



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DE ALGAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

BRUNO BATISTA

***Chlorella sorokiniana* COMO BIOFÁBRICA PARA PRODUÇÃO
DE LUTEÍNA**

UMA REVISÃO A PARTIR DA ENGENHARIA METABÓLICA

São Carlos - SP
2022

BRUNO BATISTA

***Chlorella sorokiniana* COMO BIOFÁBRICA PARA PRODUÇÃO DE LUTEÍNA.
UMA REVISÃO A PARTIR DA ENGENHARIA METABÓLICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos para à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ana Teresa Lombardi

**São Carlos - SP
2022**

Dedico este trabalho para minha família e a todos aqueles que acreditaram em mim e fizeram parte desta história.

AGRADECIMENTOS

É com imenso prazer que agradeço aos meus pais Maria Amélia Kreitlow e Sandro Batista por todo suporte e apoio nessa jornada, por acreditarem e confiarem em mim durante todos esses anos de graduação.

Agradeço a todos os meus amigos pelas risadas e por com certeza deixarem essa fase a melhor possível. Um agradecimento especial a todos do apartamento XVI, pois foi ali que passei os momentos mais esplendidos e adquiri conhecimentos que levarei para vida toda.

Agradeço a todos os professores que contribuíram com minha formação acadêmica. Em especial a minha orientadora Ana Teresa Lombardi por acreditar neste trabalho.

Agradeço a minha namorada Gabriela por estar comigo em todos os momentos, sendo meu ponto de paz durante os tempos difíceis e deixando a vida mais bonita.

E por final, agradeço as instituições que contribuíram diretamente para minha formação como a Universidade Federal de São Carlos, a Agência de Fomento a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), o Centro Nacional de Energia e Materiais (CNPEM) e a BRASKEM, sendo fonte de conhecimento e de amigos que levarei para toda vida.

O segredo de uma vida boa está em não se lamentar pelo passado, não se preocupar com o futuro, nem se adiantar aos problemas, mas viver sabida e seriamente o presente. A paz que procuram já está no vento que sopra, no ar que respiram, na nuvem que passa, no sol que aquece, e na chuva que molha."

- Buda

RESUMO

A luteína é um carotenoide de interesse industrial por possuir aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica, com benefícios para a saúde humana. Atualmente sua produção se dá por meio de flores de calêndula, o que utiliza uma grande área para plantio e alto consumo de recursos hídricos. A produção de moléculas de alto-valor agregado por meio de microrganismos tem recebido cada vez mais atenção. As microalgas são um dos principais organismos para serem explorados devido à sua capacidade de crescer de maneira autotrófica. Além disso, em comparação com vegetais terrestres, elas ocupariam um menor espaço e não estão sujeitas à sazonalidade, garantindo produção constante o ano todo. A luteína é produzida por diferentes microalgas, sendo *Chlorella sorokiniana* uma espécie capaz de acumular grandes quantidades deste composto, além de possuir rápido crescimento. Isso a torna um potencial alvo para a produção industrial de luteína. Há na literatura muitos estudos visando aumentar a concentração de luteína em *C. sorokiniana* por meio da indução de estresse no cultivo ou até mesmo pela geração de mutações aleatórias em seu genoma. A Manipulação genética e a engenharia metabólica são técnicas que também têm recebido atenção com foco na geração de uma linhagem super-produtora de luteína. Este estudo teve como objetivo buscar na literatura as novas ferramentas de biologia sintética e engenharia metabólica aplicadas em *Chlorella sorokiniana* visando o melhoramento da eficiência do metabolismo de produção de luteína.

palavras-chave: microalga, engenharia genética, biotecnologia, carotenoide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 Luteína	8
1.2 Biossíntese de Luteína	9
1.3 Aplicações da Luteína	11
1.4 Valor Comercial e Mercado Global de Luteína	12
1.5 Atual produção industrial de Luteína	13
1.6 Produção de luteína por microalgas e seus desafios	14
1.7 Comparação entre a produção de luteína por <i>Tagetes</i> e microalgas	17
2 CHLORELLA SOROKINIANA NA PRODUÇÃO DE LUTEÍNA	19
2.1 Estratégias de melhoramento genético aplicadas em microalgas para o aumento na produção de luteína e carotenoides	20
2.1.1 Metabolismo de luteína em <i>Chlorella sorokiniana</i>	24
3 BIOLOGIA SINTÉTICA E ENGENHARIA METABÓLICA EM <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i>	27
3.1 Partes genéticas disponíveis para <i>Chlorella sorokiniana</i>	28
3.2 Ferramentas de edição gênica para <i>Chlorella sorokiniana</i>	32
3.3 Ciências ômicas aplicada em <i>Chlorella sorokiniana</i>	33
4 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

A luteína é uma xantofila pertencente a classes dos carotenoides produzida por organismos fotossintetizantes como plantas, algas e cianobactérias. É amplamente utilizada como corante natural para alimentos e fármacos, além de ser um componente recorrente de suplementos alimentares. Apresenta uma importante atividade antioxidante e, algumas pesquisas recentes indicam o seu potencial uso para manutenção da saúde dos olhos, da prevenção do envelhecimento molecular por idade, no controle de processos inflamatórios, entre outros benefícios a saúde humana (ALVES-RODRIGUES; SHAO, 2004; RICHER et al., 2004; ZHENG et al., 2022).

Os seres humanos apresentam luteína na mácula da retina, sendo adquirida na dieta principalmente por meio de frutas, legumes, vegetais, milho e gemas de ovos (PERRY; RASMUSSEN; JOHNSON, 2009). Segundo a *National Academies of Sciences, Engineering and Medicines*, o consumo diário de referência (DRIs) de luteína que garanta os benefícios para a saúde humana é de 6 mg por dia, um valor muito acima do consumo de um americano adulto, cuja média é de apenas 1-2 mg diariamente (MONSEN 2000; RANARD et al., 2017), mostrando a necessidade da suplementação desse composto na dieta. A luteína cristalizada (FloraGLO®) é considerada como *generally recognized as safe* (GRAS), sendo utilizada como suplemento alimentar em diferentes produtos como barras de cereais, leite de soja, margarina, iogurtes, sucos e frutas processadas, entre outros.

