metílicos de ácidos graxos foram obtidos de acordo com O'FALLON (2007). Os ésteres metílicos foram injetados (1,0 µl) em cromatógrafo líquido/gasoso (Agilent 7890B), equipado com um injetor automático à 240 °C, coluna CP 7487 e um detector FID (300°C). Para a cromatografia dos derivados metilados dos ácidos graxos, a coluna foi termostaticada da seguinte forma: 120°C, seguido de elevação à 186°C (3°C/min, 5 min) e posteriormente à 230°C (3°C/min) até o final da análise. Um fluxo de 2,5 mL / min de gás portador (He) e split de injeção de 1:40 foram utilizados, resultando em sensibilidade adequada à identificação e quantificação dos analitos. A composição dos ácidos graxos foi determinada pela comparação dos tempos de retenção dos analitos em relação a padrões analíticos de ácidos graxos (C23: 0 Sigma-Aldrich, MO - EUA) e a quantificação considerou a normalização da área dos picos de interesse, sendo os valores expressos em porcentagem.

### 1.2.5 Análise de fucoxantina por cromatografia líquida

Cromatografia líquida de alta eficiência (UHPLC) foi utilizada para quantificação de FCX no extrato de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A. Uma amostra de 20 mg de biomassa seca foi adicionada de 4 mL de metanol, seguido de maceração e incubação em ausência de luz por 1 h. Uma alíquota de cada amostra do extrato metanólico (10 µL, n = 3) foi injetada em um cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A), equipado com uma coluna de fase reversa C18

(Vydac 218TP54, 250 mm x 4,6 mm,  $\pm 5 \mu\text{m}$ , 40 °C), protegido por uma coluna de proteção de fase reversa C18 (Vydac 218GK54,  $\pm 5 \mu\text{m}$ ) e um detector UV-vis (450 nm). A eluição foi realizada com MeOH/CH<sub>3</sub>CN (90: 10, v/v) a uma taxa de fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. A identificação da fucoxantina foi realizada utilizando seu tempo de retenção e co-cromatografia do padrão analítico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A quantificação do metabólito foi baseada em curva padrão da fucoxantina (1-25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $y = 0,0513x$ ;  $R^2 = 0,999$ ). As leituras foram feitas em triplicatas e os resultados foram expressos em g/mg em matéria seca.

### 1.2.6 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos a partir de biomassa liofilizada (0,5 g) e pastilhas de KBr, em espectrômetro com transformada de Fourier FTLA2000 ABB Bomem, equipado com acessório de refletância total atenuada (ATR). Uma pastilha de KBr foi usada para aquisição do espectro de linha de base. Os espectros foram adquiridos no modo de transmitância, na janela espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 2,04  $\text{cm}^{-1}$ , resultando em 1765 pontos. Foram obtidas 128 varreduras co-adicionadas antes da transformação de Fourier para cada espectro de cada amostra. Após a aquisição dos espectros, foram consideradas algumas regiões *fingerprints* e nomeadas de bandas. Foram consideradas seis bandas seguindo os seguintes comprimentos de onda, onde A = 1064-880 $\text{cm}^{-1}$ , B = 1350-1190 $\text{cm}^{-1}$ , C = 1575-1480 $\text{cm}^{-1}$ , D = 1705-1575 $\text{cm}^{-1}$ , E = 1780-1708 $\text{cm}^{-1}$  e F = 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  (STEHFEST; TOEPEL; WILHELM, 2005). Estas bandas foram submetidas a soma destes intervalos e posteriormente calculadas a razão entre estas bandas onde os resultados serão nomeados de taxas.

### 1.2.7 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros unidimensionais (<sup>1</sup>H-RMN) das amostras de extratos metanólicos foram obtidos junto ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Laboratório Nacional de Biociências (CNPEN, Campinas, SP). Para estes experimentos, o extrato foi obtido como descrito acima à análise de fucoxantina. O extrato metanólico foi seco em centrífuga com vácuo modelo *speedvac*, e posteriormente liofilizado (24 h) e armazenado à -80°C. Para realizar as leituras, o extrato seco foi ressuspense em 600  $\mu\text{L}$  de metanol deuterado com TSP (fosfato trissódico- Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) como padrão de referência interno. Para a aquisição do espectro, foram

utilizados 256 *scans* e 4 *stade state*. Os espectros  $^1\text{H-RMN}$  foram processados usando o *software* Bayesyl (RAVANBAKSH et al., 2015). Este sistema executa o pré-processamento do espectro, incluindo a transformação de Fourier, filtragem de solventes, referência de deslocamento químico, correção da linha de base e convolução da forma da linha de referência automaticamente. Os espectros  $^1\text{H-RMN}$  resultantes foram contrastados com uma biblioteca espectral de referência (RAVANBAKSH et al., 2015) e o conjunto de metabólitos identificados foi inserido na plataforma MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>) usando como referência o metabolismo de *Chlorella variabilis* (KEGG). Esta representação das vias fora submetida a análise de super-representação e análise de topologia de caminho. A análise de super-representação foi realizada utilizando um teste hipergeométrico onde prevê a distribuição de probabilidade discreta identificando quais subpopulações estão super-representadas ou sub-representadas. Estes dados são representados com um gráfico direcionado auxiliando na identificação dos caminhos mais relevantes. A análise de topologia de caminho prevê o impacto da via e é baseada em medidas de centralidade das vias geradas realizando a soma das medidas de importância dos metabólitos correspondentes, normalizadas pela soma das medidas de importância de todos os metabólitos em cada via.

### 1.2.8 Análises estatísticas

Os dados de concentração dos compostos de interesse foram coletados, resumidos e submetidos à análise de variância ANOVA, seguida pelo teste post hoc de Tukey, quando apropriado. Dados do somatório de bandas do espectro de infravermelho médio e suas taxas foram submetidos ao teste *t-student* pareado entre os dias de cultivo. Os resultados foram considerados significativos com  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas usando scripts escritos na linguagem R (v. 3.1).

## 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.3.1 Concentrações celulares de EPA e FCX durante o cultivo *in vitro*

As análises metabolômicas dos cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A foram direcionadas a fim de verificar a oscilação de EPA e FCX ao longo de 18 dias de cultivo *in*

*vitro*. Análises cromatográficas demonstraram que os tempos de cultivo celular para obtenção de maiores concentrações dos metabólitos de interesse são entre 6 e 10 dias, respectivamente para EPA e FCX. Estes resultados de composição bioquímica do cultivo em diferentes tempos correlacionados com a curva de crescimento refletem o potencial fisiológico da produtividade no contexto do modelo de biorrefinaria pretendido à espécie em estudo.

A oscilação da concentração celular no cultivo de 18 dias foi representada sob a forma de uma curva de crescimento (Figura 1). Três fases do crescimento celular são observadas (LAG, LOG e estacionária), porém as amostras coletadas no 18º dia de cultivo não apresentaram estágio de senescência avançado em todos os frascos. Como as células já estavam aclimatadas às condições de cultivo, a fase LAG foi curta, com duração de 16h. Na segunda coleta (dia 2) foi possível aferir um crescimento logarítmico que durou até o 6º dia. No 8º dia ocorreu um decaimento na concentração celular que também foi vista em cultivos de manutenção da cepa (dados não apresentados). Nas coletas posteriores, os valores de concentração celular não apresentaram oscilação relevante. A partir do 16º dia de cultivo detectou-se uma queda da concentração celular de FCX em alguns frascos dos cultivos até o 18º dia, inferindo que estes já entravam na fase de senescência. Esta fase de senescência é acompanhada pela limitação de nutrientes no meio, inibindo a capacidade fotossintética e o crescimento celular, via repressão da maioria dos genes associados à fotossíntese e à biossíntese da clorofila (ALIPANAH et al., 2015).

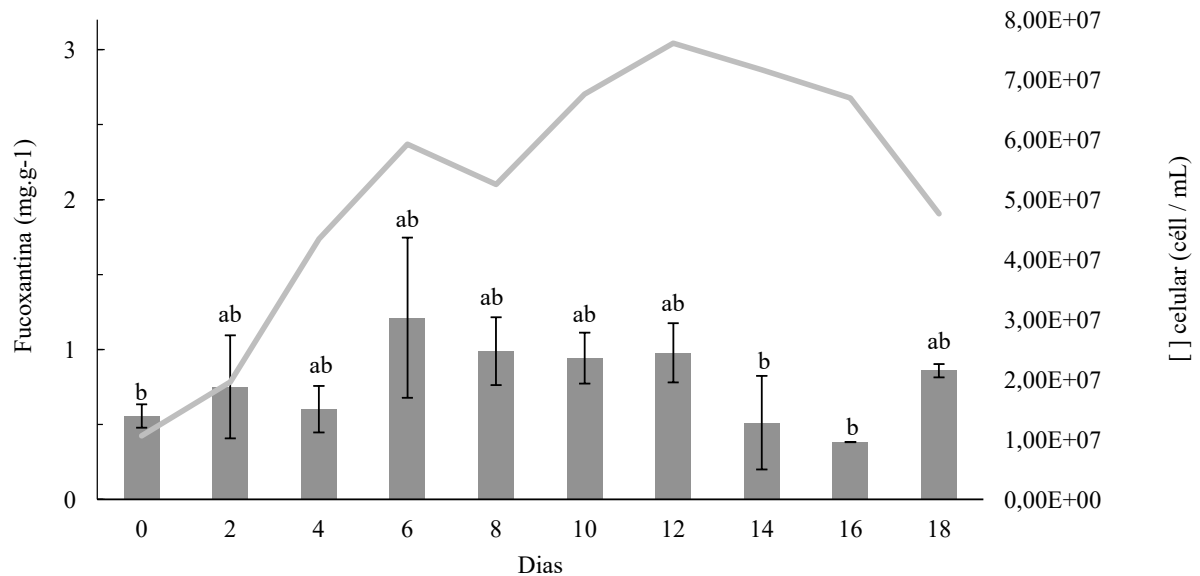
Os conteúdos de FCX, determinados a partir de um *pool* de três réplicas do extrato metanólico, são mostrados na Figura 1. Os valores médios oscilaram entre 1 e 2 mg/g de FCX e assemelham-se ao já publicado anteriormente por WU et al., (2016), mesmo utilizando apenas metade do tempo de extração aqui descrito. No entanto, outros trabalhos relatam rendimentos daquele pigmento bastante superiores, com modificações na forma de cultivo e extração, alcançando teores em torno de 15,7 mg g<sup>-1</sup> DW (KIM et al., 2012). Todavia, ressalta-se que o objetivo do trabalho neste momento é ter uma visão ampla do metabolismo para posteriormente otimizar a síntese e extração destes compostos.

Entre o 2º e o 12º dia de cultivo não ocorreram oscilações com diferenças significativas de crescimento celular, observando-se valores médios com menores desvios-padrão entre o 8º e 12º dias. Estes valores representam uma maior estabilidade da concentração de FCX nos cultivos. A partir destes resultados, foi estabelecido o referencial de 10 dias de cultivo, buscando-se uma maior produtividade do metabólito em menor tempo.

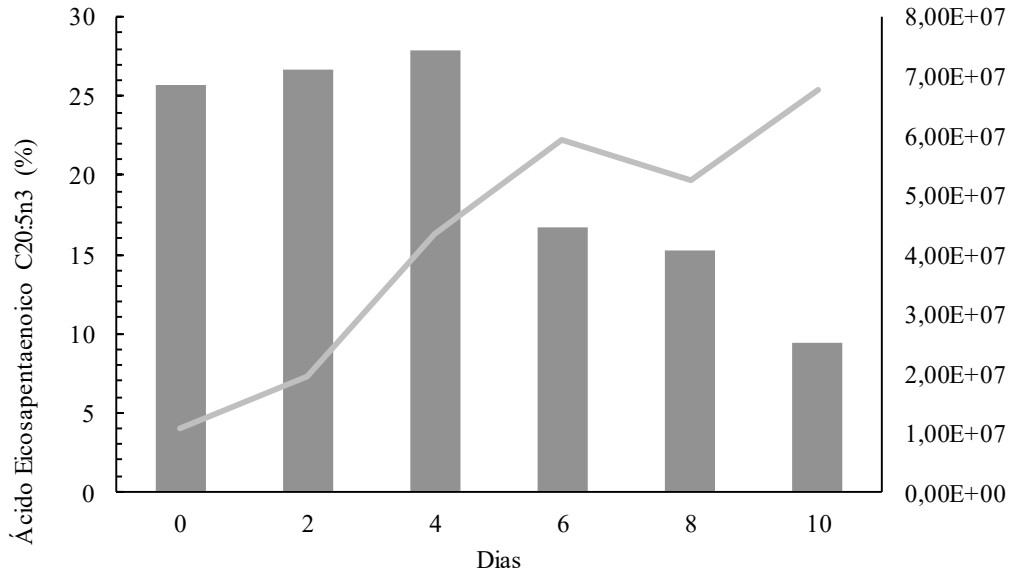
O perfil quali/quantitativo de ácidos graxos durante os 10 dias de cultivo é representado na Tabela 1. Constata-se que os compostos majoritários identificados estão de acordo com o

descrito na literatura à espécie (OKAUCHI; TOKUDA, 2003; WU, et al., 2016), onde os ácidos graxos saturados e insaturados com cadeias carbônicas com C16:0; C16:1, C18:1 e C20:5 foram os mais abundantes, independente do período amostral. O conjunto de AGs insaturados majoritários reafirma a importância da espécie em processos industriais, já que estes compostos apresentam comprovadas aplicações nutracêuticas e farmacológicas (DESBOIS et al., 2008; MILIĆEVIĆ et al., 2014). Além disso, o AG saturado C16:0 (ácido palmítico) é conhecido como precursor de AGs de cadeia longa (WISHART et al., 2018), eventualmente revelando a disponibilidade de precursor à biossíntese daqueles metabólitos de maior peso molecular.

**Figura 1** – Conteúdo de FCX (fucoxantina) (mg/g) em biomassa de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A ao 18º dia de cultivo *in vitro*, em meio de cultura f/2. A linha cinza representa a contagem média de células durante o cultivo. Os valores representam a média de três amostras independentes. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os dias (ANOVA de uma via, teste *post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ ).



**Figura 2** – Conteúdo de EPA (ácido eicosapentenoico) (mg/g) em biomassa de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A ao 10º dia de cultivo *in vitro*, em meio de cultura f/2. A linha cinza representa a contagem média de células durante o cultivo. Os valores representam a média de três amostras independentes.



Os dados da tabela 1 demonstram que o perfil de ácidos graxos (AGs) pode ser dividido em dois grupos, onde nos primeiros cinco dias observa-se uma concentração maior de AGs insaturados (~73%) e a partir do sexto dia inicia uma queda resultando em uma concentração final no décimo dia de ~63%. Em relação aos AGs saturados entre os dias zero e 5 foi detectada uma concentração de cerca de 27% e, após este período, os valores mostraram-se aumentados, atingindo aproximadamente 35% no décimo dia de cultivo. Enquanto outros AGs demonstraram valores médios de concentração pouco variáveis ao longo dos cultivos, o ácido palmítico foi o principal AG saturado que pesou nesta resposta. Nos primeiros dias (zero → 4º dia), as culturas celulares evidenciaram teores mais baixos daqueles metabólitos, (17%), elevando-se para 27% ao final do cultivo. Como observado anteriormente, na via de biossíntese de AGs insaturados o ácido palmítico é precursor importante e, conseqüentemente, espera-se uma correlação negativa entre os seus conteúdos e aqueles de AGs insaturados (FABRIS et al., 2012; WISHART et al. 2018).

Quando analisamos os dados de AGs insaturados, onde maiores teores foram detectados nos primeiros dias de cultivo, observa-se que o EPA variou cerca de 10% entre o dia zero e o dia 10, seguindo a tendência do perfil de AGs insaturados (Figura 2). Os quatro primeiros dias foram os que demonstraram maior concentração com cerca de 28% do total de AGs. Seguindo

a mesma tendência, seus precursores 18:1n9 e 18:2n6 também obtiveram uma queda a partir do 6º dia.

Essa diferença no teor de EPA entre o início e o final do cultivo se deve à função do AG no metabolismo da microalga. AGs insaturados de cadeia longa são elementos estruturais da membrana celular da espécie (ALIPANAH et al., 2015). Sendo assim, no início do cultivo, onde ocorre uma alta taxa de multiplicação celular tem-se, conseqüentemente, uma biossíntese maior destes compostos para atendimento das demandas metabólicas. Por outro lado, quando o cultivo perpassa a fase logarítmica, pode-se identificar uma maior concentração dos lipídios de reserva, os triacilgliceróis (TAG). Portanto, a regulação negativa na biossíntese lipídica da membrana pode estar relacionada a uma demanda reduzida por lipídios estruturais devido à menor taxa de crescimento celular naquela fase de cultivo.

**Tabela 1** – Composição dos ácidos graxos majoritários na fração lipídica recuperada de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A a cada dois dias, num total de 10 dias de cultivo *in vitro*. Os valores (%) são apresentados como média de duas leituras da amostra combinada de três extrações independentes por análise de cromatografia em fase gasosa.

Ácido graxo	Dia 0	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10
Ácido caprílico – C8: 0	0,10	0,26	0,20	0,05	0,16	0,03
Ácido capríco – C10: 0	0,05	0,21	0,16	0,03	0,02	0,01
Ácido mirístico – C14: 0	7,98	8,68	8,08	7,46	7,72	6,68
Ácido pentadecainoico – C15: 0	0,20	0,21	0,26	0,18	0,20	0,17
Ácido palmítico – C16: 0	17,06	16,52	16,40	23,33	23,67	27,65
Ácido hexadecainoico – C16: 2n4	29,58	26,06	25,56	37,21	37,51	42,88
Ácido margarico – C17: 0	0,17	0,37	0,00	0,28	0,24	0,11
Ácido heptadecainoico – C17: 1n7	2,80	3,88	3,41	1,21	1,24	0,65
Ácido esteárico – C18: 0	0,64	0,64	0,93	0,47	0,46	0,83
Ácido elaidico – C18: 1n9t	8,37	9,87	9,77	4,12	4,10	1,94
Ácido elaidico – C18: 1n9	3,52	1,72	2,08	5,78	5,85	6,87
Ácido linoleico – C18: 2n6t	0,19	0,76	0,00	0,06	0,48	0,41
Ácido linolenico <i>cis</i> - C18: 2n6c	1,29	1,52	1,82	1,05	0,97	0,83
Ácido $\gamma$ -linolenico- C18: 3n6	0,39	0,36	0,43	0,41	0,42	0,40
Ácido eicosadioico – C20: 2n6	0,12	0,11	0,13	0,07	0,08	0,07
Ácido behênico – C22: 0	0,10	0,16	0,81	0,29	0,31	0,21
Ácido araquidônico – C20: 4n6	0,81	0,47	0,58	0,56	0,62	0,38
Ácido eicosapentenoico – C20: 5n3	25,70	26,71	27,85	16,67	15,28	9,45
Ácido docosahexanoico – C22: 6n3	0,92	1,50	1,54	0,76	0,68	0,42
$\Sigma$ SAG	26,32	27,04	26,84	32,11	32,78	35,67
$\Sigma$ IAG	73,68	72,96	73,16	67,89	67,22	64,33
$\Sigma$ AG/ $\Sigma$ IAG	0,36	0,37	0,37	0,47	0,49	0,55

SAG= ácido graxo saturado; IAG= ácido graxo insaturado; AG= ácido graxo

### 1.3.2 Espectroscopia de FTIR e *fingerprints* metabólicos

A fim de obter o perfil metabólico da espécie foram realizadas análises espectroscópicas não direcionadas, utilizando espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier - FTIR. O perfil metabólico identificado em amostras coletadas após 18 dias de cultivo está apresentado na Figura 3. A maioria das bandas de absorção observadas na região da impressão digital ( $1800\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ ) de um espectro pode ser atribuído a grupos funcionais nomeados de bandas. Estas bandas são consideradas *fingerprints* em um espectro, pois cada uma delas está associada a classes de metabólitos distintos (GIORDANO et al., 2001; STEHFEST; TOEPEL; WILHELM, 2005).

A banda **A** está relacionada à região dos carboidratos ( $1064\text{--}880\text{cm}^{-1}$ ), tendo sido atribuída à ligação C-O-C dos sacarídeos. A banda **B** de fosfomoléculas ( $1350\text{--}1190\text{cm}^{-1}$ ) resulta da ligação P=O de grupos fosfodiésteres de ácidos nucleicos e fosfolipídios. As bandas relacionadas aos amidos nas regiões de  $1575\text{--}1480\text{cm}^{-1}$  (**C**) e  $1705\text{--}1575\text{cm}^{-1}$  (**D**) resultam das ligações C-H e C=O, respectivamente. Por sua vez, duas bandas observadas em  $1780\text{--}1708\text{cm}^{-1}$  (**E**) e  $2800\text{--}3000\text{cm}^{-1}$  (**F**), foram atribuídas principalmente às ligações C=O de grupos ésteres de lipídios e ácidos graxos e às ligações C-H de AG saturados. Estes dados relacionados as bandas *fingerprints* foram submetidas a análise estatística a fim de observar as diferenças entre as médias.

A banda **A** que demonstrou variação entre os dias de cultivo apresentando maior amplitude nos dias 6, 8, 12 e 18. Observa-se ainda uma tendência no alargamento da banda (em torno do pico  $1050\text{ cm}^{-1}$ ) no final da fase exponencial e durante a estacionária, revelando um aumento dos polissacarídeos nestes intervalos. Ao projetar esta informação à estratégia de cultivo visando EPA e FCX, os dias 6, 8, 12 e 18 são os indicados para a supressão de vias relacionadas aos carboidratos a fim de disponibilizar mais energia às vias de interesse.

A banda **B** de fosfomoléculas, resultante de ligações P=O de grupos fosfodiésteres de ácidos nucleicos e fosfolipídios, apresenta redução na amplitude em relação ao seu espectro total no 8º dia de cultivo. Os fosfolipídios são uma classe de lipídeos que são um dos principais componentes da membrana plasmática da célula. Esta redução na intensidade da banda pode ser relacionada aos dados da curva de concentração do cultivo, onde o 8º dia apresentou um decréscimo na densidade celular.

A classe de proteínas representadas pelas bandas **C** e **D** possui dois picos majoritários encontrados em torno de  $1540\text{ cm}^{-1}$  e  $1650\text{cm}^{-1}$ . Claramente observa-se um agrupamento com



maior amplitude dos espectros nos dias 6, 8, 12 e 18. O dia seis foi o que apresentou maior amplitude em  $1652\text{ cm}^{-1}$ , evidenciando novamente este dia como *target* na supressão de vias, porém agora relacionada com a síntese de proteínas.

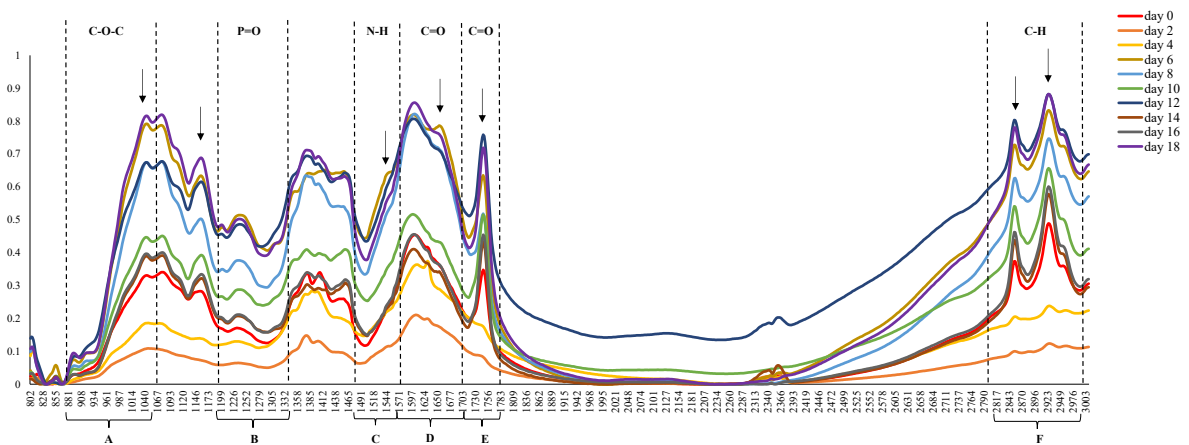
Considerando o interesse maior do presente trabalho na biossíntese e acúmulo de EPA, maior detalhamento foi dado às informações associadas às bandas **E** e **F**, relacionadas a compostos de natureza lipídica. Ao analisar apenas o pico em torno de  $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$  da banda **E**, é possível verificar uma amplitude maior a partir do 6º dia. O pico em torno de  $1730\text{ cm}^{-1}$  é relacionado principalmente a ligações de ésteres nas moléculas lipídicas. Estas ligações são características de moléculas de TAG, que possuem a função de armazenamento. É clara a ausência deste pico nos dias dois e quatro, inferindo que nestes dias a concentração de TAG é reduzida. Nos dias dois e quatro o cultivo se encontra em fase log, onde os lipídios estão sendo direcionados ao “crescimento”, e não para o armazenamento como TAGs. Estes dados convergem com os encontrados nas análises de AGs por cromatografia gasosa, onde a maior concentração de AGs insaturados foi encontrada nos momentos amostrais acima referidos (i.e., dia 2 a 4). Em seu conjunto, estes resultados suportam e reafirmam a ideia de que AGs insaturados de cadeia longa possuem a função de estruturação da membrana celular, enquanto AGs de cadeia curta possuem a função de reserva como triacilgliceróis (ALIPANAH et al., 2015). Quando analisamos os picos no intervalo entre  $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$  percebemos que os primeiros 4 dias e após 14 dias de cultivo os valores perdem a intensidade. Isso demonstra que entre estes intervalos ocorre a diminuição das moléculas saturadas de C-H. De interesse, ressalta-se que não foi constatada a correlação direta entre o teor de EPA determinado por CG e as intensidades de sinais das bandas relacionadas a lipídios nos espectros de FTIR. Porém, ao analisar o percentual de lipídios insaturados obtido por cromatografia gasosa, percebe-se uma redução de  $\sim 10\%$  no conteúdo das amostras coletadas entre os dias 0 e 10 de cultivo. Contudo, a mesma abordagem indica redução maior do teor intracelular de EPA, i.e. 15%. Isso se deve a diversidade qualitativa de lipídios insaturados que a espécie produz. Ou seja, um aumento na concentração de lipídios insaturados não necessariamente acarretará um aumento na concentração de EPA.

A fim de compreender como as classes se relacionam entre si, foram calculadas taxas representativas da razão entre algumas bandas. Foi observado aumento relevante na razão entre as bandas carbo/amida II a partir do 14º dia de cultivo, sugerindo uma cinética de armazenamento de moléculas com esqueletos carbônicos de natureza glicídica e lipídica. STEHFEST et al., (2005) demonstraram que este aumento na razão da intensidade de bandas é explicado pela depleção de N ou P no meio de cultivo. Com a reposição destes nutrientes ao

meio de cultura, os valores da razão carbo/amida II foram reduzidos. Esperava-se que ao final dos 18 dias um aumento na banda de lipídios fosse detectado. No entanto, estudos sugerem que diatomáceas sob estresse de N armazenam carboidratos inicialmente, enquanto o acúmulo de lipídios ocorre somente após longos períodos de estresse. Portanto, as mudanças observadas nos perfis metabólitos via FTIR são consistentes com os relatos na literatura (SHIFRIN; CHISHOLM, 1981; STEHFEST; TOEPEL; WILHELM, 2005).

A análise dos dados espectroscópicos de infravermelho médio cumpre com o objetivo de representar regiões *fingerprint* da metabolômica da espécie, possibilitando algumas inferências. Esta análise é representativa enquanto os questionamentos focam em classes de metabólitos. No entanto, quando se busca um maior direcionamento a uma molécula de interesse, faz-se necessário o uso de técnicas mais seletivas como as cromatografias líquida e gasosa.

**Figura 3** – Perfis espectrais de absorbâncias de FTIR ( $\lambda = 800 - 3100\text{cm}^{-1}$ ) de amostras de biomassas de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A ao 18º dia de cultivo. Seis bandas (A, B, C, D, E e F) foram identificadas como de maior interesse, segundo suas ligações de absorção. Estas ligações estão identificadas na parte superior da figura.



**Tabela 2** – Análise de teste *t student* pareado entre as bandas *fingerprint* e suas taxas em relação ao tempo de cultivo de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A determinadas via espectroscopia de infravermelho médio. Foram consideradas seis bandas seguindo os seguintes comprimentos de onda, onde A (carboidratos) = 1064-880  $\text{cm}^{-1}$ , B (fosfomoléculas) = 1350-1190  $\text{cm}^{-1}$ , C (proteínas) = 1575-1480  $\text{cm}^{-1}$ , D (proteínas) = 1705-1575  $\text{cm}^{-1}$ , E (lipídios) = 1780-1708  $\text{cm}^{-1}$  e F (lipídios)= 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas foram submetidas a soma destes intervalos e posteriormente calculadas a razão entre estas bandas onde os resultados serão nomeados de taxas. Valores em negrito foram considerados significativos ( $p < 0,05$ ).

	Dia 0	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10	Dia 12	Dia 14	Dia 16	Dia 18	p-valor
Carboidratos (A)	15.39	5.19	8.58	35.76	29.13	20.54	33.18	16.74	17.20	37.55	<b>0.003</b>
Fosfodiésteres (B)	8.44	3.21	6.65	25.66	18.66	14.47	24.84	10.23	10.35	25.00	<b>0.04</b>
Amido II (C)	9.19	4.56	9.22	26.54	21.60	15.11	25.71	9.72	10.18	23.56	<b>0.03</b>
Amido I (D)	23.39	11.09	19.41	47.35	44.69	27.57	45.43	21.18	23.18	47.00	<b>0.0004</b>
Lipídio I (E)	7.72	2.70	5.89	15.66	13.09	11.25	19.38	8.25	8.85	16.53	0.31
Lipídio II (D)	31.73	10.09	20.28	66.22	56.89	45.66	72.49	34.56	36.73	69.13	<b>0.0002</b>
Carbo/Amido II	1.68	1.14	0.93	1.35	1.35	1.36	1.29	1.72	1.69	1.59	<b>0.003</b>
Lipídio I/ Amido II	0.84	0.59	0.64	0.59	0.61	0.74	0.75	0.85	0.87	0.70	<b>0.002</b>
Lipídio I/Fosfo	0.92	0.84	0.89	0.61	0.70	0.78	0.78	0.81	0.86	0.66	<b>0.002</b>
Carbo/Fosfo	1.82	1.62	1.29	1.39	1.56	1.42	1.34	1.64	1.66	1.50	<b>0.004</b>

### 1.3.3 Perfil metabólico por ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN)

Os espectros  $^1\text{H}$ -RMN deste trabalho são provenientes de extratos metanólicos de células de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A coletadas nos 10 primeiros dias de cultivo com intervalo de 2 dias entre eles. A elucidação do perfil metabólico é importante para trazer *insights* de potenciais vias a serem inibidas ou elicitadas em trabalhos de engenharia metabólica. Este trabalho foca em moléculas preponderantemente lipídicas (EPA e FCX), i.e., de natureza apolar, sendo que a escolha de um solvente com afinidade por compostos polares objetiva identificar possíveis vias metabólicas, a sofrerem inibição via engenharia metabólica, que não interfiram na expressão do composto de interesse.

A partir dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN foi possível identificar 88 compostos (Tabela 3) no extrato metanólico com o auxílio da plataforma Bayesyl (RAVANBAKSH et al., 2015). Este número de compostos representa em torno de 7% dos compostos totais da matriz completa da espécie, segundo a base de dados Diatomycy – A comprehensive database of diatom

metabolism - <http://www.diatomcyc.org/> (FABRIS et al., 2012). Esta diferença entre os metabólitos descritos naquela base de dados frente aos metabólitos encontrados nesta análise pode ser explicada pela afinidade de moléculas ao solvente extrator e a sensibilidade da análise dos espectros pela plataforma computacional.

Para estas análises foi utilizado o solvente metanol que é um solvente orgânico de caráter polar. Este tipo de interação resulta em uma maior afinidade aos componentes polares, como carboidratos e proteínas. Sendo assim, boa parte das moléculas lipídicas e outras apolares não foram efetivamente extraídas. Apesar deste trabalho focar em analitos lipídicos, este solvente foi escolhido pois estamos buscando vias que podem vir a receber *knockdown* para otimizar as vias lipídicas. Ou seja, precisamos conhecer o que poderemos inibir em processos de engenharia metabólica que não venha a prejudicar os analitos de interesse. Ao processar estes dados na plataforma Bayesyl- <https://www.bayesyl.org/> (RAVANBAKHS et al., 2015), foi possível obter uma cobertura de apenas 25% do espectro. O restante não foi analisado dada a baixa intensidade dos sinais de ressonância nos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN.

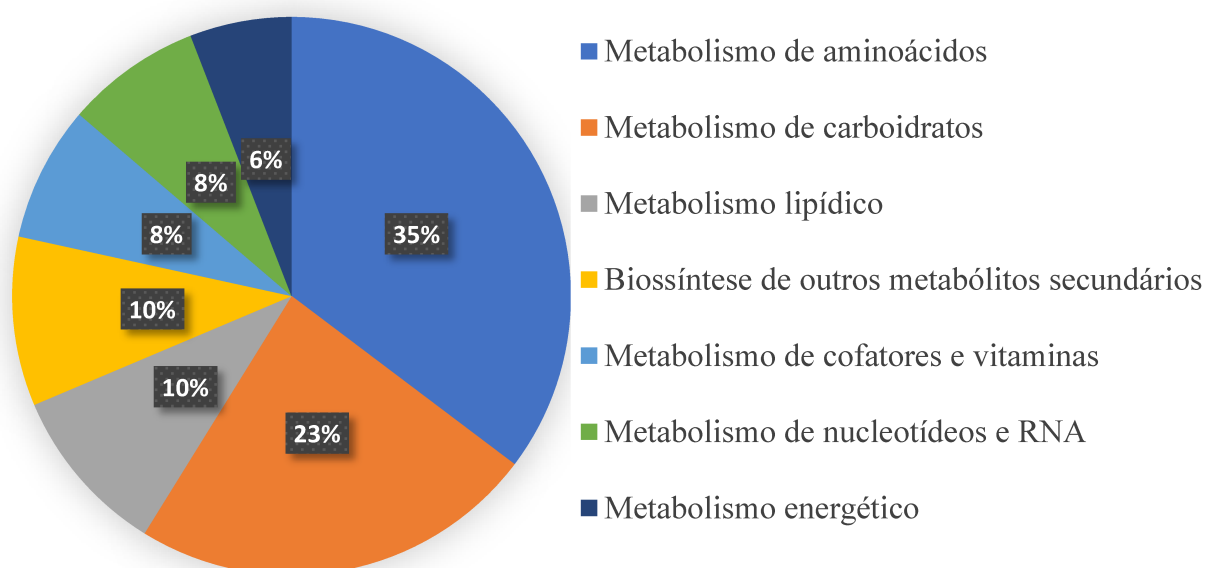
O conjunto de metabólitos identificados foi utilizado em análises das vias metabólicas envolvidas no metaboloma da espécie com suporte da plataforma MetaboAnalyst (CHONG et al., 2018). Esta plataforma realiza uma comparação entre os compostos identificados nos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN em relação aos compostos do metabolismo do organismo de referência disponibilizados no KEGG- <https://www.genome.jp/kegg/> (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Neste trabalho foi utilizado o metabolismo da microalga *Chlorella variabilis* como referência mais próxima a *P. tricornutum*. Esta análise resultou na identificação de 51 vias dos metabolismos primário e secundário, apresentadas na tabela 4. No entanto, estima-se que a espécie *P. tricornutum* possua um total de 286 vias metabólicas, segundo a base de dados Diatomcyc (FABRIS et al., 2012). Em conjunto com as vias metabólicas identificadas, é apresentado o número de correspondências indicando quantos metabólitos da via específica foram encontrados nos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN.