O mercado global de luteína vem crescendo com o decorrer dos anos. Segundo a Energias Market Research, a taxa de crescimento anual composta (CAGR) para luteína será de 5.2% entre 2018 e 2024, atingindo um valor de USD 396,4 milhões de dólares. A produção de luteína é feita majoritariamente a partir da extração de flores do gênero *Tagetes* (ALMEIDA, 1873), conhecidas como calêndula. Para isso, se faz necessário o cultivo das flores para obtenção da biomassa rica em carotenoides, que por sua vez passam por um pré-tratamento para conservação, extração e refinamento da luteína (TSAO et al., 2004).

A produção de luteína a partir de flores traz consigo diversas desvantagens, como o período sazonal de cultivo, área de plantio requerida, alto custo de produção, entre outras características intrínsecas do processo, como por exemplo a

saponificação química necessária para separação da luteína dos ácidos graxos presentes na planta. Por esta razão, existe a demanda por outras fontes alternativas de produção como por exemplo a utilização de microalgas (LIN; LEE; CHANG, 2015).

A produção de luteína a partir de microalgas se mostra como uma alternativa vantajosa, uma vez que pode ser realizada de maneira contínua, em uma menor área, e por meio de diferentes fontes de carbono. Além de ser possível a produção de maneira autotrófica pela fotossíntese. Uma outra vantagem é a diminuição de processos químicos adicionais como a saponificação química, pois a luteína está presente em sua maioria de forma livre e não esterificada nas microalgas. Diversas microalgas se apresentam como ótimas candidatas a serem utilizadas na produção de luteína pelo fato de acumularem uma grande quantidade deste carotenoide (SUN; CHEN; DU, 2016).

Apesar das vantagens, ainda não existe produção industrial de luteína a partir de microalgas, sendo os principais motivos o alto custo de cultivo, a concentração insuficiente do composto, dificuldade no escalonamento, alta demanda energética para extração do produto e a contaminação de biorreatores. Estas limitações precisam ser sanadas para que a produção industrial de luteína por microalgas se torne uma realidade em escala industrial (LIN; LEE; CHANG, 2015).

Diversos estudos foram realizados visando melhorar a produção de luteína pelas microalgas, alguns deles focados na fase *downstream* de sua produção, como melhorias nos métodos de extração e purificação, e outros na fase *upstream*, como na escolha de linhagens super produtoras que suportem as condições necessárias para o escalonamento industrial. Também foram realizados diversos estudos para otimização de parâmetros físico-químicos do meio de cultivo, como também na geração de condições de estresse para o aumento da concentração do carotenoide pela microalga (FU et al., 2014).

Uma outra possível alternativa para melhorar a produção de luteína pelas microalgas seria o desenvolvimento de linhagens geneticamente modificadas visando transformar a linhagem em uma biofábrica de alto rendimento. Com o advento da biotecnologia e a constante diminuição no custo de síntese e sequenciamento de DNA, fez possível a manipulação do material genético de maneira jamais vista antes, permitindo a criação de novas áreas da ciência como a biologia sintética e a engenharia metabólica. Estas tecnologias podem ser utilizadas para otimizar as vias

metabólicas de produção de luteína, viabilizando assim a sua produção industrial (SAINI et al., 2020).

A microalga *Chlorella sorokiniana* (SOROKIN & MYERS, 1953), se mostra como ótima alternativa para produção de luteína devido à sua alta capacidade de acumular carotenoides como também pela sua tolerância a uma variedade de meios de cultivos, apresentar rápido crescimento e grande produção de biomassa (ALCÁNTARA et al., 2015). Entretanto, mesmo possuindo as características necessárias para produção industrial de luteína, a linhagem ainda necessita ser melhorada, a fim de aumentar a concentração final deste carotenoide. Por esta razão, o presente estudo traz uma revisão bibliográfica do estado da arte das tecnologias disponíveis no âmbito da biologia sintética e engenharia metabólica aplicadas na microalga *Chlorella sorokiniana* para o melhoramento genético da via de produção de luteína.

1 LUTEÍNA: CENÁRIO ATUAL

1.1 Luteína

A luteína ((3R,3'R,6'R)- β,ϵ -carotene-3,3'-diol) é um carotenoide de coloração amarela-alaranjada. Sua fórmula molecular é $C_{40}H_{52}O_2$, sendo pertencente à classe das xantofilas por possuir duas hidroxilas nos dois anéis ciclohexanos terminais de sua estrutura, sendo eles na conformação β e ϵ . É um estereoisômero da zeaxantina que diferem pelo padrão das ligações duplas no anel ϵ .

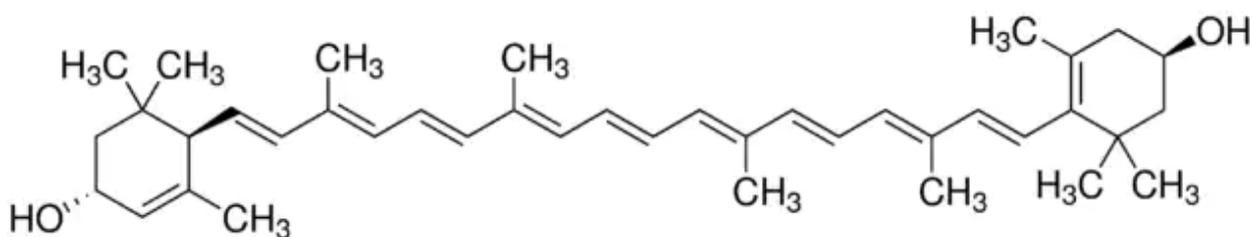


Figura 1 - Estrutura molecular da molécula de luteína

A longa cadeia de carbonos formada por um sistema conjugado de ligações duplas e simples garantem à luteína um poder como antioxidante natural, como também capacidade de absorver o espectro de luz azul entre 400 e 500 nm, sendo seu pico de absorção em 446 nm (ALVES-RODRIGUES; SHAO, 2004). A luteína apresenta também alguns outros isômeros como trans, cis e epoxy luteína que podem ser encontrados em algumas frutas e vegetais (CALVO, 2005). A luteína é produzida por plantas e algas em duas configurações, sendo elas a forma estrutural que atua na captação de luz e na forma de óleos para ser armazenada como lipídeos.

1.2 Biossíntese de Luteína

A luteína pertence à família dos carotenoides, que por sua vez são derivados da via do terpeno. Esta via é responsável pela construção de cadeias carbônicas grandes, produzindo assim uma variedade de metabólitos secundários para o organismo. Os terpenóides são gerados a partir de blocos de 5 carbonos (C5), por meio da via do mevalonato (MVA). Três moléculas de acetil-CoA são complexadas para formar o mevalonato e conseqüentemente o principal bloco C5, a molécula de pirofosfato de isopentenilo (IPP) como representado na Figura 2. O IPP é isomerizado em pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Uma via alternativa também pode ser utilizada para formar os blocos IPP e DMAPP independente do MVA, sendo ela conhecida como a via do 2- C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). A via do MEP acontece nos plastídeos de bactérias fotossintetizantes, cianobactérias e microalgas, formando IPP (figura 2) a partir de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato, sendo ela a via responsável pela formação da maioria dos terpenóides nestes organismos (QUINLAN et al., 2012).