Utilizando a rede metabólica gerada, a plataforma MetaboAnalyst também realiza análise de super-representação e de topologia das vias metabólicas. A análise de super-representação, também chamada de análise de enriquecimento de vias, realiza um teste hipergeométrico que retorna um valor de  $p$ , que representa o valor de probabilidade ajustado em testes múltiplos, levando em consideração que uma molécula pode fazer parte de diversas vias. Estes valores são apresentados na figura 5, identificando subpopulações que são super-representadas ou sub-representadas. A análise de topologia de vias calcula o impacto de cada via metabólica sobre todos os processos bioquímicos celulares e leva em consideração medidas

de centralidade de entrelaçamento das redes metabólicas. Estas duas análises são importantes ferramentas à compreensão da relevância de cada via no metabolismo como um todo.

Ao analisar as 51 vias identificadas, os resultados revelaram o envolvimento de 7 classes metabólicas relacionadas aos perfis metabólicos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A por <sup>1</sup>H-RMN, segundo o KEGG (Figura 4). Dentre estas 51 vias metabólicas identificadas, 18 são direcionadas ao metabolismo de aminoácidos, representando 35% do total. Outra classe metabólica representativa, com 12 vias metabólicas (23%) refere-se ao metabolismo de carboidratos. Por sua vez, as vias relacionadas ao metabolismo lipídico (5) apresentaram 10% de representatividade, igualando-se ao somatório das classes do metabolismo secundário. Com menor representação (8%) foram identificadas quatro vias metabólicas concernentes aos cofatores, vitaminas e nucleotídeos e RNA. As vias associadas ao metabolismo energético (3) apresentaram a menor representatividade (6%). Sendo assim, as vias metabólicas identificadas como de maior expressão em *P. tricornutum* CCAP 1052/1A apresentam os metabólitos cuja alteração é mais propensa a ter impactos significativos nos processos bioquímicos celulares. Dentre essas, 9 vias foram identificadas em específico e a discussão se fará acerca delas.

**Figura 4** – Representação percentual das classes de metabólitos identificados em células de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A segundo KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), utilizando as 51 vias metabólicas identificadas por <sup>1</sup>H-RMN.



**Tabela 3** – Metabólitos identificados por  $^1\text{H}$ -RMN em extratos metanólicos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram analisados utilizando a plataforma Bayesyl. Os valores de pontuação de confiança indicam, numa escala de zero a 10, a probabilidade do analito identificado no espectro ser o composto propriamente dito.

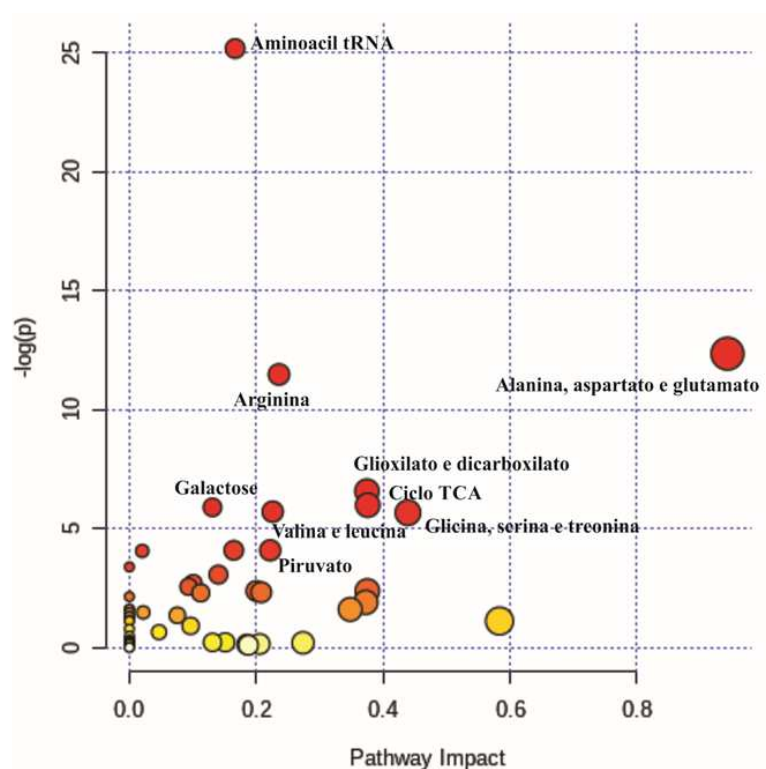
HMDB ID	Nome do composto	PC	HMDB ID	Nome do composto	PC
HMDB00042	Ácido acético	10	HMDB00172	L-Isoleucina	7
HMDB00043	Betaina	10	HMDB00177	L-Histidina	7
HMDB00087	Dimetilamina	10	HMDB00660	Frutose	7
HMDB00094	Ácido cítrico	10	HMDB00691	Ácido malônico	7
HMDB00097	Colina	10	HMDB00214	Ornithina	6
HMDB00122	D-Glucose	10	HMDB00517	L-Arginina	6
HMDB00123	Glicine	10	HMDB00754	3-Ácido hidroxiiisovalérico	6
HMDB00148	L-Ácido glutâmico	10	HMDB00001	1-Metilhistidina	5
HMDB00157	Hipoxantina	10	HMDB00929	L-Triptofano	5
HMDB00158	L-Tirosina	10	HMDB00187	L-Serina	4
HMDB00159	L-Fenilalanina	10	HMDB00168	L-Asparagina	3
HMDB00161	L-Alanina	10	HMDB00169	Manose	3
HMDB00162	L-Prolina	10	HMDB00192	L-Cistina	3
HMDB00190	L-Ácido láctico	10	HMDB00574	L-Cisteína	3
HMDB00267	Ácido piroglutâmico	10	HMDB00019	2-Oxoisovalerato	*
HMDB00357	3-Ácido hidroxibutírico	10	HMDB00020	p-Ácido hidroxifenilacético	*
HMDB00407	2-Ácido hidroxiiisovalérico	10	HMDB00039	Ácido butírico	*
HMDB00562	Creatinina	10	HMDB00044	Ácido ascórbico	*
HMDB00641	L-Glutamina	10	HMDB00092	Dimetilglicina	*
HMDB00687	L-Leucina	10	HMDB00128	Ácido guanidoacético	*
HMDB00696	L-Metionina	10	HMDB00134	Ácido fumarico	*
HMDB00863	Isopropanol	10	HMDB00143	D-Galactose	*
HMDB00883	L-Valina	10	HMDB00149	Etanolamina	*
HMDB01659	Acetona	10	HMDB00164	Metilamina	*
HMDB01873	Ácido isobutírico	10	HMDB00174	L-Fucose	*
HMDB01875	Metanol	10	HMDB00186	Alpha-Lactose	*
HMDB01881	Propileno glicol	10	HMDB00202	Ácido metilmalônico	*
HMDB04983	Dimetilsulfona	10	HMDB00208	2-Ácido oxoglutarico	*
HMDB15109	EDTA	10	HMDB00209	Ácido fenilacético	*
HMDB00008	2-Hidroxibutirato	9	HMDB00223	Ácido oxalacético	*
HMDB00023	3-Hidroxibutirato	9	HMDB00247	Sorbitol	*
HMDB00062	L-Carnitina	9	HMDB00251	Taurina	*
HMDB00108	Ethanol	9	HMDB00271	Sarcosina	*
HMDB00131	Glycerol	9	HMDB00300	Uracila	*
HMDB00167	L-Treonina	9	HMDB00479	3-Metilhistidina	*
HMDB00182	Lisina	9	HMDB00625	Ácido gluconico	*
HMDB00191	L-Ácido aspártico	9	HMDB00714	Ácido hipúrico	*
HMDB00211	Mioinositol	9	HMDB00718	Isovalerato	*



Metabolismo da arginina e prolina	4/31	4/31	4/31	4/31	4/31	4/31
Metabolismo do nitrogênio	2/11	2/11	2/11	2/11	2/11	2/11
Metabolismo da tiamina	3/22	3/22	3/22	3/22	3/22	3/22
Biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano	3/22	3/22	3/22	3/22	3/22	3/22
Metabolismo da frutose e manose	1/13	1/13	1/13	2/13	2/13	2/13
Síntese e degradação de corpos cetônicos	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Biossíntese de tropano, piperidina e alcalóide piridina	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Biossíntese de betalaína	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Metabolismo do cianoaminoácido	1/15	1/15	1/15	2/15	2/15	2/15
Metabolismo do ácido dibásico ramificado em C5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
Biossíntese de alcalóides isoquinolina	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
Metabolismo da histidina	2/18	2/18	2/18	2/18	2/18	2/18
metabolismo da beta-alanina	2/20	2/20	2/20	2/20	2/20	2/20
Metabolismo dos glicerofosfolípidios	3/36	3/36	3/36	3/36	3/36	3/36
Metabolismo de nicotinato e nicotinamida	1/12	1/12	1/12	1/12	1/12	1/12
Metabolismo do selenocomposto	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16
Metabolismo de ascorbato e aldarato	1/17	1/17	1/17	1/17	1/17	1/17
Metabolismo esfingolípídico	1/18	1/18	1/18	1/18	1/18	1/18
Metabolismo dos glicerolípídios	1/20	1/20	1/20	1/20	1/20	1/20
Metabolismo da pirimidina	2/38	2/38	2/38	2/38	2/38	2/38
Metabolismo do propanoato	1/21	1/21	1/21	1/21	1/21	1/21
Metabolismo de amido e sacarose	1/21	1/21	1/21	1/21	1/21	1/21
Metabolismo do açúcar aminado e do açúcar nucleotídico	2/41	2/41	2/41	2/41	2/41	2/41
Metabolismo do fosfato de inositol	1/24	1/24	1/24	1/24	1/24	1/24
Biossíntese da cadeia de terpenóides	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25
Sistema de sinalização de fosfatidilinositol	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25
Metabolismo do triptofano	1/28	1/28	1/28	1/28	1/28	1/28
Metabolismo da purina	2/65	2/65	2/65	2/65	2/65	2/65
Metabolismo da porfirina e da clorofila	1/54	1/54	1/54	1/54	1/54	1/54



**Figura 5** – Análise de vias metabólicas (MetPA), conforme gerado por algoritmo da plataforma MetaboAnalyst. A distribuição mostra os resultados para o conjunto de dados de metabólitos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A, determinados via ressonância magnética nuclear. Todas as vias metabólicas correspondentes são exibidas como círculos. A cor de cada círculo é baseada em valores de p (cores mais escuras indicam mudanças mais significativas de metabólitos na via correspondente), enquanto o tamanho do círculo corresponde ao escore de impacto da via. As vias metabólicas mais impactadas com altos escores de significância estatística foram destacadas.



A via com maior número de *matches* na análise de topologia do caminho foi a de biossíntese de Aminoacil-tRNA. Essa via representa a única classe relacionada ao metabolismo de nucleotídeos e apresentou *match* de 20 dos 48 compostos totais relacionados. Essa via é responsável pela ligação do tRNA a um aminoácido com gasto de ATP e assim entregando o RNA a um ribossomo para incorporação na cadeia polipeptídica que está sendo produzida (SHARAF et al., 2019). A importância dessa via pode ser explicada por ela ser a via central de outras 10 vias adjacentes relacionadas a síntese de aminoácidos que dependem diretamente desta biossíntese. No entanto, pela diversidade de formas de Aminoacil-tRNA que participam de diversas vias do metabolismo celular, o *knockdown* se faz muito complexo e dependente da supressão de uma diversidade de enzimas mutualmente. Quando se busca vias para inibição visando o aumento do fluxo metabólico para outra via, o ideal é que seja o mais próximo

possível da via de interesse. Sendo assim, a via de biossíntese de Aminoacil-tRNA não é a indicada para supressão em trabalhos de engenharia metabólica.

A classe mais representativa nas análises das vias é a relacionada ao metabolismo de aminoácidos que possui 6 vias diferentes que poderão servir como alvos. Uma delas é a via relacionada ao metabolismo de alanina, aspartato e glutamato que é a mais representativa no metabolismo polar de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A. Sabe-se que a via do glutamato é relacionada a via de biossíntese da clorofila e que a concentração deste metabólito diminui com condições de depleção de nitrogênio. No entanto, em um trabalho utilizando dados genômicos foi verificado que quando esta via é suprimida, não é apenas a síntese de clorofila que é inibida. As vias fotossintéticas que codificam enzimas relacionadas a biossíntese de carotenoides também foram suprimidas (CHEN et al., 2017). Nos resultados das análises realizadas na plataforma MetaboAnalyst percebe-se que apesar do impacto da via ter sempre o seu  $p < 0.05$ , nos dias 0 e 4 os valores são ainda mais baixos. Isso demonstra um maior impacto da via nestes dias de cultivo que estão diretamente relacionados aos resultados apresentados nas análises de cromatografia gasosa do EPA e nas análises espectroscópicas de FTIR. No entanto, devido ao impacto desta via estar relacionado diretamente ao teor de FCX, não é indicado suprimi-la quando vislumbrado o acúmulo desta molécula no processo de biorrefinaria.

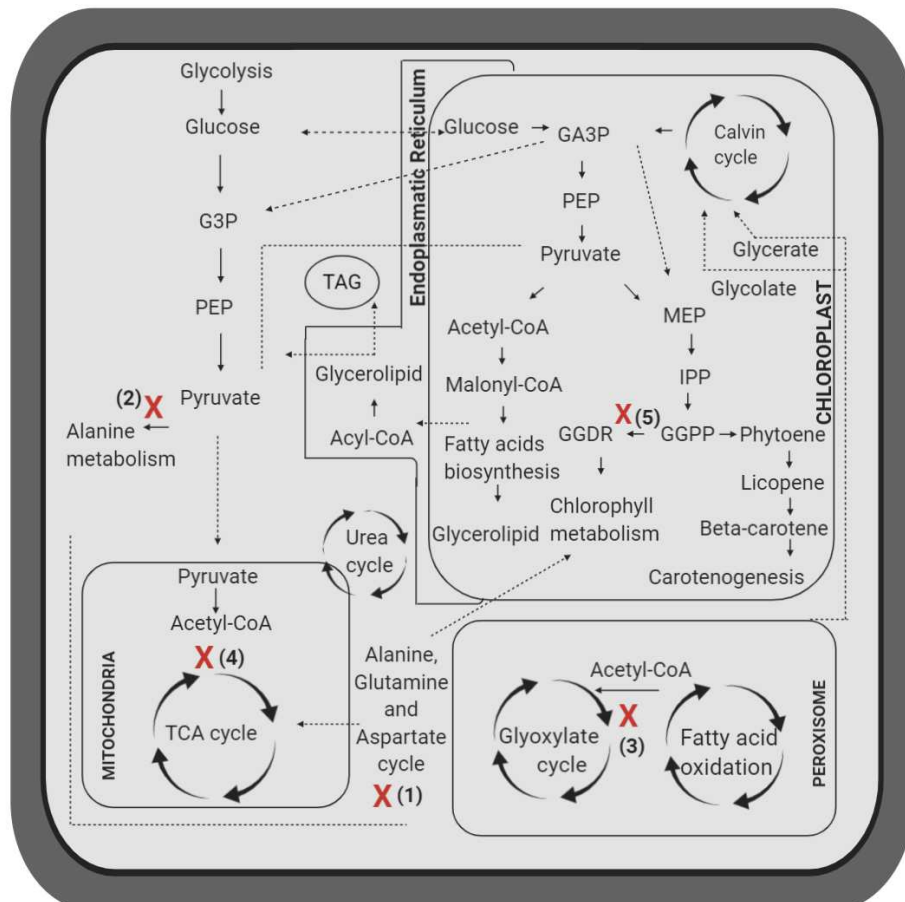
Uma estratégia visando o metabolismo da clorofila que não possua impacto na via carotenoídica considera a etapa de utilização de geranylgeranyl difosfato (GGPP), um substrato de ambas as vias. A não disponibilização desta molécula para o metabolismo de clorofilas poderá fornecer um aumento de substrato à via de biossíntese de fucoxantina. Esta estratégia deve se voltar, portanto, à inibição da síntese de fitol, representada na figura 6 pela demarcação de inibição nº 5.

Se o objetivo for elicitar apenas a biossíntese de lipídios, a supressão da via glutamina-glutamato é considerada uma boa estratégia. Para compreender a interconexão das vias veja figura 6 - inibição (1). Este ciclo está relacionado ao metabolismo de aminoácidos e proteínas e supõe-se que sua supressão poderá liberar maior quantidade de compostos redutores à biossíntese lipídica. HUANG e colaboradores (2014), através de análise proteômica quantitativa de modo a estimar as diferenças na abundância de proteína antes e após a acumulação de TAG, demonstraram que o acúmulo de triglicerídeos intracelulares ocorre conjuntamente à produção limitada de proteína, desviando o excesso de carbono à biossíntese lipídica. No entanto, ainda que o acúmulo de TAG não esteja associado ao acúmulo de EPA, é conhecida a relação positiva entre o metabolismo do carbono e o acúmulo daquele lipídio (VALENZUELA et al., 2012). De fato, o acetil-CoA, proveniente do piruvato derivado da

glicólise, fornece esqueletos de carbono e energia para a síntese de ácidos graxos em diatomáceas (HOCKIN et al., 2012).

Outra possibilidade de trabalhar com supressão das vias relacionadas ao metabolismo de aminoácidos é a da biossíntese da alanina que demonstrou um potencial alvo para trabalhos de engenharia metabólica. A via da alanina (Figura 6 - inibição 2) compete pelo substrato piruvato, que é também utilizado na via de biossíntese de ácidos graxos e fucoxantina. Uma estratégia para o uso de engenharia metabólica poderia ser a supressão desta via com a inibição da enzima D-metionina-piruvato transaminase (E.C. 2.6.1.41) que utiliza piruvato como substrato. No entanto, essa estratégia precisa ser testada com cautela, pois a enzima pode utilizar como substrato o oxaloacetato e ser inibida parcialmente, ou ainda haver reflexos sobre outras vias metabólicas.

**Figura 6** – Representação da interconexão das vias metabólicas de ácidos graxos e fucoxantina com as vias sugeridas à inibição pelos estudos ômicos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A. As vias sinalizadas com X representam as inibições a serem testadas *in silico* e *in vitro*.



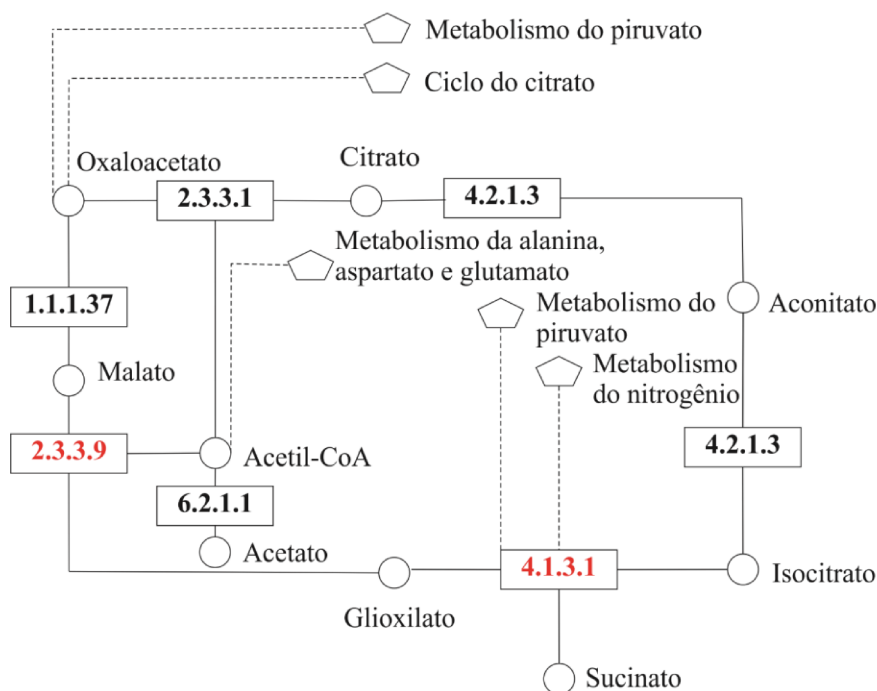
A possibilidade de explorar a supressão da via de aminoácidos já foi abordada em trabalho de BAUER e colaboradores (2018), onde estas vias foram retornadas pelo modelo *in silico* como principais *targets* à síntese de FCX. Os autores relacionaram esta resposta à possibilidade de que a inibição de enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos resulta em maior disponibilidade de agentes redutores, como o NADPH, à biossíntese de metabólitos secundários. No entanto as soluções geradas pelo modelo *in silico* deste trabalho precisam ser validadas experimentalmente e verificadas quanto à possibilidade de alteração da via de biossíntese dos AGs que não está contemplada no modelo dos autores.

A quarta via retornada nas análises foi a do glioxilato e dicarboxilato. Esta via, também conhecida como via de Toledo, é uma rota alternativa para a síntese de glucose a partir do acetil-CoA. A síntese de ácidos graxos pode ser dividida em três etapas principais: síntese de acetil-CoA no citoplasma; síntese de ácido graxo saturado com 16-18 carbonos e posterior dessaturação e alongação da cadeia de carbonos (KEGG). Sendo assim, a molécula de acetil-CoA é imprescindível para a síntese de AGs. Portanto, sugere-se que a supressão desta via seja uma das melhores alternativas para preconizar (Figura 6 - inibição 3). A via do glioxilato e dicarboxilato ocorre no peroxissomo, onde também ocorre a beta-oxidação de AGs de cadeia longa para disponibilizar acetil-CoA a via. Com a supressão da via que utiliza o acetil-CoA, a via do glioxilato, espera-se uma redução também da beta-oxidação de ácidos graxos de cadeia longa pelo peroxissomo a fim de disponibilizar substrato a via.

As vias de beta-oxidação de AGs ocorrem tanto nas mitocôndrias como nos peroxissomos. Esta degradação de AGs disponibiliza acetil-CoA para quatro principais vias: alanina, butanoato, glicolato e ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Assim, a inibição das enzimas tiosterase de palmitoil-CoA hidrolase (E.C.3.1.2.2) e acil-CoA sintetase (E.C. 6.2.1.3) é considerada relevante, bloqueando ou minimizando o processo metabólico de oxidação de AGs.

Outra estratégia para inibição da via de Toledo leva em conta a supressão das enzimas que a regulam. A via de Toledo, por ser uma via alternativa a síntese de glucose, oxidando ácidos graxos, e possui duas enzimas em compartilhamento ao ciclo de Krebs, a saber: citrato sintase (E.C. 2.3.3.1) e a aconitase (E.C. 4.2.1.3). Como a estratégia é a inibição somente da via de Toledo, a melhor opção é inibir enzimas específicas a esta via, ou seja, isocitrato liase (E.C. 4.1.3.1) e malato sintase (E.C. 2.3.3.9). No entanto, se optarmos por utilizar a estratégia de inibirmos estas vias só ao fim do cultivo para não penalizar vias importantes no início do cultivo, a estratégia seria suprimir a enzima citrato sintase a fim de inibir a via logo no início. Estas enzimas estão indicadas na figura 7.

**Figura 7** –Via do glioxilato com as enzimas (retângulos) e metabólitos (círculos) correspondentes. As enzimas específicas que estão em destaque em vermelho correspondem a isocitrato liase (E.C. 4.1.3.1) e malato sintase (E.C. 2.3.3.9). Linhas contínuas são reações diretas e linhas pontilhadas representam diversas reações de vias associadas.



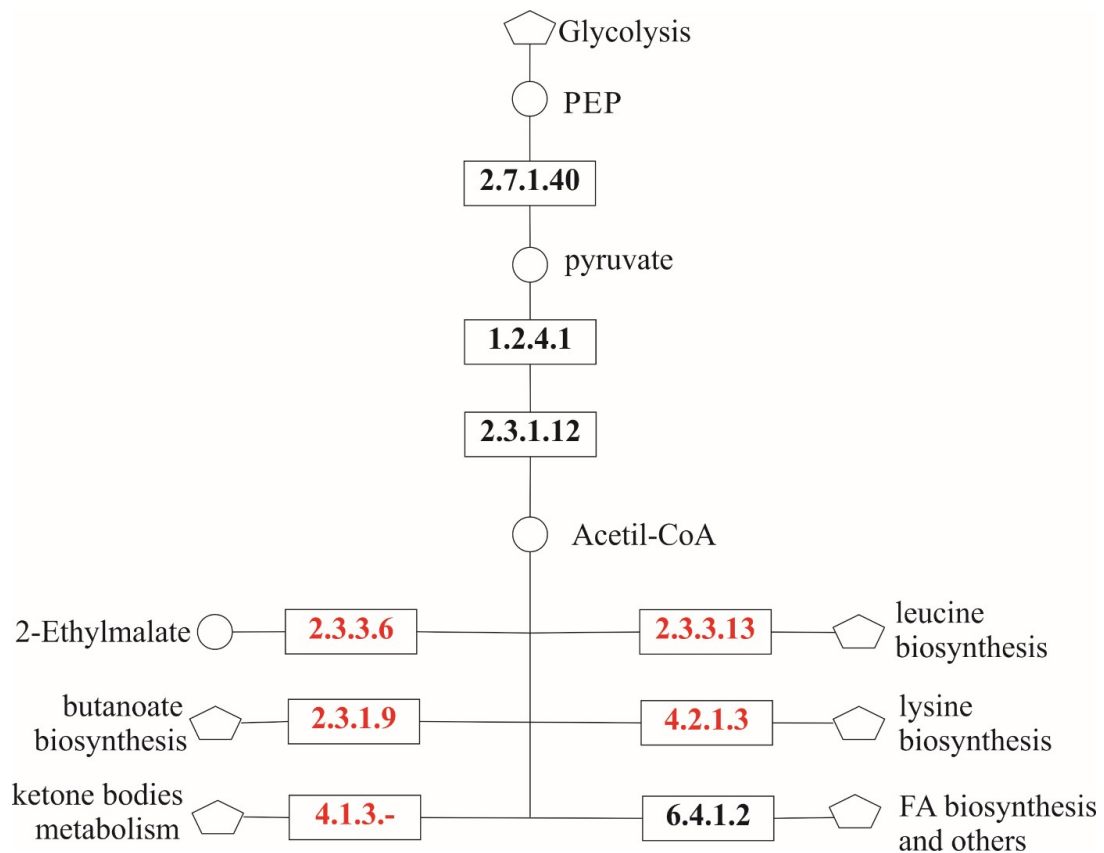
Outra característica da via de Toledo que a faz ser um alvo para engenharia metabólica é o fato de utilizar citrato gerando oxaloacetato como mostrado na figura 7. O citrato participa da regulação alostérica da via de TCA como um inibidor. Como a via TCA apresenta reações que liberam ATP pela oxidação do acetil-CoA fornecendo NADH, ao disponibilizar mais citrato pela inibição da via de Toledo, assume-se que também será regulado alostericamente e de forma negativa a via TCA (figura 6 - inibição 4). Ao realizar a supressão da via de TCA, uma maior quantidade de moléculas de piruvato poderão ser utilizadas na biossíntese de AGs. Ou seja, a inibição, ainda que parcial da via TCA, possibilitará aumentar a disponibilidade de substrato à síntese de AGs ou FCX.

Apesar da via do piruvato demonstrar potencial à engenharia metabólica de *P. tricornutum*, sua supressão não parece conveniente, porque o piruvato está diretamente relacionado à biossíntese de AG e FCX, com o auxílio de um transportador que endereça ao cloroplasto. Além disso, é preciso considerar que o piruvato e o gliceraldeído 3-fosfato são os principais precursores nas vias da carotenogênese (DAMBEK et al., 2012). HAIMOVICH-DAYAN et al., (2013) realizaram a inibição da enzima piruvato fosfato diquinase (EC 2.7.9.1), afetando a biossíntese de FCX negativamente. Portanto, entende-se que as reações que

sintetizam tais compostos devem ser preservadas, ou até mesmo elicitadas para uma maior disponibilização delas.

Entretanto, ao final da via do piruvato, a molécula de acetil-CoA serve de substrato a mais cinco vias além da direcionada a biossíntese de AGs (figura 8). A supressão destas enzimas indicadas pode significar mais acetil-CoA disponível. Assim, as vias a serem suprimidas são a de biossíntese de 2-etilmalato (E.C. 2.3.3.6), leucina (E.C. 2.3.3.13), lisina (E.C. 2.3.3.14), butanoato (E.C. 2.3.1.9) e do metabolismo de corpos cetônicos (E.C. 4.1.3).

**Figura 8** – Metabolismo do piruvato com as enzimas (retângulos) e metabólitos (círculos) correspondentes. As enzimas específicas com destaque em vermelho correspondem à 2-etilmalato sintase (E.C. 2.3.3.6), 2-isopropilmalato sintase (E.C. 2.3.3.13), homocitrato sintase (E.C. 2.3.3.14), acetil-CoA C-acetiltransferase (E.C. 2.3.1.9) e glutamato desidrogenase (E.C. 4.1.3.). Linhas contínuas são reações diretas e linhas pontilhadas representam diversas reações de vias associadas.



## 1.4 CONCLUSÃO

Neste estudo observa-se que o tempo de cultivo com maior concentração dos metabólitos de interesse são entre os dias 6 e 10. Estes resultados de composição bioquímica do cultivo em diferentes tempos correlacionada a densidade celular do cultivo refletiu o potencial fisiológico da produtividade de biorrefinaria para a espécie. Com estes resultados podemos perceber que a síntese de FCX é muito mais estável que a síntese de EPA. Enquanto a concentração de FCX não oscilou estatisticamente entre os dias 2 e 12, a concentração de EPA reduziu drasticamente a partir do 6º dia em concomitância a todos os ácidos graxos de cadeia insaturada. Concluímos assim, que quando buscamos a otimização da biorrefinaria da espécie, o 4º dia se mostra mais efetivo.

Ao analisarmos os dados de espectroscopia de infravermelho pode-se inferir que estas análises cumprem com o objetivo de representar regiões *fingerprint* da metabolômica da espécie, possibilitando algumas inferências. No entanto, esta análise se mostrou representativa enquanto os questionamentos focam em classes de metabólitos. A análise permitiu verificar que os dias 6, 12 e 18 são indicados para a supressão da via dos carboidratos e proteínas, sendo que o dia 6 se destaca na banda amida I. Quando buscamos um maior direcionamento a uma molécula de interesse ela não é responsiva, fazendo-se necessário o uso de técnicas mais robustas e direcionadas como as cromatografias líquida e gasosa.

As análises com os espectros de ressonância magnética nuclear indicaram diversas vias relacionadas ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos. A maioria das estratégias geradas estão relacionadas diretamente as moléculas de acetil-CoA e piruvato. Estas moléculas são altamente energéticas e participam de muitas vias do metabolismo. A estratégia de inibir a distribuição destas moléculas a outras vias que também a utilizam se mostrou latente. No entanto a elaboração da estratégia demanda cuidado, pois as enzimas que realizam esta distribuição não são específicas e poderão interferir em outras vias que não as esperadas.

A via que representou maior potencial como alvo em estudos para a eliciação de FCX e EPA foi a via do glioxilato e dicarboxilato. Esta via, também conhecida como via de Toledo, é uma rota alternativa para a síntese de glicose a partir do acetil-CoA. A supressão desta via parece-nos uma das melhores alternativas para preconizar. Isso pelo fato dela ocorrer no peroxissomo, onde ocorre a beta-oxidação de AGs de cadeia longa para disponibilizar o acetil-CoA para a via. Espera-se que inibindo a rota, tenhamos mais acetil-CoA livre e uma supressão da beta-oxidação. Outra característica da via de Toledo que a faz ser um alvo para engenharia metabólica é o fato de utilizar citrato gerando oxaloacetato. O citrato participa da regulação

alostérica da via de TCA como um inibidor. Ao realizar a supressão da via de TCA, mais moléculas do ciclo do piruvato ficarão livres e poderão ser utilizadas na biossíntese de AG. Sendo assim, o alvo dos nossos trabalhos futuros será a supressão destas vias concomitante a análise cromatográfica dos metabólitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

ALIPANAH, L. et al. Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 20, p. 6281–6296, 2015.

BAUER, C. M. et al. In silico predictions for fucoxanthin production by the diatom *Phaeodactylum Tricorutum*. In: **Practical Applications of Computational Biology and Bioinformatics**, 12th International Conference., V. 12, p. 139–148, 2019.

BELLOU, S. et al. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1476–1493, 2014.

BENAVIDES, A. M. et al. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. **Biomass & Bioenergy**, v. 54, p. 115–122, 2013.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 1, p. 911–917, 1959.

BOWLER, C. et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 239–244, 2008.

CARRIJO, R. S. et al. Uso de microalgas para a produção de biodiesel: vantagens e limitações. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 5, n. 1, p. 23-31, 2015.

CHEN, H. et al. Comparative metabolic profiling of the lipid-producing green microalga *Chlorella* reveals that nitrogen and carbon metabolic pathways contribute to lipid metabolism. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 153, 2017.

DAMBEK, M. et al. Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 15, p. 5607–5612, 2012.

DESBOIS, A. P. et al. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 755–764, 2008.

FABRIS, M. et al. The metabolic blueprint of *Phaeodactylum tricorutum* reveals a eukaryotic Entner-Doudoroff glycolytic pathway: The *Phaeodactylum tricorutum* metabolic blueprint. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, v. 70, n. 6, p. 1004–1014, 2012.



GAO, B. et al. Co-production of lipids, eicosapentaenoic acid, fucoxanthin, and chrysolaminarin by *Phaeodactylum tricornutum* cultured in a flat-plate photobioreactor under varying nitrogen conditions. **Journal of Ocean University of China**, v. 16, n. 5, p. 916–924, 2017.

GIORDANO, M. et al. Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). **Journal of Phycology**, v. 37, n. 2, p. 271–279, 2001.

GUILLARD, R. R. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. **In: Culture of Marine Invertebrate Animals**, Springer, 1975.

HAIMOVICH-DAYAN, M. et al. The role of C4 metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **The New Phytologist**, v. 197, n. 1, p. 177–185, 2013.

HOCKIN, N. L. et al. The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants. **Plant Physiology**, v. 158, n. 1, p. 299–312, 2012.

HUANG, X. et al. Quantitative proteomics analysis of early recurrence/metastasis of huge hepatocellular carcinoma following radical resection. **Proteome Science**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2014.

JAGADEVAN, S. et al. Recent developments in synthetic biology and metabolic engineering in microalgae towards biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 2018.

KIM, S. M. et al. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 7, p. 1843–1855, 2012.

MARTINO, A. D. et al. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. **Journal of Phycology**, v. 43, n. 5, p. 992–1009, 2007.

MILIĆEVIĆ, D. et al. The role of total fats, saturated/unsaturated fatty acids and cholesterol content in chicken meat as cardiovascular risk factors. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2014.

O'FALLON, J. V. et al. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 1511–1521, 2007.

OKAUCHI, M.; TOKUDA, M. Trophic value of the unicellular diatom *Phaeodactylum tricornutum* for larvae of Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*. **In: Symposium on aquaculture and pathobiology of crustaceans and other species in conjunctions**. 32nd UJNR Aquaculture panel meeting. 2003.

RAVANBAKHS, S. et al. Accurate, fully-automated NMR spectral profiling for metabolomics. **PloS One**, v. 10, n. 5, p. 1-15, 2015.

ROCHA, I. et al. OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering. **BMC Systems Biology**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2010.

SHARAF et al. Characterization of aminoacyl-tRNA synthetases in chromerids. **Genes**, v. 10, n. 8, p. 1-14, 2019.

SHIFRIN, N. S.; CHISHOLM, S. W. Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. **Journal of Phycology**, v. 17, n. 4, p. 374–384, 1981.

SINGH, D. et al. Modelling metabolism of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, n. 6, p. 1182–1186, 2015.