Após a formação dos blocos C5, estas subunidades são complexadas por enzimas por meio de condensação cabeça-cauda para a formação de moléculas maiores, como o geranyl pirofosfato (C10), farnesil pirofosfato (C15) e geranylgeranyl pirofosfato (C20). Estas moléculas são utilizadas como blocos para a formação de compostos com cadeias carbônicas longas. O primeiro carotenoide é chamado de fitoeno (C40), gerado pela condensação de duas moléculas de geranyl pirofosfato (GGPP) pela enzima *phytoene synthase* (PSY). O fitoeno sofre posteriormente uma variedade de modificações a fim de formar todos os outros carotenoides, o que

demonstra a importância deste composto para careto gênese. A enzima PSY é considerada a enzima chave para formação dos carotenoides, como também a enzima com a taxa limitante desta via. Após sua formação, o fitoeno sofre desnaturação para formar o licopeno, que por sua vez sofre ciclização (SAHA; ERMIS; MURRAY, 2020).

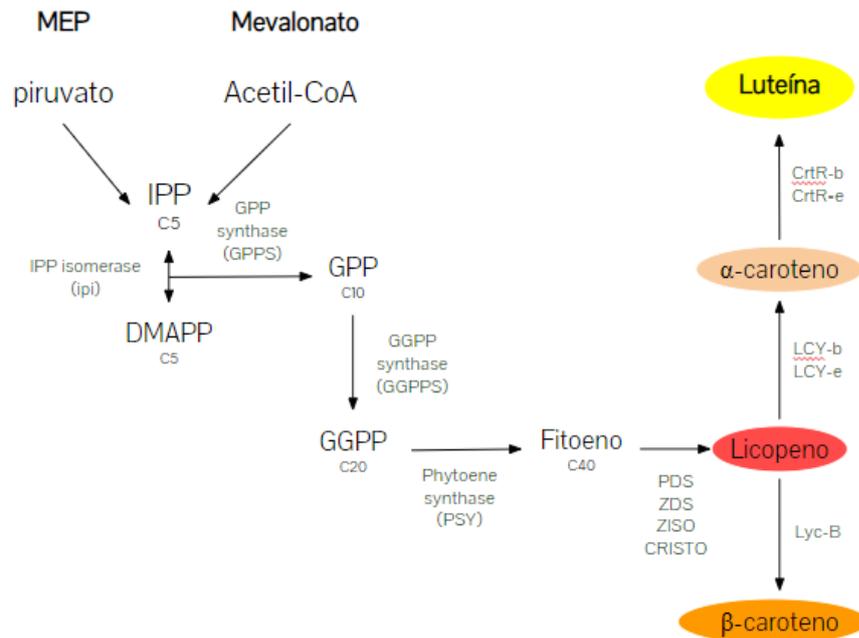


Figura 2 - Via metabólica geral de produção de carotenoides.

Todos os carotenoides possuem ciclo-hexanos terminais em diferentes configurações, possibilitando a formação de uma variedade de moléculas. Existem cerca de 800 carotenos identificados e estão presentes em todos os organismos fotossintetizantes. As enzimas licopeno ciclases são responsáveis pela ciclização do licopeno em diferentes configurações, formando duas famílias de carotenoides: α -caroteno e β -caroteno. Para a formação do β -caroteno é necessário a ciclização na conformação β em ambas as extremidades da molécula, sendo catalisada pela enzima β -cyclase (LCY-b), enquanto para a formação do α -caroteno há necessidade da ciclização de um anel na conformação β e outro ϵ pelas enzimas LCY-b e LYC-e. A luteína é uma xantofila derivada do α -caroteno, possuindo um grupo hidroxila em cada anel. Estas hidroxilas são adicionadas pelas enzimas β - e ϵ -caroteno hidroxilases levando à formação da luteína (SAHA; ERMIS; MURRAY, 2020).

A produção de carotenos pode ser estimulada em condições de estresse, muitas vezes relacionadas à proteção contra espécies reativas de oxigênio (ROS). Os ROS podem ser gerados por alta intensidade luminosa, depleção de nutrientes como também de mudanças bruscas no ambiente. Como os carotenoides possuem uma alta atividade antioxidante, eles protegem a célula dos ROS, como também atuam na absorção da alta incidência de luz (FARALONI; TORZILLO, 2017).

1.3 Aplicações da Luteína

A luteína é atualmente utilizada como corante natural na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos, além de apresentar um grande potencial de aplicação na saúde humana. A presença de luteína e zeaxantina na mácula da retina mostra seu papel na proteção dos olhos e sua atuação como pigmento molecular, absorvendo a luz azul, que por sua vez é um potente causador de danos na retina. O tecido ocular também sofre com uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio geradas pela alta demanda de oxigênio, acabando por danificar lipídeos e fotorreceptores. Como a luteína e a zeaxantina apresentam grande atividade antioxidante, elas acabam atuando como protetores moleculares deste tecido (LANDRUM; BONE, 2001). De fato, o consumo regular de luteína mostrou melhorar a saúde dos olhos e aumentar a capacidade visual. Um estudo realizado por NEURINGER et. al (2004), investigaram os efeitos de uma alimentação livre de luteína em macacos, o que levou à perda da pigmentação molecular nos olhos destes animais. Quando a luteína e a zeaxantina foram introduzidas novamente na dieta, a capacidade visual e pigmentação retornaram. Outros estudos mostram a capacidade da luteína em prevenir os danos causados pela degeneração molecular relacionada à idade (DMRI) (LANDRUM; BONE, 2001).

Os efeitos benéficos da luteína não são restritos apenas à visão, estudos demonstram uma capacidade fotoprotetora na pele, diminuindo os danos causados pela exposição à luz ultravioleta (KRINSKY, 2002). Também há fortes evidências demonstrando sua atuação em processos inflamatórios, prevenção de doenças cardiovasculares, hepáticas e intestinais, como também tem demonstrado diversos efeitos positivos contra câncer e neuro proteção (ARUNKUMAR et al., 2015; KIM et al., 2012; MARES-PERLMAN et al., 2002; VAN HERPEN-BROEKMANS et al., 2004;

WOO et al., 2013). Diversas revisões foram realizadas demonstrando os potenciais usos da luteína para saúde humana. (ALVES-RODRIGUES; SHAO, 2004; KRINSKY, 2002).