STEHFEST, K.; TOEPEL, J.; WILHELM, C. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 717–726, 2005.

TREDICI, M. R. et al. Energy balance of algal biomass production in a 1-ha “Green Wall Panel” plant: How to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio. **Applied Energy**, v. 154, p. 1103–1111, 2015.

VALENZUELA, J. et al. Potential role of multiple carbon fixation pathways during lipid accumulation in *Phaeodactylum tricorutum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2012.

WISHART, D. S. et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. 608–617, 2018.

WU, H. et al. A comparative analysis of fatty acid composition and fucoxanthin content in six *Phaeodactylum tricorutum* strains from different origins. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 34, n. 2, p. 391–398, 2016.

## - CAPÍTULO V -

### ENGENHARIA METABÓLICA APLICADA À BIORREFINARIA DE *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

#### RESUMO

O uso de microalgas em processos biotecnológicos é extremamente promissor, mas seu processo só demonstra ser vantajoso com a aplicação do conceito de biorrefinaria voltada a compostos com alto valor para o mercado. Com o objetivo de aumentar os compostos alvos deste trabalho e otimizar o cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1052/1A, foram testadas estratégias de redirecionamento metabólico para o aumento da produção de ácido eicosapentenoico (EPA) e fucoxantina (FCX). Dentre os 14 inibidores testados, a adição de cloreto de magnésio, oxalato de amônio e quercetina proporcionou aumentos na produtividade e nos teores de PUFAS (ácidos graxos poli-insaturados) e EPA, além do oxicarotenoide FCX. Em cultivos direcionados ao incremento de biomassa, o ideal é a suplementação com oxalato de amônio, enquanto o aumento do rendimento lipídico foi detectado via elicitação dos cultivos celulares com cloreto de magnésio. O aporte de quercetina, por sua vez, foi relevante ao aumento de FCX, principalmente. Estes resultados fornecem direcionamento relevante para o melhor desenho de processos de produção de biocompostos em microalgas, por meio da manipulação das condições de crescimento sem a necessidade de submetê-las à manipulação da engenharia genética. Sendo assim, as estratégias mais vantajosas foram as que aumentaram o rendimento dos cultivos e/ou criaram um ambiente propício, e.g., antioxidante, à manutenção dos compostos de interesse.

#### 1.1 INTRODUÇÃO

O estudo em biologia de sistemas aplicado ao cultivo da microalga *P. tricornutum* CCAP 1052/1A no capítulo IV foi explorado de modo a criar estratégias para engenharia metabólica com o objetivo de aumentar a produção de EPA e FCX. Os resultados revelaram diversas vias relacionadas ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos que se mostraram atrativas para sofrerem inibição, de modo a redirecionar o fluxo metabólico celular a síntese das moléculas de interesse. As principais estratégias discutidas no capítulo anterior foram

relacionadas às rotas da alanina, do glioxilato e do piruvato, onde foi possível apontar enzimas-chaves à otimização dos cultivos. As estratégias geradas são relacionadas diretamente às moléculas de acetil-CoA e piruvato, sendo estas altamente energéticas e que participam de muitas vias do metabolismo celular. A estratégia de inibir a distribuição destas moléculas a outras vias que também a utilizam se mostra latente. Com este objetivo, buscou-se inibidores enzimáticos na base de dados BRENDA (SCHOMBURG; CHANG; SCHOMBURG, 2002), enquanto suas respectivas concentrações levaram em consideração a literatura relacionada a estudos de concentração inibitória já propostos para a espécie modelo, i.e., *P. tricornutum*, a trabalhos anteriores do laboratório ainda não publicados, e ainda, quando não encontrado para a espécie, foi utilizada a dosagem testada em outras microalgas (HORVATIC; PERŠIĆ, 2007; OSBORN; HOOK, 2013; SCHOMBURG; CHANG; SCHOMBURG, 2002). Dessa forma, a partir do levantamento de inibidores enzimáticos, foram executados experimentos de modo a testar as hipóteses de engenharia metabólica buscando o redirecionamento do metabolismo celular.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 Levantamento dos inibidores enzimáticos

Para inibir reações metabólicas no intuito de redirecionar o metabolismo para a produção de EPA e FCX, foram elencadas 13 enzimas relacionadas as estratégias metabólicas geradas (Tabela 1). De modo a selecionar potenciais inibidores destas enzimas, foram pesquisados no banco de dados BRENDA - <https://www.brenda-enzymes.org/> (SCHOMBURG; CHANG; SCHOMBURG, 2002) compostos para esta função. Na base de dados foram encontrados >800 menções de compostos inibidores testados para estas enzimas, sendo eles preferencialmente selecionados quando possível para atender a critérios de baixo custo, acessibilidade e baixa toxicidade. Ao final, uma listagem de 14 inibidores foi definida, sendo esses avaliados nos cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A (Tabela 2).

**Tabela 1** – Enzimas apontadas pelos estudos metabolômicos de biologia de sistemas como estratégicas para modulação, visando redirecionar o fluxo metabólico em *P. tricornutum* CCAP 1052/1A à produção de EPA e FCX.

Rota metabólica	Enzima	E.C.
Alanina	D-metionina-piruvato transaminase	2.6.1.41
Alanina	alanina racemase	5.1.1.1
Clorofila	geranilgeranil difosfato sintase	1.3.1.83
Piruvato	2-etilmalato sintase	2.3.3.6
Piruvato	acetil-CoA C-acetiltransferase	2.3.1.9
Piruvato	hidroximetilglutaril-CoA liase	4.1.3.4
Piruvato	2-isopropilmalato sintase	2.3.3.13
Glioxilato	isocitrato liase	4.1.3.1.
Glioxilato	malato sintase	2.3.3.9
Glioxilato	palmitoil-CoA hidrolase	3.1.2.2
Glioxilato	AG de cadeia longa-CoA ligase	6.2.1.3
Glioxilato	citrato (Si)-sintase	2.3.3.1
Glioxilato	aconitato hidratase	4.2.1.3

E.C= nomenclatura de enzimas, cada número EC está associado a um nome recomendado para a referida enzima.

### 1.2.2 Cultivos microalgais

Os cultivos microalgais foram mantidos em frascos Erlenmeyer contendo 500 mL de meio de cultura f/2 (GUILLARD, 1975), formulado com água marinha natural filtrada e autoclavada. A concentração de células por frasco foi de  $22 \times 10^6$  células/mL e foram cultivadas em câmaras de cultivo à 21°C, com ciclo de luz de 12 h e irradiância de  $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes (36 w). A agitação dos cultivos foi proporcionada por injeção constante de ar atmosférico. Alíquotas foram coletadas no primeiro, quinto e sexto dia de cultivos (final fase log) para contagem de células em câmara de Neubauer. Seguindo os estudos de biologia de sistemas, os cultivos foram realizados conforme capítulo IV até o quinto dia, onde então os inibidores foram adicionados aos cultivos, de modo a aplicar as estratégias de engenharia metabólica. No final do experimento (6º dia de cultivo), as culturas celulares foram coletadas, centrifugadas (2276 xG, 9 min) e o sobrenadante descartado. A biomassa coletada foi dessalinizada, lavando-a rapidamente com solução de formiato de amônio 0,5M, seguido de liofilização (36 h; 0,001 mbar), a biomassa foi submetida a gravimetria e posteriormente armazenada à -80°C até a extração dos compostos de interesse.

### 1.2.3 Rendimento e produtividade dos cultivos

Os cálculos de produtividade, rendimento do produto, e o rendimento de biomassa dos cultivos foram calculados segundo as equações 1, 2 e 3, respectivamente.

#### 1 - Equação produtividade (Eq. 1):

$$P=M/V*D$$

Onde:

P = Produtividade de lipídios (g /L. dia)

M = Biomassa seca coletada do cultivo (g)

V = Volume (L)

D = Tempo (dias)

#### 2 - Equação rendimento lipídico por mg de biomassa (Eq. 2):

$$RP= M1 / M2$$

Onde:

RP = Rendimento do produto

M1= massa de lipídio extraído

M2 = massa biomassa utilizada na extração

#### 3 - Equação rendimento por cultivo (Eq. 3):

$$RB= RP*MF$$

Onde:

RB = rendimento lipídico

RP = rendimento do produto

MF = massa por cultivo

#### 1.2.4 Qualificação e quantificação do perfil de ácidos graxos

Para a análise dos ácidos graxos, os lipídios foram extraídos segundo protocolo de Bligh and Dyer (1959) seguindo o direcionamento do teste de protocolo realizado no capítulo II. Após a extração da fração lipídica, uma alíquota foi coletada, e os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram obtidos de acordo com O'Fallon (2007). Os ésteres metílicos foram injetados (1,0  $\mu\text{L}$ ) em cromatógrafo líquido/gás (Agilent 7890B), equipado com injetor automático a 240 °C, coluna CP 7487 e detector FID (300 °C). Para a cromatografia dos derivados metilados de ácidos graxos, a coluna foi termostatizada da seguinte forma: 120 °C, seguida da elevação para 186 °C (3 °C / min, 5 min) e posteriormente para 230 °C (3 °C / min) até o final de a análise. Utilizou-se um fluxo de 2,5 mL/min de gás carreador (He) e um split de injeção de 1:40, resultando em sensibilidade adequada para identificação e quantificação dos analitos. A composição de ácidos graxos foi determinada comparando os tempos de retenção dos analitos com os padrões analíticos de ácidos graxos da mistura de FAMES Supelco TM C37 FAME Mix (47885-U, Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha). FAMES de óleo de algas foram quantificados em relação ao padrão interno, o ácido tricosanóico (23:0, 47885-U, Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha). A quantificação do metabólito foi baseada em curva padrão do padrão interno em hexano (1-15 mg mL<sup>-1</sup>; R<sup>2</sup> = 0,98). A quantificação considerou a normalização da área do pico de interesse, sendo os valores expressos em mg / mL para o EPA e em porcentagem para os demais ácidos graxos poli-insaturados identificados na matriz bioquímica.

#### 1.2.5 Quantificação da fucoxantina por cromatografia líquida

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para quantificação de FCX no extrato de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A. Uma amostra de 20 mg de biomassa liofilizada foi adicionada de 4 mL de metanol, seguido de maceração (1 min, ultraturrax) e incubação em ausência de luz por 1 h. Uma alíquota de cada amostra do extrato metanólico (10  $\mu\text{L}$ , n = 3) foi injetada em um cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10 A), equipado com uma coluna de fase reversa C18 (Vydac 218TP54, 250 mm x 4,6 mm,  $\pm$  5  $\mu\text{m}$ , 40°C), protegido por uma coluna de proteção de fase reversa C18 (Vydac 218GK54,  $\pm$  5  $\mu\text{m}$ ) e um detector UV-vis (450 nm). A eluição foi realizada com MeOH/CH<sup>3</sup>CN (90: 10, v / v) a uma taxa de fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. A identificação da fucoxantina foi realizada utilizando seu tempo de retenção e co-cromatografia do padrão analítico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A quantificação do metabólito foi

baseada em curva padrão da fucoxantina ( $1-25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $y = 0,0513x$ ;  $R^2 = 0,999$ ). As leituras foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos em g/mg em matéria seca.

### 1.2.6 Análise de dados

Os dados de concentração dos compostos de interesse foram coletados, sumarizados e submetidos ao teste-*t* com ajuste, usando o método *Bonferroni* para os dados de EPA, e análise de variância (ANOVA) precedida de pós-hoc *Tukey* para os dados de FCX. Dados de produtividade foram calculados segundo a função 1 abaixo. Os resultados foram considerados significativos com  $p < 0,05$  e as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se scripts em linguagem R (v.4.1.1).

## 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.3.1 Inibidores enzimáticos

A busca na base de dados BRENDA com posterior seleção de inibidores mais promissores resultou em 14 estratégias de engenharia metabólica (Tabela 2). As estratégias selecionadas foram direcionadas às vias do piruvato e glioxilato. A via da alanina, que também demonstrou potencial nas análises de biologia de sistemas, não apresentou nenhum inibidor com as características pré-selecionadas por serem todos fármacos, não cumprindo assim o critério de baixa toxicidade ao ambiente aquático. Sendo assim, todas as estratégias de engenharia metabólica geradas são direcionadas à distribuição otimizada dos fluxos de carbono inibindo quatro diferentes enzimas das vias do piruvato e do glioxilato.

Dentre as quatro enzimas selecionadas à inibição, duas delas relacionam-se à via do piruvato. As enzimas 2-isopropilmalato sintase e a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase participam de reações ao final da via do piruvato e suas supressões podem resultar em maior disponibilidade de acetil-CoA ao metabolismo, sendo testadas quatro estratégias com este objetivo. De forma similar, isocitrato liase e a aconitato hidratase foram as enzimas selecionadas e relacionadas à via do glioxilato. A aconitato hidratase não foi apontada no estudo de biologia de sistemas. No entanto, diversos trabalhos indicam a uréia como um inibidor da enzima em questão e potencial indutor de ganho de biomassa (ALLEN et al, 2006; BAUER et al., 2018; LEVITAN et al., 2015; OBATA et al., 2013; REES; BEKHEET, 1982; REMMERS et al.,



2018). Como tal enzima faz parte da via de interesse, optou-se por inserir a suplementação de uréia nos experimentos. A enzima com maior número de inibidores identificados foi a isocitrato liase, possibilitando testar nove estratégias de redirecionamento metabólico. De interesse, ressalta-se que esta enzima é específica à regulação da via do glioxilato.

**Tabela 2** – Inibidores enzimáticos escolhidos para estudos nos cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A, com suas respectivas enzimas alvo e a rota metabólica a qual pertencem as enzimas.

Inibidor	ID	Fórmula	Enzima alvo	Rota	Concentração
Cloreto de magnésio	1	MgCl <sub>2</sub>	2-isopropilmalato sintase	Piruvato	20 µM
Cloreto de manganês	2	MnCl <sub>2</sub>	2-isopropilmalato sintase	Piruvato	20 µM
Cloreto de cádmio	3	CdCl <sub>2</sub>	isocitrato liase	Glioxilato	1,5 µM
Pirocatequina	4	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	isocitrato liase	Glioxilato	3,0 µM
Cloreto de cobalto	5	CoCl <sub>2</sub>	isocitrato liase	Glioxilato	1,1µM
Nitrato de cobalto	6	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	isocitrato liase	Glioxilato	100 µM
Oxalato de amônio	7	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	isocitrato liase	Glioxilato	0,5 µM
Oxalato de amônio	8	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	isocitrato liase	Glioxilato	5,0 µM
Sulfato de zinco	9	ZnSO <sub>4</sub>	isocitrato liase	Glioxilato	1,5 µM
Sulfato de amônio	10	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	isocitrato liase	Glioxilato	0,5 µM
Sulfato de amônio	11	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	isocitrato liase	Glioxilato	5,0 µM
Quercetina	12	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase	Piruvato	0,1 µM
Quercetina	13	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase	Piruvato	0,5 µM
Uréia	14	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	aconitato hidratase	Glyoxylato	10 µM

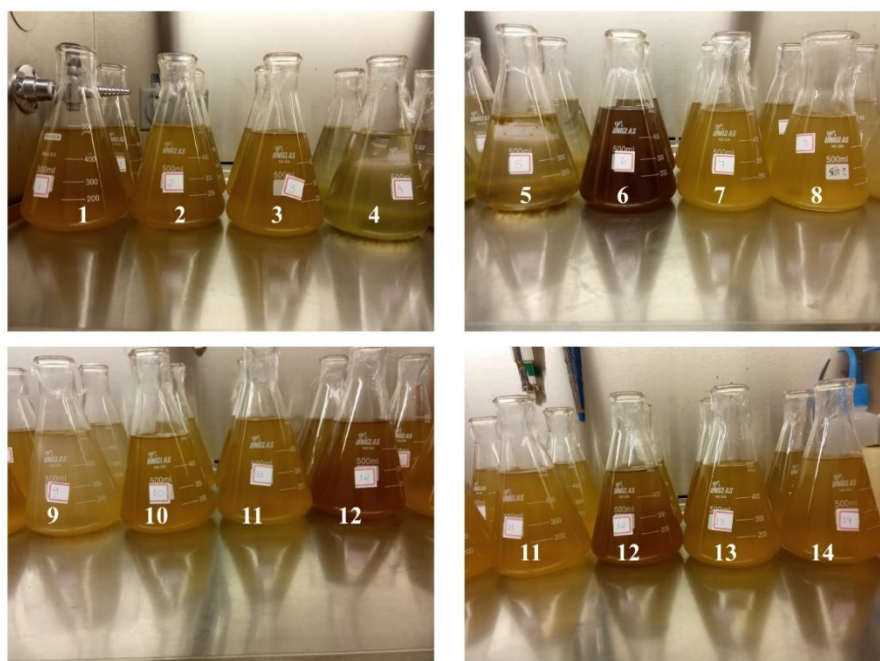
### 1.3.2 Engenharia metabólica aplicada à biorrefinaria de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A

Os experimentos de engenharia metabólica foram realizados em bateladas de forma a direcionar a escolha dos inibidores com melhores resultados. Na primeira fase de experimentos foram aplicados 14 inibidores (n = 2). Foi possível verificar a toxicidade na adição de pirocatequina (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) e de cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>), ocasionando aglutinação das células de forma imediata à adição dos inibidores (Figura 1 - frascos 4 e 5) aos cultivos. Estudos de toxicidade indicam que apesar do cobalto ser um metal essencial que atua diretamente na clorofila P680, em altas concentrações (>2,5 ppp Co<sup>+</sup>) se mostra tóxico para organismos aquáticos, interferindo na assimilação do oxigênio (O<sub>2</sub>) (EL-SHEEKH et al., 2003; LUSTIGMAN; LEE; WEISS-MAGASIC, 1995). No entanto, a espécie *P. tricornutum* é reconhecida por possuir alta tolerância a metais pesados e trabalhos anteriores relatam até

mesmo um efeito estimulador do cobalto sobre taxa de crescimento celular durante as fases exponencial e estacionária (HORVATIC; PERSIC, 2007). Neste trabalho, os cultivos com este composto em forma de cloreto evidenciaram morte celular em menos de 3 h, na concentração de 1,1  $\mu\text{M}$ .

O perfil de ácidos graxos insaturados e os teores de ácidos graxos saturados, insaturados, monoinsaturados e poli-insaturados são mostrados na Tabela 3. O perfil de ácidos graxos saturados pode ser visto com maior detalhe no capítulo anterior. A análise de cromatografia gasosa mostrou o aumento no teor de ácidos graxos saturados em relação ao controle, sendo o mais expressivo (acima de 7%) observado nos cultivos elicitados com cloreto de manganês ( $\uparrow 24,49\%$ ), cloreto de cádmio ( $\uparrow 11,43\%$ ), pirocatequina ( $\uparrow 20,16\%$ ), oxalato de amônio 0,5 $\mu\text{M}$  ( $\uparrow 11\%$ ) e ureia ( $\uparrow 7,02\%$ ). Estes aumentos na porcentagem de ácidos graxos saturados demonstram que estes inibidores não cumprem com os objetivos propostos neste trabalho. Os inibidores com maior potencial em relação a este parâmetro, com redução dos ácidos graxos saturados no perfil lipídico, foram o cloreto de magnésio (5 $\mu\text{M}$ ), a quercetina (0,5 $\mu\text{M}$ ) e o oxalato de amônio (5 $\mu\text{M}$ ).

**Figura 1**– Cultivos *in vitro* de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A no 5º dia de cultivo após a adição dos inibidores enzimáticos. Os números representam a identificação (ID) segundo tabela 2.



**Tabela 3** – Perfil de ácidos graxos insaturados e somatório de ácidos graxos saturados (SAT), insaturados (INSAT) monossaturados (MUFAS) e poli-insaturados (PUFAS) de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A em cultivo de 6 dias, com a adição de inibidores enzimáticos no 5º dia. Os valores (%) são apresentados como média de duas leituras da amostra de dois cultivos independentes por análise de cromatografia em fase gasosa (FID).

Ácido graxo insaturado	Controle	Cloreto de magnésio 20 µM	Cloreto de manganês 20 µM	Cloreto de cádmio 1,5 µM	Pirocatequina 3 µM	Cloreto de cobalto 1,1 µM	Nitrato de cobalto 100 µM	Oxalato de amônio 0,5µM	Oxalato de amônio 5µM	Sulfato de zinco 1,5 µM	Sulfato de amônio 0,5µM	Sulfato de amônio 5µM	Quercetina 0,1µM	Quercetina 0,5µM	Uréia 10 µM
C14:1	0,00	0,00	0,69	0,36	0,00	0,41	0,00	0,41	0,02	0,02	0,10	0,06	0,01	0,02	0,47
C15:1	1,57	1,86	3,01	2,91	2,86	0,00	1,30	1,82	1,70	0,97	1,41	1,31	2,27	1,54	2,06
C16:1	16,42	14,23	8,27	11,77	5,20	12,26	16,49	10,88	17,34	15,24	19,53	15,73	14,62	15,48	7,51
C16:2	0,11	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,17	0,32	0,10	0,14	0,12	0,23	5,38
C17:1	3,07	3,04	1,57	2,18	2,27	2,62	3,13	2,48	3,15	2,91	3,59	2,84	3,06	3,08	2,95
C18:1	11,88	11,82	7,27	11,09	13,77	13,16	11,52	10,56	11,81	12,62	14,53	11,87	12,28	12,14	9,69
C18:2	1,53	1,67	1,22	5,09	4,74	3,74	1,49	1,35	1,47	1,51	1,75	1,65	1,84	1,78	1,02
C16:3	0,68	0,72	0,05	0,21	0,00	0,47	0,74	0,64	0,69	0,89	0,87	0,76	0,76	0,81	0,35
C18:3	0,22	0,23	0,00	0,22	0,07	0,06	0,04	0,42	0,28	0,03	0,25	0,23	0,42	0,29	0,14
C18:4	0,19	0,20	0,00	0,00	0,02	0,01	0,19	0,00	0,21	0,00	0,10	0,17	0,22	0,18	0,08
C22:1	0,37	0,42	0,00	0,00	0,00	0,04	0,03	0,45	0,42	0,42	0,51	0,48	0,45	0,48	0,29
C20:4	0,21	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,12	0,00	0,13	0,20	0,45	0,21	0,64
<b>C20:5</b>	<b>28,96</b>	<b>31,10</b>	<b>15,47</b>	<b>21,89</b>	<b>11,50</b>	<b>25,14</b>	<b>28,47</b>	<b>24,37</b>	<b>28,50</b>	<b>27,48</b>	<b>16,84</b>	<b>28,62</b>	<b>27,89</b>	<b>29,59</b>	<b>23,35</b>
C22:6	1,42	1,39	0,00	1,03	0,13	1,64	1,38	1,09	1,38	1,36	1,50	1,47	1,39	1,51	1,22
<b>SAT</b>	<b>27,18</b>	<b>27,14</b>	<b>51,67</b>	<b>38,61</b>	<b>47,34</b>	<b>29,57</b>	<b>29,15</b>	<b>38,18</b>	<b>25,93</b>	<b>28,66</b>	<b>31,12</b>	<b>28,46</b>	<b>27,18</b>	<b>25,81</b>	<b>34,21</b>
<b>INSAT</b>	<b>66,62</b>	<b>66,66</b>	<b>37,59</b>	<b>56,74</b>	<b>40,59</b>	<b>59,54</b>	<b>64,82</b>	<b>54,76</b>	<b>67,36</b>	<b>63,78</b>	<b>61,27</b>	<b>65,60</b>	<b>66,08</b>	<b>67,33</b>	<b>55,54</b>
<b>MUFAS</b>	<b>33,30</b>	<b>31,36</b>	<b>20,81</b>	<b>28,30</b>	<b>24,10</b>	<b>28,49</b>	<b>32,47</b>	<b>26,60</b>	<b>34,50</b>	<b>32,19</b>	<b>39,67</b>	<b>32,29</b>	<b>32,91</b>	<b>32,73</b>	<b>23,22</b>
<b>PUFAS</b>	<b>33,32</b>	<b>35,30</b>	<b>16,78</b>	<b>28,43</b>	<b>16,49</b>	<b>31,05</b>	<b>32,35</b>	<b>28,16</b>	<b>32,86</b>	<b>31,59</b>	<b>21,60</b>	<b>33,31</b>	<b>33,17</b>	<b>34,60</b>	<b>32,32</b>

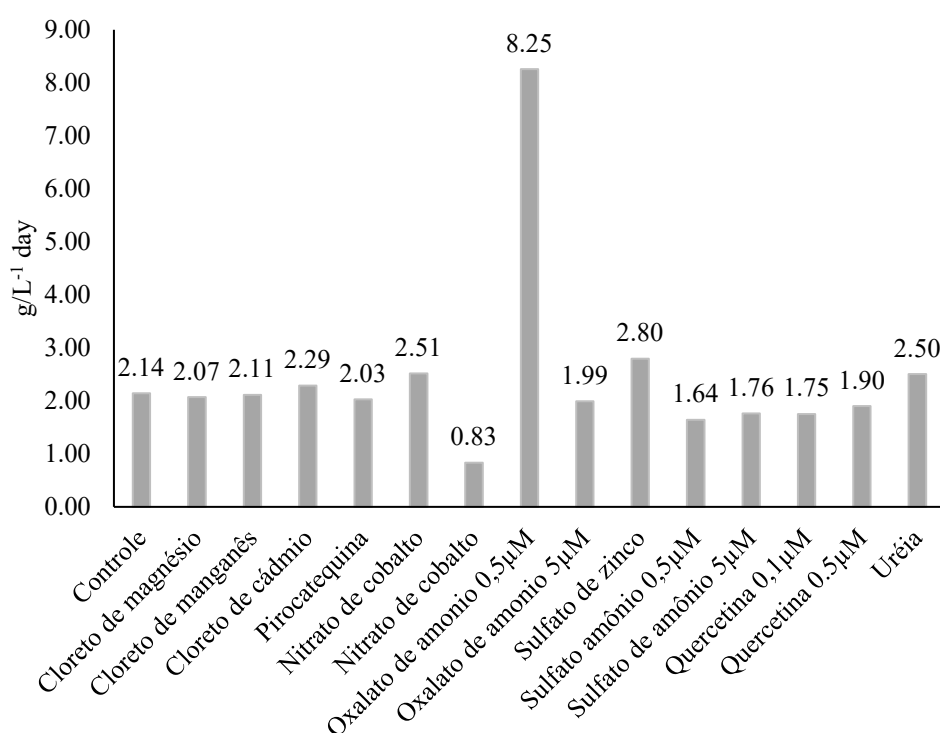
O perfil de ácidos graxos insaturados e o somatório dos teores de MUFAS (ácidos graxos monoinsaturados) e PUFAS (ácidos graxos poli-insaturados) são um indicativo da efetividade das estratégias de engenharia metabólica adotadas à produção de EPA. A adição de cloreto de magnésio, oxalato de amônio (5  $\mu\text{M}$ ) e quercetina (0,5  $\mu\text{M}$ ) proporcionaram aumento no teor de ácidos graxos insaturados totais em relação ao controle (Tabela 3). No entanto, cloreto de magnésio e quercetina (0,5  $\mu\text{M}$ ) aumentaram a sua porcentagem de PUFAS em 1,98% e 1,28%, respectivamente, enquanto a suplementação do meio de cultura com oxalato de amônio (0,5  $\mu\text{M}$ ) aumentou a concentração de MUFAS. A mesma tendência foi detectada quando se direciona a análise à porcentagem de EPA por extração, onde os cultivos com adição de cloreto de magnésio e quercetina a 0,5  $\mu\text{M}$  apresentaram os teores algo superiores daquele metabólito (i.e., 31,10% e 29,50%, respectivamente), em relação ao controle (28,96%). Os dados de quantificação de EPA foram submetidos ao *teste-t* de *Bonferroni*, de modo a verificar se os teores de EPA foram afetados pelos inibidores em relação ao controle (Tabela 4). A análise apontou um efeito positivo com a elicitação dos cultivos com sulfato de amônio a 5  $\mu\text{M}$  e nitrato de cobalto, para além dos inibidores já pontuados, i.e., cloreto de magnésio e quercetina a 0,5  $\mu\text{M}$ .

Dados de produtividade, i.e.,  $\text{g/L}^{-1}$  de biomassa por dia também são considerados um fator importante na tomada de decisão em sistemas produtivos (Figura 2). Os cultivos controle apresentaram valores médios de 2,14  $\text{g/L}^{-1}$ , muito próximo ao encontrado na literatura para a espécie no sexto dia de cultivo (RODOLFI et al., 2017). Os inibidores que aumentaram a produtividade de biomassa foram cloreto de cádmio, cloreto de cobalto, sulfato de zinco e ureia. O oxalato de amônio (0,5  $\mu\text{M}$ ) se destacou, com incremento de 3,8x na produção de biomassa em relação ao controle. No entanto, sabe-se que uma maior produção de biomassa não necessariamente aumenta o rendimento lipídico, visto que o ganho observado pode ser direcionado à produção de outras classes de metabólitos, podendo inclusive penalizar a produção de lipídios, redirecionando o metabolismo à multiplicação celular.

Diante do exposto, dentre os 14 inibidores testados, oito deles foram selecionados como potenciais à otimização do cultivo, de modo a calcular também o rendimento lipídico final por gravimetria. Sendo assim, os inibidores selecionados pelo perfil de ácidos graxos insaturados foram cloreto de magnésio, quercetina e oxalato de amônio. A quercetina e o oxalato de amônio foram testados nas duas concentrações propostas inicialmente, para verificar a efetividade da dose na resposta do rendimento lipídico. Foram também considerados os inibidores sulfato de amônio e nitrato de cobalto, com o objetivo de compreender melhor o efeito destes compostos sobre a produção lipídica microalgal, visto que o primeiro é um forte candidato ao incremento

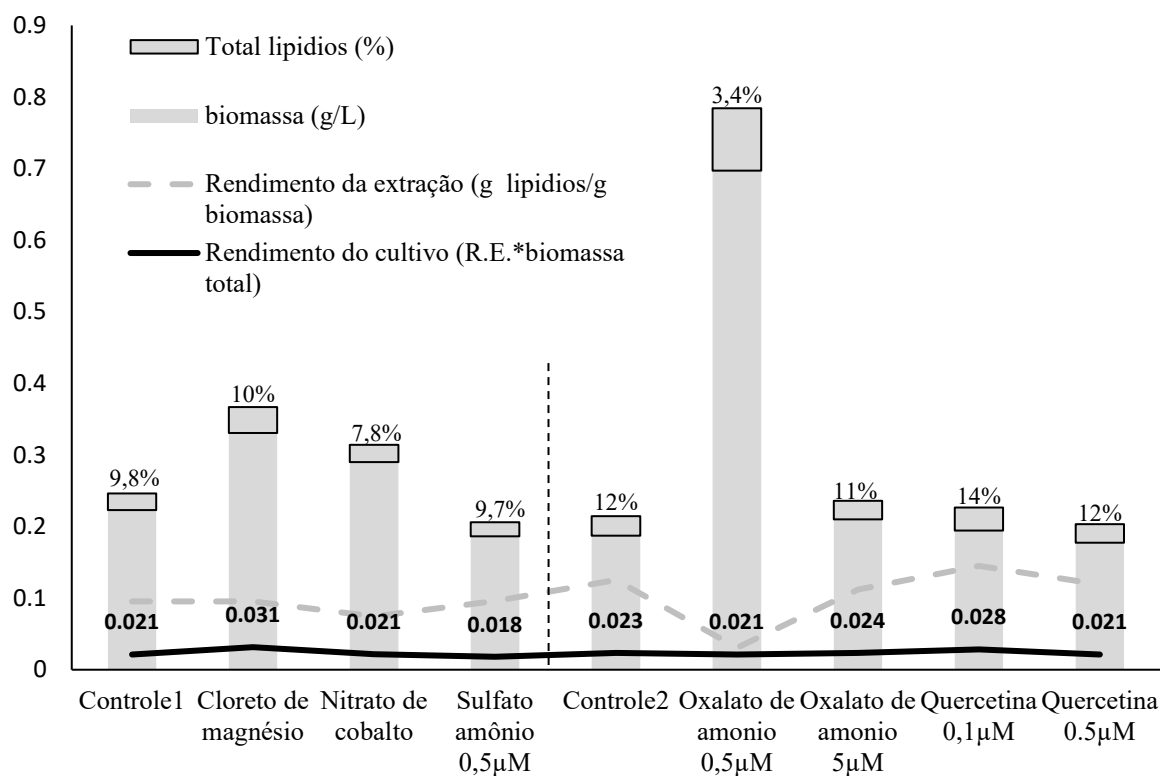
na produção de FCX. No que tange ao nitrato de cobalto, apesar de gerar morte celular, a elicitação dos cultivos com a forma nitrogenada do sal de cobalto proporcionou altos níveis de biossintese de EPA e o aumento da pigmentação no cultivo, o que pode significar maior produção de FCX (Figura 1).

**Figura 2** – Produtividade de biomassa celular (g/L por dia) dos cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A calculados pela razão de biomassa em relação ao produto do volume vs tempo.



O rendimento lipídico dos cultivos que leva em consideração a produção de biomassa e dos dados de gravimetria do óleo extraído permite um melhor entendimento das estratégias de aumento de concentração de lipídios por grama de biomassa seca, considerando-se a produtividade do cultivo (Figura 3). O valor do rendimento lipídico total calculado com referência à biomassa gerada se mostra mais efetivo quando vislumbrada a otimização de um processo, pois amplia a compreensão do aumento de rendimento por cultivos, já que a densidade celular não necessariamente é acompanhada na mesma proporção do peso da biomassa seca, ou ainda da síntese dos compostos de interesse. Sendo assim, o rendimento proporcional à produtividade do cultivo é o parâmetro que elencamos como prioritário nas análises posteriores.

**Figura 3** – Biomassa total (g/L, barras cinzas) e teor de lipídios totais (%) de cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A. Os valores de rendimento relativos à biomassa da extração são apresentados em linha cinza tracejada, enquanto o rendimento total de lipídios por cultivo é indicado em linha preta, com os valores em destaque. Eixo y representa o total de lipídios em porcentagem (%) e g/L quando consideradas as barras cinzas.



As análises de rendimento lipídico do cultivo (linha tracejada) mostraram incrementos de valores para os inibidores cloreto de magnésio ( $\uparrow 2\%$ ) e quercetina a  $0,1 \mu\text{M}$  ( $\uparrow 13\%$ ) e se mostraram efetivos no redirecionamento do metabolismo à produção de lipídios totais. A quercetina ( $0,1 \mu\text{M}$ ) se mostrou mais efetiva no rendimento lipídico final nos cultivos, considerando que o cloreto de magnésio apresentou uma alta produtividade de biomassa que resultou em maior rendimento por cultivo. Apesar do alto rendimento em biomassa seca com a elicitação dos cultivos com oxalato de amônio ( $0,5 \mu\text{M}$ ), estes apresentaram baixo rendimento lipídico por extração, o que influenciou nos baixos valores de rendimento lipídico ( $3,4\%$ ) por cultivo observados. No entanto, quando analisado o valor absoluto de rendimento lipídico (i.e.,  $8 \text{ mg lipídios/L cultivo}$ ) daquele sal de amônio em relação aos efeitos observados com quercetina e cloreto de magnésio ( $3 \text{ mg lipídios/L cultivo}$ ), constata-se sua superioridade

na indução metabólica daquela classe de compostos. Esta regulação negativa do teor total de lipídios tem sido relacionada à alta taxa de crescimento celular (ALIPANAH et al., 2015), mas tal aspecto requer estudos mais detalhados no que se refere ao modelo biológico em estudo.

**Tabela 4** – Percentual de EPA nos cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A com a adição dos inibidores enzimáticos. Em negrito são destacados os resultados sem diferença estatística em relação ao controle teste-t pareado, com ajuste de método *Bonferroni* ( $p > 0,05$ ).