A baixa biodisponibilidade e a pequena concentração de luteína nos alimentos consumidos diariamente como frutas, legumes, vegetais, milho e ovos, demonstram a necessidade de utilizar este composto como suplemento ou aditivo alimentar. O processamento dos alimentos também diminui a biodisponibilidade de luteína para absorção, uma vez que a exposição do alimento a variadas faixas de temperatura e pH, podem alterar sua composição química (OCHOA BECERRA et al., 2020).

A luteína cristalizada FloraGLO® produzida e comercializada pela indústria Kemin é amplamente utilizada como aditivo em diversos produtos como barras de cereais, margarina, imitações de leite, sucos de fruta entre outros, sendo aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA, U.S.A.). A quantidade máxima de luteína que pode ser adicionada em um alimento é calculada com base em uma dieta de 20 mg de luteína/dia, para que não cause danos à saúde, mesmo estudos demonstrando que quantidades maiores não apresentaram qualquer efeito negativo (Chemical and Technical Assessment (CTA)", 2016).

1.4 Valor Comercial e Mercado Global de Luteína

Devido às características benéficas da luteína à saúde humana seu valor comercial vem crescendo com o passar dos anos. A estimativa é de que o mercado global de carotenoides atinja cerca de USD \$2,19 bilhões segundo a Reports and Data. A preocupação com a saúde dos olhos também é um fator predominante para o aquecimento do mercado, avaliado em USD \$290 milhões até 2024 pela Global Market Insights, Inc. Segundo a Energias Market Researcher, o mercado global de luteína tende a apresentar uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 5,2% entre 2018 e 2024, atingindo um valor de USD \$396,4 milhões. A luteína representa 23% do total de carotenoides, sendo um dos compostos com maior potencial de crescimento nos próximos anos, de acordo com a BCC Research.

Em um estudo de caso realizado pela The Growth Pipeline 2018, foi demonstrado que a utilização de luteína na dieta diária Européia resultaria em uma

diminuição de € 6,2 bilhões por ano em gastos relacionados à degeneração macular relacionada à idade, uma vez que 1,7 milhões de pessoas apresentam algum dano relacionado a este problema. Isso demonstra a importância na produção eficiente de carotenoides, como a luteína por exemplo. A sua produção resultaria em um impacto econômico relevante, como também evitaria diversas doenças prejudiciais à sociedade. Segundo Maximize Market Research pvt. Ltda., o mercado global de luteína irá atingir USD \$463,16 milhões até 2027, sendo impulsionado principalmente pelo aumento das preocupações com a saúde e estilo de vida. Segundo a Marketsandmarkets (2021), a produção de luteína pode atingir 2121,2 toneladas até 2022.

As principais indústrias presentes no mercado de luteína incluem DSM (Holanda), BASF (Alemanha), Solaray (US), Chr. Hansen (Dinamarca), E.I.D. Parry (Índia), Kemin (EUA) e Zhejiang Medicine (China), DDW The Color House (EUA), Döhler (Alemanha), Lycored (Israel), PIVEG (EUA), Allied Biotech (Taiwan) e FENCHEM (China) (Marketsandmarkets 2021).

1.5 Atual produção industrial de Luteína

A primeira etapa para produção industrial de luteína é o cultivo das flores, sendo uma das etapas de maior custo do processo. A grande área necessária para o plantio, combinado com a sazonalidade da produção das flores mostram-se como fatores limitantes para o aumento da sua produção. O plantio tem início em junho, e as flores são coletadas a cada 15 dias até outubro onde encerra-se a estação. Durante este período os gastos com irrigação, fertilização e mão de obra temporárias também aumentam o custo de produção. A fertilização das plantas *Tagetes* varia em cerca de 200-400 kg de Nitrogênio (N), 150-300 kg de fósforo (P_2O_4) e 200-400 kg de óxido de potássio (K_2O) por hectare. O volume de água utilizado para irrigação pode variar de 5000 m³ a 10000 m³ por hectare dependendo do método utilizado. Esta primeira etapa leva cerca de 200 dias e rende o equivalente a 30 - 60 toneladas de flores por hectare (LIN; LEE; CHANG, 2015). Após a coleta das flores, é necessário a realização do processo de ensilagem para conservação da luteína, como também a retirada da água contida na biomassa para melhoria do processo de extração. Após esta etapa, a

biomassa tem seu volume reduzido utilizando energia mecânica, formando grânulos de calêndula, que são ricos em ésteres de luteína e serão utilizados como matéria prima nas próximas etapas de processamento (LIN; LEE; CHANG, 2015).

Os grânulos de calêndula são convertidos em resina oleosa de luteína por meio da extração utilizando solvente orgânico (hexano). Cerca de 100 g de grânulos geram 10 g de resina oleosa, contendo uma quantidade 15% a 20% de luteína em sua composição. Para obtenção da luteína livre se faz necessário utilizar a reação de saponificação, que utiliza agentes básicos para liberar a cadeia de luteína dos ésteres. Como última etapa, a luteína é concentrada e recristalizada, podendo também ser purificada por cromatografia líquida (VECHPANICH; SHOTIPRUK, 2011).

O processo de produção de luteína a partir das flores de calêndula apresenta diversas desvantagens, entretanto é atualmente a maneira economicamente viável para comercializar este importante carotenoide. A fim de melhorar o processo de produção, novas abordagens estão sendo estudadas para ampliar a comercialização de luteína, como por exemplo a utilização de microalgas.

1.6 Produção de luteína por microalgas e seus desafios

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes, e dentre os diversos Filos, as Chlorophyta têm se destacado na produção de luteína. Em geral, as microalgas chamam a atenção pelo rápido crescimento, como também pela produção de proteínas, ácidos graxos e uma variedade de carotenoides, além da luteína. Devido ao grande acúmulo de carotenos na biomassa de algumas espécies, pesquisas têm demonstrado vantagens na produção industrial destes compostos por estes microrganismos em comparação as plantas terrestres. Atualmente existem processos industriais de produção de carotenoides por microalgas, como a produção de β -caroteno por *Dunaliella salina* e astaxantina por *Haematococcus pluvialis* (LIN; LEE; CHANG, 2015). Como a luteína vem adquirindo um grande valor de mercado, existe um forte interesse em aumentar sua produção utilizando as microalgas.

Várias microalgas apresentam a capacidade de acumular luteína (Quadro 1) e mostram-se como potenciais candidatas para sua produção industrial.

Espécie	Luteína na biomassa seca (mg/g)	Observações	Referências
<i>Dunaliella salina</i>	3,7	Linhagem passou por evolução direcionada a fatores de estresse.	FU et al., 2014
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	5,4	Neste estudo foram testadas diversas condições de cultivo.	SÁNCHEZ et al., 2008
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	4,5	Teste em larga escala em um reator de tubular de 4000 L.	
<i>Chlorella protothecoides</i>	5,4	Cultivo heterotrófico em batelada com alimentação de glicose e limitação de nitrogênio em 30 L.	SHI; JIANG; CHEN, 2002
<i>Muriellopsis</i> sp	4–6	Cultivo em larga escala (100 L) ao ar livre durante 1 ano.	BLANCO et al., 2007
<i>Neosporangiococcus gelatinosum</i>	7,6	Cultivo de 200mL em batelada em laboratório com iluminação contínua	DEL CAMPO et al., 2004; CAMPO et al., 2000
<i>Chlorococcum citrifforme</i>	7,2	Cultivo de 200mL em batelada em laboratório com iluminação contínua	
<i>Chlorella zofingiensis</i>	3,4	Cultivo de 200mL em batelada em laboratório com iluminação contínua	
<i>Chlorella</i> sp. HS3	11,8	autotrófico com CO2 controlado	Hee Sik Kim, 2018
<i>Chlorella vulgaris</i>	2,9	método de extração de luteína com solvente polar.	Roquette Freres et al., 2008
<i>Desmodesmus</i> sp. F51	5,1	fotoautotrófico	XIE et al., 2013
<i>Chlorella sorokiniana</i> (wild type)	3	condição mixotrófica	CORDERO et al., 2011
<i>Chlorella sorokiniana</i> (Mr-16 mutant)	5	condição mixotrófica	
<i>Chlorella sorokiniana</i> (DMR5 and DMR-8)	7	condição mixotrófica	
<i>Scenedesmus</i> sp.	2.0–2.5	autotrófico	YEN et al., 2011
<i>Chlorella sorokiniana</i> FZU60	9,5	Cultivação em 50L escala piloto	MA et al., 2020
<i>Parachlorella</i> sp	11,8	Diferentes fotobiorreator e alta exposição de luz.	HEO et al., 2018

<i>Chlorella sorokiniana</i> MB-1	5,9	condição mixotrófica	CHEN et al., 2017
<i>C. sorokiniana</i> MB-1- M12	7,5	condição mixotrófica	
<i>C. zofingiensis</i>	13,9	mutação aleatória	HUANG et al., 2018

Quadro 1 - Conteúdo de luteína em biomassa seca das principais microalgas estudadas.

Uma vez definida a cepa, há ainda que se definir o biorreator em que esta será cultivada. Os biorreatores podem ser fechados, como os tubulares e de placas verticais, ou também abertos, como as lagoas artificiais ou *raceways*. A escolha do biorreator reflete diretamente na energia utilizada para manter o cultivo dos microrganismos. Segundo LIN *et al.* (2015), a energia necessária para manutenção de uma planta tubular está em torno de 500–3000 W/m³, enquanto para os biorreatores abertos é de apenas 4 W/m³. Esta definição está intimamente associada ao modo de cultivo que se deseja manter a cepa. O cultivo de microalgas pode ser realizado de maneira fotoautotrófica, utilizando a luz solar como fonte de energia seguida da fixação do CO₂, ou de forma mixotrófica, utilizando fontes de carbono, como os açúcares, para o crescimento da microalga, além da energia luminosa.

Quando se realiza um cultivo autotrófico, o acesso à luz solar é um fator crucial para a produção da biomassa, como também dos carotenoides. O biorreator deve garantir que a relação entre o volume de trabalho (Vt) e a iluminação da superfície (S) seja a menor possível. A relação entre (Vt/S) para os biorreatores de placas, tubulares e lagoas artificiais, são de 50, 70 e 200 (L/m²), respectivamente. De modo geral, como apresentam LIN *et al.* (2015), os reatores de placas e tubulares se mostram como os mais eficientes na produção de biomassa pelo cultivo autotrófico.

No cultivo mixotrófico a produção de biomassa é realizada utilizando uma variedade de fontes de carbonos orgânicas. A fonte de carbono utilizada no cultivo é preferencialmente glicose, o que encarece o processo de produção. A restrição imposta pela disponibilização de luz é menor neste modo de cultivo, permitindo o aumento do volume de trabalho e conseqüentemente do acúmulo de biomassa (DE SWAAF; SIJTSMA; PRONK, 2003). Também existe a necessidade de o cultivo ser realizado em ambientes controlados, para que não haja a contaminação por outros microrganismos devido ao açúcar disponível, impossibilitando a utilização de reatores

abertos. Ao final do cultivo se faz necessária a separação da biomassa do meio líquido e posterior ruptura da parede celular para liberação da luteína.

Para separar a biomassa do meio de cultura, utilizam-se métodos de centrifugação, filtração por membrana ou sedimentação por gravidade, como também produtos coagulantes. Após a biomassa ser drenada, ela deve ser concentrada a fim de permitir uma lise celular eficiente por meio de processos mecânicos, como ultrasonicação, moinho de pedras, homogeneização e cavitação hidrodinâmica, ou também por meio de processos enzimáticos, utilizando enzimas que degradam a parede celular. A ruptura da parede celular composta de celulose presente nas microalgas é um processo que requer bastante energia, variando entre 33 e 530 MJ de energia para cada 1 kg de biomassa seca gerada (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2013).

Em última etapa a luteína necessita ser purificada. O método de purificação pode ser realizado da mesma maneira que o utilizado para extração em *Tagetes*, a fim de obter-se a luteína em pó. Entretanto CERÓN et al., (2008) apresentaram uma alternativa para extração de luteína utilizando éter etílico. Em um primeiro momento, a massa algal seca é tratada com uma base (KOH) para facilitar a remoção de pigmentos, após a qual trata-se com éter etílico e re-extração com acetona. Segundo os autores, no final do processo, a luteína é refinada pela remoção de todos os solventes orgânicos e adição de azeite de oliva para produção do óleo de luteína com cerca de 70% de pureza.