Inibidor	EPA mg/g BS	P-valor
Controle	1,44	
Cloreto de magnésio	<b>1,63</b>	3,7e-11
Cloreto de cádmio	0,11	1,6e-10
Nitrato de cobalto	<b>2,08</b>	2,6e-11
Cloreto de cobalto	0,89	1,9e-09
Pirocatequina	0,93	0,87194
Oxalato de amônio 0,5µM	0,42	3,6e-10
Oxalato de amônio 5µM	<b>1,55</b>	2,5e-05
Sulfato de zinco	1,07	1,0e-07
Sulfato amônio 0,5µM	1,12	0,11561
Sulfato de amônio 5µM	1,13	1,8e-07
Quercetina 0,1µM	<b>1,70</b>	6,8e-06
Quercetina 0,5µM	<b>1,99</b>	3,7e-05
Uréia	1,13	0,00243
Cloreto de manganês	1,20	1,00000

A produção de EPA/g de biomassa e os valores *p* associados àquela variável resultantes do teste-*t* pareado com ajuste de método *Bonferroni* são apresentados na Tabela 4. Os maiores valores resultaram da elicitação dos cultivos com cloreto de magnésio (1,63 mg/g), oxalato de amônio 5 µM (1,55 mg/g) e quercetina nas duas concentrações testadas (1,99 e 1,70 mg/g), comparativamente ao controle (1,44 mg/g). O nitrato de cobalto apresentou valores altos para EPA, mas reduziu a produtividade do cultivo em 0,83 g/L ao dia, representando uma redução de 62% da biomassa/L/dia, não sendo considerada estratégia efetiva e, provavelmente, resultante da toxicidade daquele elemento às células de *P. tricornutum*. De outra forma, cloreto de magnésio, oxalato de amônio e quercetina demonstraram efetividade à produção de EPA.

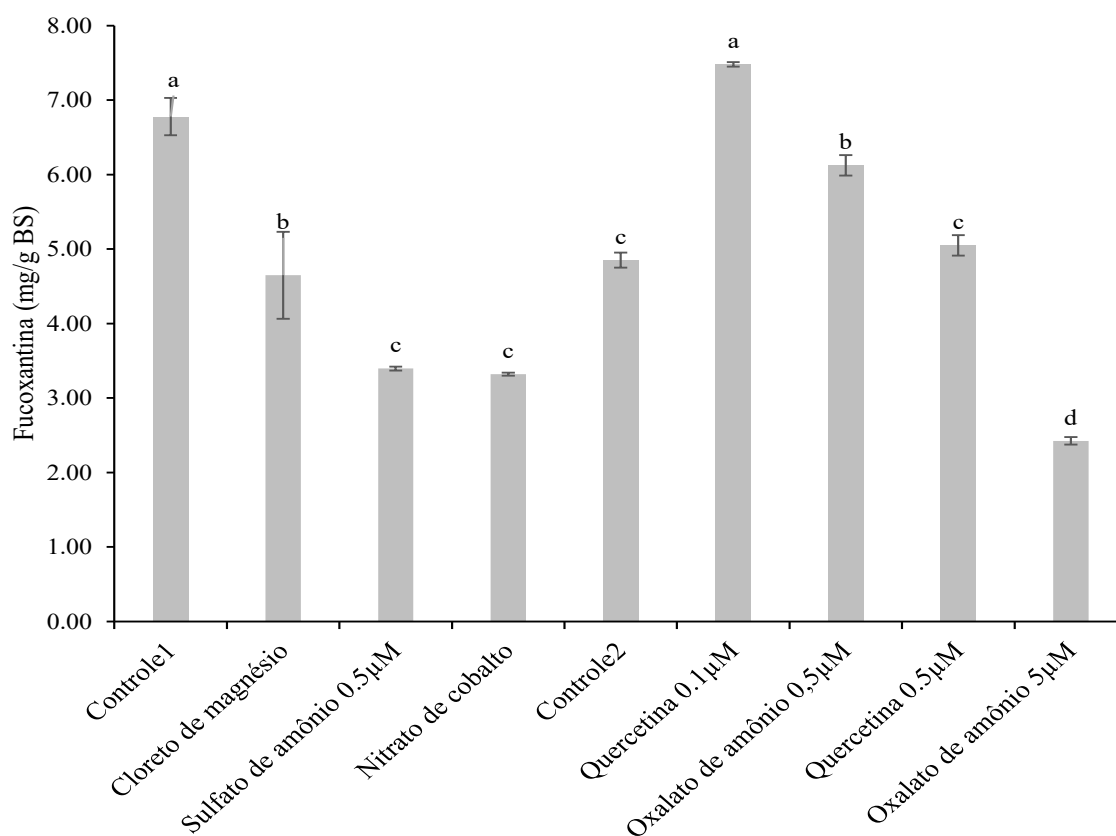
Ao analisar os dados de concentração de carotenoides em relação a biomassa microalgal, os inibidores com maior rendimento foram a quercetina 0,1 µM (↑54%), oxalato de amônio 0,5 µM (↑26%) e a quercetina 0,5 µM (↑4%) (Figura 4). Este último inibidor mostrou-se mais efetivo no aumento dos teores de FCX, com incremento de 0,7 mg/g BS em

relação ao controle, na concentração mais baixa do inibidor, enquanto a concentração mais alta não diferiu estatisticamente. O oxalato de amônio também aumentou a concentração de FCX e como induziu alta produtividade de biomassa, também é indicado para a elicitação celular, visando o aumento da produção de FCX nos cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A.

**Figura 4** – Conteúdo de fucoxantina (mg/g BS) em células de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A ao 6º dia de cultivo em meio de cultura f/2, com adição dos inibidores enzimáticos no 5º dia.

Os valores representam a média de duas amostras independentes. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os dias (ANOVA, teste post hoc de Tukey, onde  $p < 0,05$ ).

Dados referentes a duas bateladas e, portanto, o controle 1 é relacionado ao cloreto de magnésio, sulfato de amônio e nitrato de cobalto. Por sua vez, o controle 2 relaciona-se aos dados de cultivos a sua direita, i.e., quercetina e oxalato de amônio em suas duas concentrações.



BS= Biomassa seca



### 1.3.3 Rendimento e produtividade final de EPA e FCX

A efetividade do rendimento na produção de EPA e FCX devem levar em consideração os valores relativos à concentração do composto por biomassa e seu rendimento em relação a produtividade do cultivo, ou seja, a concentração do composto em relação ao seu rendimento nos cultivos microalgais. Os inibidores que demonstraram resultados efetivos na produção de EPA e FCX foram a quercetina (0,1  $\mu\text{M}$ ), o oxalato de amônio (0,5  $\mu\text{M}$ ) e o cloreto de magnésio (20  $\mu\text{M}$ ) (Tabela 5). O cloreto de magnésio aumentou moderadamente o conteúdo de EPA, porém induziu uma redução de produtividade e teor de FCX, sendo considerado como uma opção apenas quando vislumbrada a produção de ácidos graxos isoladamente, fugindo do contexto de biorrefinaria. O oxalato de amônio suplementado ao meio de cultura em baixas concentrações (0,5  $\mu\text{M}$ ) não resultou em valores aumentados dos compostos de interesse, no entanto, o incremento de produtividade em biomassa observado lhe conferiu alto rendimento ao final do cultivo. A quercetina apresentou valores apreciáveis de FCX e EPA em sua menor concentração molar, mostrando-se o inibidor mais efetivo na otimização do rendimento de cultivo.

**Tabela 5** – Efeito dos principais inibidores enzimáticos no conteúdo de EPA e de FCX, em relação à produção de biomassa seca (mg/g BS), rendimento por litro de cultivo (mg/L), produtividade total de biomassa ao 6º dia (g./L) e rendimento final dos compostos alvo por litro de cultivo.

Inibidor	Produtividade g.L <sup>-1</sup> dia	Biomassa Total	[ ] EPA mg/g BS	Rend. EPA mg/L	[ ] FCX mg/g BS	Rend. FCX mg/L
Controle	2,14	0,24	1,44±0,06	0,26	6,77±0,24	1,67
Cloreto de magnésio 20 $\mu\text{M}$	2,07	0,36	1,62±0,03	0,28	4,64±0,58	1,70
Controle	2,14	0,24	1,44±0,06	0,26	4,85±0,17	1,04
Oxalato de amônio 0,5 $\mu\text{M}$	8,25	0,23	0,42±0,07	0,29	6,12±0,68	1,44
Oxalato de amônio 5 $\mu\text{M}$	1,99	0,78	1,55±0,51	0,26	2,42±0,16	1,90
Quercetina 0,1 $\mu\text{M}$	1,75	0,22	1,98±0,56	0,29	7,47±0,22	1,69
Quercetina 0,5 $\mu\text{M}$	1,90	0,20	1,70±0,05	0,27	5,04±0,20	1,03

O oxalato de amônio (0,5  $\mu\text{M}$ ) se mostrou mais efetivo no aumento da produtividade do cultivo (Figuras 2 e 3). Aquele elicitor na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  aumentou a produtividade

em 6.11 g. L<sup>-1</sup> dia, em relação ao controle. Em contrapartida, a concentração de EPA e FCX por mg de biomassa foi mais baixa em comparação à quercetina e cloreto de magnésio. No entanto, o rendimento destes compostos em relação à produção do cultivo (L) evidenciou ganhos de 11,5% (EPA) e 38,4% (FCX), representando um aumento no valor total de rendimento em cada litro de cultivo (Tabela 5). O valor gasto em oxalato de amônio por litro de cultivo é de R\$ 0,06 e, sendo assim, tem-se uma elevação reduzida no custo dos cultivos com a adição daquele inibidor, tendo em conta os valores do EPA e FCX. Assim, entende-se ser o oxalato de amônio o melhor elicitor à otimização da produtividade em biomassa para o processo de biorrefinaria de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A.

Os altos rendimentos de cultivos suplementados com oxalato de amônio podem ser relacionados ao fato da capacidade da espécie em assimilar o amônio como fonte nitrogenada primária. Evidências indicam que o genoma de *P. tricornutum* apresenta 5% de origem bacteriana bem conservados, sendo muitos deles envolvidos no metabolismo do nitrogênio (ALLEN et al., 2006; BOWLER et al., 2008). Esses genes adicionais podem ser responsáveis por sua capacidade de utilizar o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte de nitrogênio, aumentando sua taxa de crescimento, embora aparentemente exija mudanças metabólicas. De fato, o transcriptoma da espécie quando exposto aquela forma de nitrogênio reduzido inibiu a nitrato redutase e, conseqüentemente, a assimilação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (ORBORN E HOOK, 2013). A resposta transcriptômica da espécie frente à adição de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> alterou 545 transcritos, principalmente os relacionados à absorção de ferro, glutamina sintetase e transportadores de nitrato. A lista de genes elicitados pela adição do íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> apresentou maior número de transcritos envolvidos na tradução e processos metabólicos de proteína celular. Como consequência do aumento dos processos relacionados a proteína celular, observou-se aumento da taxa de crescimento do cultivo.

O processo de assimilação de nitrogênio pela célula é altamente custoso energeticamente, sendo a preferência dada ao íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, uma forma de reduzir gastos energéticos celulares. A assimilação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e sua conversão em NO<sub>2</sub><sup>-</sup> demanda o gasto de 2 elétrons e a conversão de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em NH<sub>4</sub><sup>+</sup> utilizará mais 6 elétrons, que por fim requererá 2 elétrons e 1 ATP para a formação de glutamato (BLOOM et al., 1992). A exigência energética da assimilação do amônio é menor em relação ao nitrato, em razão do primeiro não precisar ser reduzido para sua incorporação em aminoácidos (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

O oxalato de amônio a 0,5 µM foi extremamente efetivo no incremento da produtividade de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A, mas quando utilizado na concentração de 5 µM causou redução da produtividade de biomassa em peso seco em relação ao controle. Isso se deve pelo

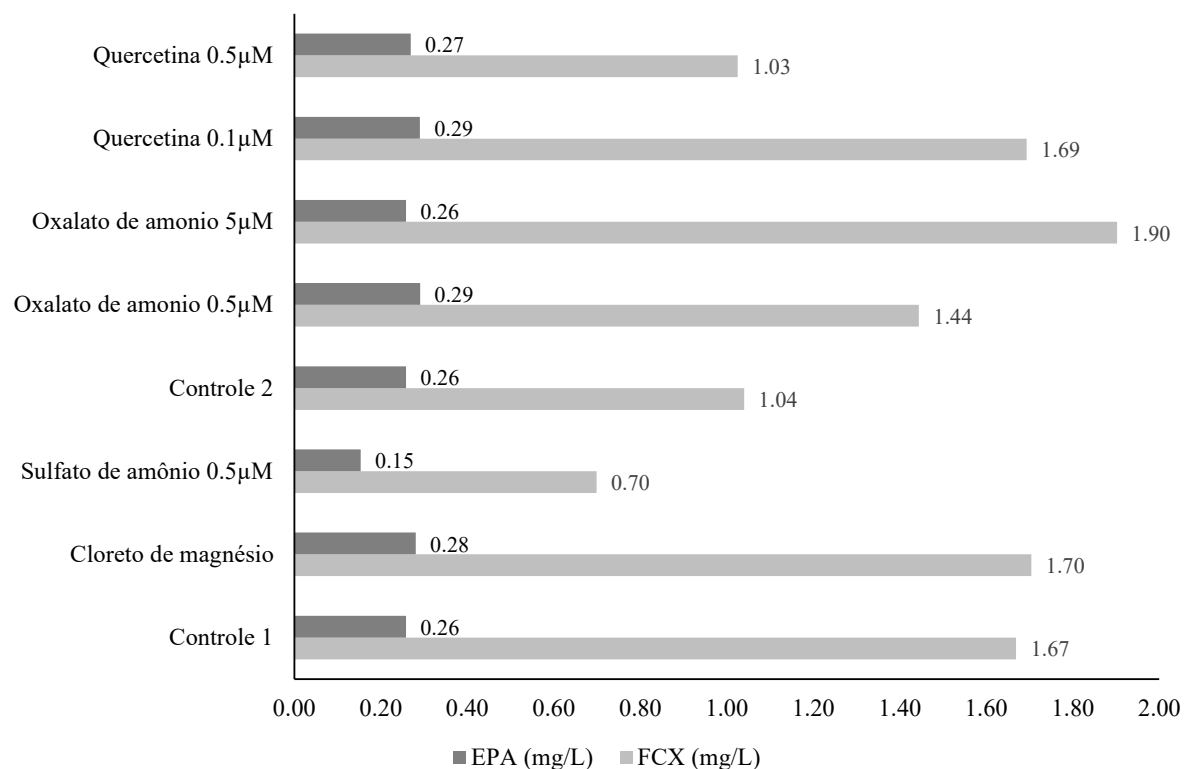
fato de altas concentrações serem consideradas tóxicas às células microalgais, pois direcionam o metabolismo à acumulação de  $\text{NH}_4^+$  livre, interferindo na taxa de crescimento do cultivo (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000).

O cloreto de magnésio aumentou a biossíntese de EPA e a FCX nos cultivos. Sua adição proporcionou maiores valores de FCX (1,7 mg/L) comparado ao controle, i.e. 1,67 mg/L, e também aumentou o conteúdo de EPA de 0,28 mg/L, em comparação a 0,26 mg/L do controle. Apesar destes aumentos aparentemente baixos, levando-se em conta a escalabilidade do processo e o baixo valor requerido à adição de cloreto de magnésio aos cultivos (R\$ 0,57 /L), a estratégia pode ser considerada promissora, visto que aumentou os teores dos dois compostos de interesse, tipicamente no contexto proposto à biorrefinarias.

Alguns trabalhos mostram o aumento da produtividade lipídica e alterações no perfil de ácidos graxos em espécies de microalgas sob estresse salino. Testes com suplementação de magnésio em *Chlorella vulgaris* demonstraram um aumento de até 2X da produtividade lipídica frente à elicitación por este composto (GORAIN et al., 2013). Evidências apontam que a suplementação de Mg ao cultivo aumentaria a biomassa celular, pois a clorofila tem no íon magnésio o elemento de coordenação do núcleo porfirínico de sua estrutura molecular. Como esperado, *P. tricornutum* CCAP 1052/1A aumentou sua produtividade relacionada à biomassa produzida de 0,24 mg/L no controle para 0,36 mg/L com a adição de  $\text{MgCl}_2$ . Em confluência ao aumento da produtividade da biomassa do cultivo, seu rendimento lipídico também foi superior, elevando-se de 0,02 para 0,03 g de lipídios/g de biomassa. Estes valores representam uma elevação da biossíntese de EPA pelo cultivo celular, a qual foi incrementado com a elicitación com  $\text{MgCl}_2$  (i.e., 0,35 g EPA/ L  $\rightarrow$  0,59 g EPA/ L). O aumento representa 68% a mais de EPA por litro, demonstrando assim ser efetivo à engenharia metabólica da espécie.

A quercetina nas concentrações mais baixas (0,5  $\mu\text{M}$ ) se mostrou mais efetiva no aumento do rendimento do cultivo apresentando uma biomassa rica em EPA e FCX (Figura 4). Na concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  aquele flavonoide propiciou ganhos de 0.65 mg/L e 0.02 mg/L em FCX e EPA, respectivamente, representando um aumento no valor total de rendimento para cada litro de cultivo (Tabela 5). O custo estimado da adição de quercetina por litro de cultivo é R\$ 0,05, indicando ser o melhor inibidor à otimização do processo de biorrefinaria visando a otimização das biossínteses de EPA e FCX.

**Figura 5** – Rendimentos (mg/L) dos cultivos de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A em relação à biossíntese de EPA e FCX ao 6º dia de cultivo, em meio de cultura f/2, com a adição dos inibidores enzimáticos ao 5º dia.