1.7 Comparação entre a produção de luteína por *Tagetes* e microalgas

As microalgas apresentam-se como uma alternativa biotecnológica para produção de luteína, pois estes microrganismos crescem mais rapidamente do que as flores de calêndula e sua produção pode ser realizada em menor área de forma contínua durante todo ano atingindo cerca de 5 g de luteína livre por quilo de biomassa seca produzida. A utilização de mão de obra para operação de biorreatores também é reduzida, assim como a quantidade de água utilizada no processo. Mas apesar de todas estas vantagens frente às *Tagetes*, por que ainda não encontramos a produção industrial de luteína pelas microalgas?

De fato, as microalgas apresentam uma maior produtividade comparado às flores de calêndulas. A produção anual estimada no cultivo das flores é de 120 kg de luteína por hectare, enquanto a estimativa para produção de luteína por microalgas é

de 350-750 kg por hectare, o que mostra um rendimento muito maior quando observamos apenas o cultivo isoladamente (LIN; LEE; CHANG, 2015).

Enquanto as calêndulas necessitam de maior área de cultivo, as microalgas demandam mais energia. As microalgas são organismos unicelulares e por esta razão apresentam uma baixa relação de conteúdo sólido, necessitando de maior energia para separação da biomassa do meio de cultivo. Outra grande demanda da energia no processo de produção pelas microalgas é a ruptura da parede celular para acessar a luteína presente no meio intracelular. A parede celular das microalgas apresenta basicamente a mesma composição celulósica que as presentes nas *Tateges*. Entretanto como as microalgas são menores que as células de calêndula, os métodos mecânicos de rompimento da parede celular acabam não sendo eficientes, requerendo assim mais energia. A luteína presente nas microalgas não é esterificada como nas calêndulas, mas estão complexadas com proteínas formando os compartimentos de absorção de luz. Por esta razão, se faz necessário a utilização de uma grande quantidade de solventes orgânicos para sua extração.

Estes são os desafios encontrados para a produção industrial de luteína a partir de microalgas. A grande produção oferecida pelo rápido crescimento das microalgas e baixa área utilizada é descompensada pela alta demanda energética, o que encarece o processo. A instalação do biorreator também acrescenta um custo inicial de produção maior do que o plantio das calêndulas. Por esta razão, estudos têm sido realizados visando otimizar o processo de produção de luteína pelas microalgas.

Comparação	Flores de calêndulas		Microalgas	
	Material	Luteína	Material	Luteína
Tempo (dias)	205		300	
Produção (Toneladas)	6	0,12	70-150	0,3 - 0,75
Luteína (g/kg)		20		5
N (kg/kg)	0,05	2,5	0,0755	15,1
P (kg/kg)	0,016	0,8	0,033	6,6
K (kg/kg)	0,042	2,1	0,012	2,4
água (m³/kg)	1-1,6	50-80	0,19 - 0,77	30-154

Quadro 2 – Comparação das características de produção de luteína a partir *Tagetes* e microalgas. **Fonte:** Quadro retirada e adaptada de LIN; LEE; CHANG, (2015).

BLANCO et al., (2007) realizaram o cultivo da microalga *Muriellopsis* sp. em um fotobiorreator tubular de 55 L visando analisar a produção de biomassa e luteína em diferentes meses. A produtividade chegou a cerca de 180 mg/m²/dia para luteína e 40 g/m²/dia de biomassa seca nos meses de maio e julho. Fernández Sevilla *et al.* (2005) realizou o cultivo da microalga *Scenedesmus almeriensis* em biorreator tubular de *loops* com um volume de 4000 L, atingindo uma produtividade estimada de 280 mg/m²/dia de luteína. Novos estudos realizados em larga escala são necessários para melhorar as condições e tornar viável a produção de luteína por diferentes cepas de microalgas. Como pode-se observar, a produção de luteína a partir de microalgas ainda apresenta diversos desafios para tornar-se realidade. O avanço da biotecnologia e o isolamento de novas cepas são cruciais para o desenvolvimento de um processo de produção economicamente viável.

2 CHLORELLA SOROKINIANA NA PRODUÇÃO DE LUTEÍNA

A microalga *Chlorella sorokiniana* foi isolada em 1953 por Sorokin e chamou bastante atenção por seu crescimento em temperaturas entre 38 e 42°C, caracterizando-se como termotolerante, chegando a suportar temperaturas de até 46.5 °C (SOROKIN & MYERS, 1953). O crescimento ideal desta linhagem acontece de 35 a 40 °C (MA et al., 2020). Pesquisas demonstram que ela também apresenta tolerância a altas concentrações de CO₂, NO e SO₂, além de alta intensidade luminosa (MORITA; WATANABE; SAIKI, 2000). *C. sorokiniana* possui cerca de (2 a 4,5) µm de diâmetro e é capaz de crescer de maneira fotoautotrófica, heterotrófica e mixotrófica. O crescimento de maneira fotoautotrófica atinge um tempo de duplicação de 4 a 6 horas, enquanto os cultivos contendo açúcares apresentam um tempo de duplicação mais elevado (LIZZUL et al., 2018). A linhagem também é capaz de crescer em águas residuais em determinadas condições (RAMANNA et al., 2014). Análise da biomassa seca de *C. sorokiniana* mostra que sua composição é composta de ~40% proteínas, 30–38% carboidratos e 18–22% lipídeos (BELKOURA; BENIDER; DAUTA, 1997). O sequenciamento completo de seu genoma foi disponibilizado no NCBI (Bioproject accession number PRJNA422912), como também trabalhos de transcriptoma

(Bioproject accession number PRJNA218510) (ARRIOLA et al., 2018). Por possuir um alto crescimento e suportar ambientes mais extremos que a maioria das algas verdes, *Chlorella sorokiniana* se mostra como potencial candidata para produção industrial de compostos de alto valor agregado, como por exemplo a luteína.

CORDERO et al., (2011) mostrou que entre as 13 espécies de microalgas estudadas, *C. sorokiniana* apresentou o maior acúmulo de luteína, como também de outros carotenoides. CHEN et al., (2017) constatou a produtividade de 5.67 mg/L/dia de luteína em cultivo semi-batelada de *C. sorokiniana*. COGNIS IP MANAGEMENT GmbH (2012) apresentou um processo de produção de luteína utilizando *C. sorokiniana* com alta produtividade, chegando a 24 mg/L/dia em um fotobiorreator tubular. Nesta outra patente, obteve-se um rendimento de 42 mg/L em um cultivo autotrófico de 5 dias (Fuzhou University, 2016). A presença da *C. sorokiniana* em registro de patentes reforça seu potencial na produção industrial de luteína. Mesmo se mostrando como uma linhagem robusta na produção de luteína, ainda se faz necessário o melhoramento da linhagem para acúmulo deste carotenoide. Neste sentido, a biologia sintética e a engenharia metabólica podem ser ferramentas fundamentais para o melhoramento da *Chlorella sorokiniana* na produção de luteína.