A quercetina é um flavonoide conhecido por diminuir as espécies reativas de oxigênio (ROS) e o estresse oxidativo, além de inibir a xantina oxidase e a peroxidação lipídica, exibindo atividade de eliminação de radicais livres (JOHNSON; LOO, 2000; SILVA et al., 1998). A adição deste composto antioxidante no meio de cultura pode resultar na supressão de reações de radicais livres que participam da foto-oxidação dos carotenoides (TAKAHAMA, 1984), já que a ação da quercetina frente espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em comparação com outros carotenoides é mais efetiva. Quando comparado o poder de reação perante os radicais livres da quercetina e da FCX, o composto fenólico foi mais efetivo, apresentando valores de eliminação do radical peroxil ( $\text{ROO}^\cdot$ ) de 0,84, do radical hidroxil ( $\text{HO}^\cdot$ ) em 1,42, do ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) em 5,63 e de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) em 0,97. FCX mostrou valores inferiores de eliminação dos radicais  $\text{ROO}^\cdot$  (0,43),  $\text{HO}^\cdot$  (1,18), enquanto nenhum efeito foi detectado ao radical  $\text{ONOO}^\cdot$ , sendo, contudo, mais eficiente na eliminação do ácido hipocloroso (6,26). Tais efeitos da quercetina contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pode estar influenciando positivamente o acúmulo de FCX e EPA, já que compostos oxidantes iniciam reações de radicais que ocorrem em regiões lipofílicas no estágio inicial da fotodegradação da

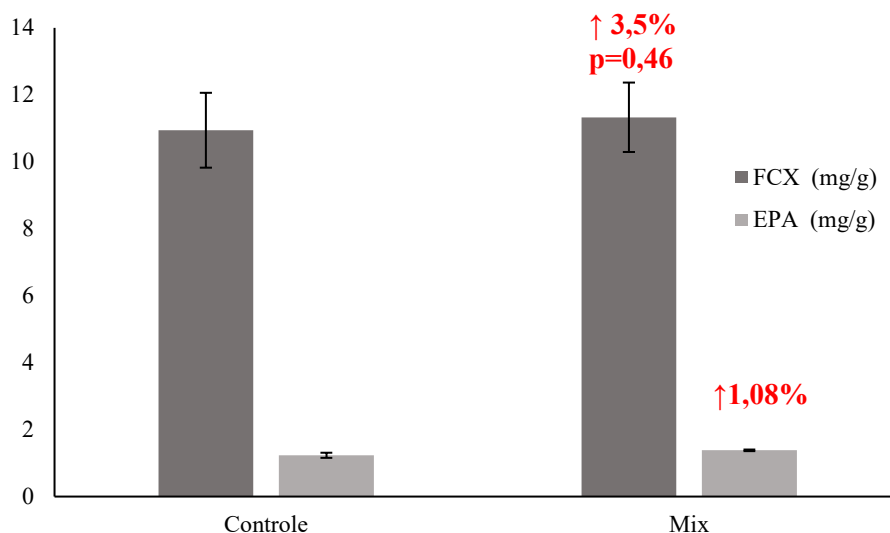
FCX, com a formação de hidroperóxidos lipídicos que continuam a atacar os ácidos graxos poli-insaturados vizinhos gerando produtos voláteis resultantes da oxidação lipídica (RODRIGUES et al., 2012; LIU et al., 2021). Os ácidos graxos poli-insaturados gerados reagem com a molécula de quercetina formando ésteres de DHA e EPA e estudos iniciais indicam que essa alteração aumenta o seu poder antioxidante, mas não apresenta aumento significativo do teor de EPA (ZHANG et al., 2021; LIU et al., 2021). Estes achados sugerem que para além do redirecionamento do metabolismo frente a inibição de vias, a pentahidroxi flavona quercetina também é indicada quando se objetiva um ambiente favorável à manutenção das moléculas sintetizadas, i.e., estabilidade.

A estratégia deste trabalho visou a quercetina pela ação inibitória da enzima formadora de corpos cetônicos, i.e., hidroximetilglutaril-CoA liase, que compete pelo acetil-CoA proveniente do Piruvato para a síntese de ácidos graxos. A hipótese testada no presente trabalho é que a inibição desta enzima resultará em maior conteúdo de acetil-CoA disponível à formação lipídica. Para além deste fato, a formação de corpos cetônicos é resultado dos produtos da transformação de lipídios em glicose. Com a inibição desta enzima espera-se uma redução na degradação de moléculas lipídicas para obtenção de substrato para a via formadora de corpos cetônicos. O que se pode perceber pelos resultados do presente trabalho é o aumento da concentração de EPA por biomassa ( $\uparrow 37,5\%$ ), às expensas de menor produtividade em biomassa dos cultivos comparativamente ao controle, o que afetou o rendimento de EPA ( $\uparrow 7\%$ ). O impacto na produtividade do cultivo pode ser associado à inibição da atividade da PEPC pela quercetina, reduzindo a taxa líquida de evolução de oxigênio e, desta maneira, prejudicando a fixação de glucose pela célula (McGINN e MOREL, 2008). Os flavonoides afetam de maneiras diversas muitos sistemas enzimáticos. A quercetina, em específico, possui relatos de atividade inibitória como antagonista competitivo de quinases em enzimas com atividade fosforiladora, principalmente as que utilizam adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) como doadores de grupamento fosfato (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000). Os trabalhos que avaliam a ação inibidora da quercetina em sistemas enzimáticos são atualmente voltados de forma mais frequente à alteração de lipídios no metabolismo humano, diferindo em muito do organismo estudado, sendo difícil extrapolar os resultados aqui descritos neste contexto.

Diante dos resultados promissores do oxalato de amônio e quercetina frente ao aumento da produtividade e dos biocompostos de interesse, foi desenhado um experimento com os dois inibidores de modo a verificar se a aplicação dos dois poderia aumentar ainda mais a produtividade e posteriormente o rendimento. A estratégia utilizada visou a aplicação dos

inibidores estrategicamente em dois momentos, onde inicialmente o oxalato de amônio foi utilizado no dia 5 do cultivo para aumentar a produtividade, e no dia 6 foi adicionada quercetina para gerar um ambiente antioxidante e protetor das moléculas de FCX e EPA. No 7º dia de cultivo as células foram coletadas, dessalinizadas e centrifugadas. Essa estratégia aumentou em 3,5% a concentração de FCX e em 1,08% da concentração de EPA (Figura 6). A produtividade de biomassa foi de 0,26 mg/L para os dois cultivos, inferindo que as 20h entre a adição dos inibidores oxalato e quercetina não foi o suficiente para aumentar a produtividade do cultivo significativamente, quando comparada à adição dos dois compostos separadamente. O cultivo de duas etapas também ocorreu em 7 dias o que, segundo as análises do metaboloma descritas no capítulo IV, não constitui o tempo de cultivo mais favorável ao incremento dos compostos de interesse. Sendo assim, entende-se que o *mix* de inibidores não se mostrou efetivo nesta conformação estratégica com desenho experimental de 7 dias, onde apenas a inserção da quercetina já se mostra mais efetiva sem os gastos adicionais com o oxalato de amônio. A estratégia se mostra mais latente se a adição do oxalato de amônio for realizada no dia 1 do cultivo, dando maior tempo de adaptação ao composto para melhor redirecionar o metabolismo.

**Figura 6** – Rendimentos (mg/g) de *P. tricornutum* CCAP 1052/1A em relação à biossíntese de EPA e FCX no 7º dia de cultivo em meio de cultura f/2, com adição de mix de inibidores enzimáticos, i.e., quercetina e cloreto de magnésio, ao 5º e 6º dia.



#### 1.4 CONCLUSÃO

As informações obtidas neste estudo são de alto valor para a indústria de microalgas, pois permitem o desenho de explorações industriais mais eficazes nas quais a produtividade

desta espécie será maximizada pela manipulação de suas condições de cultivo sem a necessidade de aplicação de engenharia genética. Dentre os 14 inibidores testados, a adição de cloreto de magnésio, oxalato de amônio e quercetina proporcionou aumento na produtividade, teor de PUFAS e EPA e ainda do carotenoide FCX. Se os cultivos forem direcionados ao incremento de biomassa, o ideal é a suplementação com oxalato de amônio, enquanto o aumento do rendimento lipídico é conseguido com o cloreto de magnésio. Por sua vez, o aporte de quercetina foi relevante no aumento principalmente de FCX e EPA, sendo o mais indicado para os bioprocessos que visam a biorrefinaria. Estes resultados fornecem direcionamento relevante para o melhor desenho de processos de produção de biocompostos em microalgas por meio da manipulação das condições de crescimento, sem a necessidade de submetê-las à manipulação da engenharia genética.

## CONCLUSÕES FINAIS

O desenvolvimento da engenharia metabólica aplicada às microalgas vem crescendo na última década com o sequenciamento do genoma de algumas espécies modelo que facilitam os estudos em biologia de sistemas e, assim, possibilitam o entendimento do metabolismo das algas como um todo. A análise de biologia de sistemas, juntamente com o aumento da disponibilidade de bancos de dados e software de acesso aberto, permite mais precisamente a descoberta de gargalos no metabolismo microalgal que podem servir como alvos para engenharia metabólica. Dentre as estratégias de engenharia metabólica em *P. tricornutum*, aquelas que utilizam o conhecimento da biologia de sistemas e aplicam a engenharia genética são as mais promissoras. No entanto, no que diz respeito ao conceito de biorrefinaria aplicado a esta espécie, é fundamental compreender os pontos de controle e regulação das vias biossintéticas de múltiplos compostos de interesse biotecnológico. Nesse sentido, as tecnologias das ciências ômicas são verdadeiramente úteis porque visam compreender os sistemas como um todo como visto no Capítulo I em maior extensão. Embora a ideia de biorrefinaria seja altamente atrativa, numerosos avanços e ajustes ainda são necessários para tornar a biorrefinaria de microalgas economicamente viável. O próprio conceito envolve não apenas uma multiplicidade de produtos, mas também protocolos que vão desde a engenharia metabólica de organismos até os processos *upstream* e *downstream* para a obtenção dos produtos com a qualidade desejada. Avanços ocorreram em todas as áreas do processo de biorrefinaria e precisam ser refinados e avaliados em escala industrial para se tornarem biotecnologicamente relevantes.

De modo a estabelecer um grau de controle de qualidade das análises dos metabólitos, os Capítulos II e III buscaram validar a metodologia de extração de EPA e FCX na espécie modelo bem como testar a estabilidade do carotenoide FCX, visto que é um metabolito sensível quando exposto a luz, temperatura e oxigênio. Referente a metodologia de extração, os protocolos de BLIGH E DYER são recomendados devido à sua maior seletividade para PUFAs, aumentando o valor nutracêutico dos extratos. No que diz respeito à recuperação de carotenoides da biomassa microalgal, vale ressaltar que resultados semelhantes foram detectados no rendimento relativo de extração (%) da fucoxantina. Em relação a estabilidade de FCX, os extratos metanólicos mantidos a -20°C e -80°C preservaram os teores da molécula por mais tempo do que a biomassa da espécie estudada. Além disso, o tipo de conformação geométrica da FCX resultante de cada forma de armazenamento, ou seja, biomassa ou extrato, também deve ser considerada, sabendo que a conformação da molécula determina fortemente



sua bioatividade. Essas informações são relevantes em conexão com protocolos de controle de qualidade de amostras armazenadas contendo aquele pigmento, especialmente porque se mostram importante quanto às suas aplicações em produtos e processos biotecnológicos.

Para aumentar a produção de lipídios e carotenoides voltados a biorrefinaria de microalgas e ao mesmo tempo superar seu efeito negativo sobre o crescimento, pesquisas recentes têm se concentrado no desenvolvimento de duas estratégias. Por um lado, o conhecimento das vias metabólicas envolvidas no armazenamento de energia e sua regulação tem fornecido a base para a engenharia metabólica de microalgas em cepas com maior produtividade dos compostos de interesse. Por outro lado, para evitar a controvérsia social e científica associada à comercialização de cepas geneticamente modificadas e os possíveis riscos ambientais, estudos foram conduzidos no sentido de aumentar a produtividade de EPA e FCX pela manipulação das condições dos meios de cultura.

Análises metabolômicas direcionadas a concentração dos metabólitos de interesse demonstraram que o tempo de cultivo com maior concentração dos metabólitos são entre os dias 6 e 10. Estes resultados de composição bioquímica do cultivo em diferentes tempos correlacionada a densidade celular do cultivo refletiu o potencial fisiológico da produtividade de biorrefinaria para a espécie. Com estes resultados podemos perceber que a síntese de fucoxantina é muito mais estável que a síntese do ácido eicosapentenoico. Quando analisados dados não direcionados com foco em biologia de sistemas, foi possível identificar vias com potenciais a serem redirecionadas para a produção dos metabólitos de interesse e a partir de bancos de dados foram criadas estratégias da otimização do processo produtivo.

Foram pensadas 14 estratégias testadas, o aporte de cloreto de magnésio, oxalato de amônio e quercetina demonstraram os melhores resultados voltados a engenharia metabólica. Se os cultivos forem direcionados ao incremento de biomassa o ideal é a suplementação com oxalato de amônio, se o objetivo for o aumento do rendimento lipídico o Cloreto de magnésio elicitou as maiores concentrações, enquanto o aporte de quercetina foi relevante no aumento principalmente de FCX e EPA, sendo a mais indicada para o uso em processos de biorrefinaria. Estes resultados fornecem direcionamento relevante para o melhor desenho de processos de produção de biocompostos em microalgas por meio da manipulação das condições de crescimento sem a necessidade de submetê-las à manipulação da engenharia genética.

As informações obtidas neste estudo são de alto valor para a indústria de microalgas, pois permitem o desenho de explorações industriais mais eficazes nas quais a produtividade desta espécie será maximizada pela manipulação de suas condições de cultivo sem a

necessidade de aplicação de engenharia genética, e também possibilita o desenvolvimento de estratégias para a produção de biocompostos a partir de outras espécies de microalgas.

## REFERÊNCIAS

- BELLOU, S. et al. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1476-1493, 2014.
- BENAVIDES, A. M. S. et al. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. **Biomass and Bioenergy**, v. 54, p. 115-122, 2013.
- BOROWITZKA, A. M.; MOHEIMANI, R. N. Algae for Biofuels and Energy Developments in Applied Phycology 5. In: BOROWITZKA, M. A. (Ed.). **Algae for Biofuels and Energy**. Springer, vol. 5, p. 133-152, 2013.
- BOWLER, C. et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 239–244, 2008.
- BUNDY, J. G.; DAVEY, M. P.; VIANT, M. R. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. **Metabolomics**: Official journal of the Metabolomic Society, v. 5, n. 1, p. 3–21, 2009.
- CARRIJO, R. D. S. et al. Uso de microalgas para a produção de biodiesel: vantagens e limitações. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 5, n. 1, p. 23–33, 2015.
- DE-JONG, Ed; LANGEVELD, H and RENE V. R. Biorefinery. Biorefineries: giving value to sustainable biomass use. In: **The Biobased Economy**. Routledge, p. 132-151, 2013.
- DESBOIS, A. P. et al. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 755–764, 2008.
- EUROPABIO. Report European Association for Bioindustries, **EUROPABIO**, Brussels, 2011.
- FERREIRA, A. F. Conceito de biorrefinaria. In: RABAÇAL, M. et al. (Eds.). **Biorrefinarias. Lecture Notes in Energy**. Springer, 2017. v. 57.
- GAO, W. et al. Characteristics studies of molecular structures in drugs. **Saudi Pharmaceutical Journal**: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society, v. 25, n. 4, p. 580–586, 2017.
- GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. AlgaeBase. **World-wide Electronic Publication**, National University of Ireland, Galway. 2017. URL: <http://www.algaebase.org>, 2017.
- HE, Q. et al. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 219-228, 2015.

HORGAN, R. P.; KENNY, L. C. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. **The Obstetrician & Gynaecologist**, v. 13, n. 3, p. 189-195, 2011.

KIM, S. M. et al. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 7, p. 1843–1855, 2012.

MCCORMICK, K.; KAUTTO, N. The bioeconomy in Europe: An overview. **Sustainability**, v. 5, n. 6, p. 2589-2608, 2013.

MILIĆEVIĆ, D., et al. The role of total fats, saturated/unsaturated fatty acids and cholesterol content in chicken meat as cardiovascular risk factors. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 1, p. 1-42, 2014.

MIYASHITA, K., NISHIKAWA, S., BEPPU, F., TSUKUI, T., ABE, M., HOSOKAWA, M. Allenic carotenoid, fucoxanthin, as a novel marine nutraceutical from brown seaweed. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 91, p. 1166-1174, 2011.

MURADIAN, K. H., VAISERMAN, A., MIN, K. J., FRAIFELD, V. E. Fucoxanthin and lipid metabolism: A minireview. **Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 10, p. 891-898, 2015.

OCDE. Report Organization for economic cooperation and development. **OCDE**, Paris, 2009.

ORTH, J. D.; THIELE, I.; PALSSON, B. Ø. What is flux balance analysis? **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 245–248, 2010.

PECK, P. et al. Examining understanding, acceptance, and support for the biorefinery concept among EU policy-makers. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining: Biofpr**, v. 3, n. 3, p. 361–383, 2009.

PENG, K. et al. The Bioeconomy of Microalgal Biofuels. In: **Energy from Microalgae**. Cham: Springer International Publishing, p. 157–169, 2018.

ROSATO, A. et al. From correlation to causation: analysis of metabolomics data using systems biology approaches. **Metabolomics**, v. 14, n. 4, p. 37, 2018.

SACHINDRA, N. M. et al. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8516-8522, 2007.

SIDDIKI, S. Y. A. et al. Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. **Fuel**, v. 307, n. 121782, p. 1-31, 2022.

TREDICI, M. R. et al. Energy balance of algal biomass production in a 1-ha “Green Wall Panel” plant: how to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high net energy ratio. **Applied Energy**, v. 154, p. 1103-1111, 2015.

WESTERHOFF, H. V.; PALSSON, B. O. The evolution of molecular biology into systems biology. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1249-1252, 2004.

XU, J. et al. Investigation on biochemical compositional changes during the microbial fermentation process of Fu brick tea by LC–MS based metabolomics. **Food Chemistry**, v. 186, p. 176-184, 2015.

ZHANG, C.; HU, H. High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation. **Marine Genomics**, v. 16, p. 63–66, 2014.

ZHANG, A. et al. Metabolomics for biomarker discovery: moving to the clinic. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.