2.1 Estratégias de melhoramento genético aplicadas em microalgas para o aumento na produção de luteína e carotenoides

As microalgas passaram a ser manipuladas geneticamente a partir dos anos 90, quando *Chlamydomonas reinhardtii* foi transformada pela primeira vez com DNA exógeno de levedura (ROCHAIX, et al., 1982). Desde então, novas microalgas foram sendo transformadas pelas mais variadas técnicas. Além disso, muitas microalgas tiveram seu genoma sequenciado, tornando possível a aplicação de técnicas de engenharia metabólica visando aumentar a produção de compostos de interesse industrial, por meio do aumento na produção de biomassa, ou no acúmulo de lipídios, vitaminas e carotenoides. A microalga *Chlorella sorokiniana* foi transformada pela primeira vez por Dawson et al., (1997) por meio de biobalística. Desde então, novas técnicas de manipulação genética foram aplicadas nesta linhagem, como por exemplo a transformação mediada por polietilenoglicol (PEG), onde protoplastos foram gerados por digestão enzimática e os plasmídeos introduzidos por incubação em PEG e dimetilsulfóxido (Hawkins & Nakamura, 1999). Outro método utilizado foi a

transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (GÓMEZ-ESPINOZA et al., 2018; SHARMA et al., 2021). Em um estudo realizado por LIN; NG, (2020), demonstrou-se que a linhagem *C. sorokiniana* também pode ser transformada por meio de eletroporação.

Apesar de existirem poucas demonstrações de manipulação genética em *Chlorella sorokiniana* na literatura, pode-se observar que é possível utilizar diferentes técnicas de transformação para geração de linhagens geneticamente modificadas (quadro 2). Lin et al., 2021 utilizaram um sistema de interferência por CRISPR em *C. sorokiniana* para controlar aleatoriamente a expressão de genes, elevando o acúmulo de proteínas em 60% na biomassa seca. LIN et al., (2020) expressaram com sucesso a *Green Fluorescent Protein* (GFP) a partir da integração aleatória no genoma promovida pelo vetor do pCAMBIA mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. De fato, existem muitas limitações no que se diz respeito a manipulação genética de linhagens não modelos. A maioria das ferramentas disponíveis para manipulação de microalgas foram desenvolvidas para o *Chlamydomonas reinhardtii*, entretanto muitas técnicas já foram utilizadas em microalgas do gênero *Chlorella* e podem ser aplicadas na linhagem de *C. sorokiniana* (YANG et al., 2016). A combinação de técnicas de biologia molecular disponíveis com o genoma completamente sequenciado, torna-se um ambiente fértil para a aplicação da engenharia metabólica nesta microalga. Neste sentido, a via metabólica de produção de carotenoides se torna um alvo interessante para aplicação de técnicas de biologia sintética para o aperfeiçoamento da produção de sua produção.

Técnica	Referência
Biobalística	Dawson et al., 1997
mediada por PEG e DMSO	HAWKINS; NAKAMURA, 1999
Eletroporação	LIN et al., 2020
Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	SHARMA et al., 2021

Quadro 3 - Técnicas de transformação aplicadas em *C. sorokiniana*.

C. reinhardtii é utilizada como microalga modelo pela vasta quantidade de dados presentes na literatura referente ao seu metabolismo. A literatura apresenta diversos exemplos de manipulação genética nesta linhagem a fim de otimizar a

produção de carotenoides. COUSO et al., (2011) expressou a enzima *Phytoene Synthase* (PSY) de *Dunaliella salina* no cloroplasto de *C. reinhardtii* e obtiveram um aumento de até 260% na produção de carotenoides, como β -caroteno e luteína. A PSY é a primeira enzima da via dos carotenoides, como também a etapa limitante desta via e, por esta razão, houve várias tentativas de aumentar a sua expressão em cepas de microalgas. COUSO et al., (2012) expressaram a PSY de *Chlorella zofingiensis* em *C. reinhardtii* e obteve aumento de 2 vezes na produção de luteína. RATHOD et al (2020) expressaram uma enzima bifuncional de levedura vermelha que contém atividades de PSY e LYC e aumentou a produção de luteína em 83% na mesma microalga. MORIKAWA et al., (2018) obtiveram um aumento de cerca de 2 vezes na produção de luteína em *C. reinhardtii* pela expressão da chaperona DNAJ-like, uma proteína conhecida por estar relacionada à regulação positiva da PSY. Estes exemplos demonstram a importância da expressão heteróloga de PSY em cepas de microalgas como uma alternativa ao aumento da produção de carotenoides.

Uma outra estratégia utilizada em *C. reinhardtii* foi a expressão da enzima *Phytoene desaturase* (PDS) endógena contendo uma mutação pontual que aumentou sua atividade de desnaturação, levando a um acúmulo de luteína e outros carotenoides (LIU et al., 2013). Essa mesma estratégia foi realizada em *C. zofingiensis*, onde a mutação pontual na enzima PDS levou ao aumento de 32% na quantidade de carotenoides e 54% de astaxanthin (LIU et al., 2014). Outra mutação pontual na enzima PDS foi realizada em *Haematococcus pluvialis*, acarretando um acúmulo de 26% a mais em astaxantina (STEINBRENNER; SANDMANN, 2006). A enzima PDS selvagem é alvo do herbicida norflurazon, entretanto as mutações pontuais realizadas em todos estes projetos foram capazes de gerar resistência ao herbicida, tornando-o um potencial marcador seletivo (MARTINEZ-FEREZ, et al., 1994). A expressão da enzima PDS no cloroplasto também pode aumentar a concentração de carotenoides, como mostra GALARZA et al., (2018) que realizaram a clonagem da PDS endógena no cloroplasto de *H. pluvialis* acarretando um aumento de 90% na produção de astaxantina.

As microalgas do gênero *Chlorella* produzem uma grande quantidade de carotenoides, por esta razão também foram utilizadas em estratégias de melhoramento genético para aumento da produção de pigmentos. CORDERO et al. (2011) obtiveram um aumento de 2 vezes na concentração de luteína em *C.*

sorokiniana por meio de otimização do meio de cultura e mutações aleatórias. CHEN et al. (2017) obtiveram um aumento de 29% na concentração de luteína e 52% na produtividade em cepas de *C. sorokiniana* mutadas randomicamente. As mutações randômicas utilizadas em ambos os trabalhos foram realizadas com o composto mutagênico 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG). GUARDINI et al., (2021) utilizaram etilmetanosulfonato (EMS) para gerar linhagens mutantes de *Chlorella vulgaris* e conseguiu uma concentração de luteína de 40 mg/L, cerca de 5,4 vezes a mais que a encontrada em linhagens selvagens. Os compostos mutagênicos são bastante úteis na produção de cepas com características variadas, mas necessitam de um método de seleção eficiente que garanta a identificação da cepa mutante. O quadro a seguir sumariza as tentativas de aumento da produção de luteína em microalgas.

Microalga	Estratégia	Efeito	Referência
<i>C. sorokiniana</i>	Mutação aleatória	7.52 mg/g de luteína	SHI et. al, 2002
<i>C. reinhardtii</i>	Expressão de PSY de <i>D. Salina</i>	2.2 vezes mais luteína	COUSO et al., 2011
<i>C. reinhardtii</i>	Expressão de PSY de <i>C. zofingiensis</i>	2.2 vezes mais luteína	CORDERO et al., 2011
<i>C. reinhardtii</i>	Expressão de OS de <i>A. thaliana</i>	1.9 vezes mais luteína	LIU et al., 2014
<i>C. zofingiensis</i>	Aumento da expressão de PDS	32.1% mais luteína	LIU et al., 2015
<i>C. sorokiniana</i>	Mutação aleatória	7.0 mg/g de luteína	CHEN et al., 2017
<i>C. zofingiensis mutant</i>	Disfunção da enzima BKT1	13.81 mg/g de luteína	HUANG et al., 2018
<i>C. reinhardtii</i>	Expressão de LYCe gene de <i>C. vulgaris</i>	2.3 vezes mais luteína	LOU et al., 2021
<i>C. vulgaris</i>	Mutação aleatória	5.4 vezes mais luteína	GUARDINI et al., 2021

Quadro 4 - Estratégias de manipulação genética para produção de luteína em microalgas.

Apesar destas estratégias de engenharia genética terem sido utilizadas em microalgas para o aumento da produção de luteína, ainda existe um longo caminho para que se aplique de forma extensiva a biologia sintética e a engenharia metabólica

nestes organismos, uma vez que poucos estudos e tentativas foram realizadas neste sentido até o momento. A engenharia metabólica é uma área que vem se demonstrando cada vez mais robusta no desenvolvimento de linhagens especializadas na produção de compostos de interesse industrial. Por esta razão, se faz necessário uma maior aplicação de técnicas de engenharia metabólica em linhagens de microalga para a viabilização da produção industrial de diversos compostos, como por exemplo a luteína.

2.1.1 Metabolismo de luteína em *Chlorella sorokiniana*

Para que se aplique as técnicas de engenharia metabólica para o aumento na produção de determinado composto, se faz necessário o entendimento da sua rota de produção, contemplando suas reações e enzimas participantes, como também seus genes reguladores. A via de produção dos carotenoides em *C. sorokiniana* acontece nos plastídios, pela via conhecida como *non-mevalonate pathway* (MEP/DOXP), que produzem os blocos C5 conhecidos como IPP e DMAPP, que se unem para formar o fitoeno (C40). Após a formação da molécula de fitoeno, ele é posteriormente convertida em α -caroteno pela formação de dois anéis (β e ϵ) em cada extremidade da molécula. A molécula de α -caroteno pode seguir duas rotas para produção de luteína. Primeiro pela hidroxilação do anel β para zeinoxantina seguida da hidroxilação do anel ϵ para luteína, ou pela hidroxilação do anel ϵ para α -criptoxantina, seguida pela hidroxilação do anel β para luteína (QUINLAN et al., 2012).

Os estudos de transcriptoma são extremamente úteis para se entender as vias metabólicas da produção de determinado composto pois demonstram quais genes estão ativos e inativos em determinada condição, revelando mecanismos de regulação muitas vezes escondidos. Azaman et al (2020) realizaram um estudo de transcriptoma em *Chlorella sorokiniana* na presença de glicose com intensidade luminosa moderada. Neste trabalho, eles identificaram que este ambiente levou ao aumento na produção de certos carotenoides, como por exemplo a luteína. Os resultados demonstram que a enzima 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase (CMS) ou IspD, que produz uma molécula intermediária a partir de MEP para formação de IPP e DMAPP se mostrou *upregulated*. Outras enzimas como Lycopene epsilon cyclase, e ϵ -ring hydroxylase que são essenciais para formação de α -caroteno também foram reguladas positivamente. Em contrapartida, os

genes responsáveis pela produção de β -caroteno e astaxantina foram regulados negativamente (Azaman, et al., 2020). Estes resultados indicam que a microalga regulou positivamente os genes responsáveis pela produção de luteína nas condições estudadas.

Gene	Enzima	Aumento na expressão	Metabolismo
Dxs	DOXP synthase	5	MEP/DOXP
Dxr	DOXP reductase	2	MEP/DOXP
IspE	4-diphosphogocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	2	MEP/DOXP
crtP	PDS	2	Carotenoide
ctrY	ctrL-b	2	Carotenoide
ZDS	crtQ	2	Carotenoide

Quadro 5 - Genes *upregulated* envolvidos na produção de carotenoides. Fonte: Azaman, et al., 2020

Um outro estudo realizado em *Chlorella* sp. BR2, uma linhagem com genótipo similar a *C. sorokiniana*, identificou um aumento da expressão dos genes pertencentes à via de MEP/DOXP, como também na produção de carotenoides e principalmente de luteína. Neste trabalho, os autores utilizaram um fitormônio que estimulou a produção de carotenoides e analisaram por meio de transcriptoma quais genes foram *upregulated*. Os genes DXS, DXR, IPI pertencentes ao MEP/DOXP e GGPS, PSY, PDS, LCYb e LCYe pertencentes a carotenogênese tiveram sua expressão aumentada, corroborando com a maior concentração de luteína encontrada no estudo (ALSENANI et al., 2019). A busca de genes alvos para manipulação genética é de extrema importância quando se deseja desenvolver uma linhagem especializada na produção de luteína. Os genes envolvidos na formação dos blocos de construção dos carotenoides (IPP e DMAPP) são os primeiros alvos a serem estimulados, uma vez que o aumento na sua disponibilização pode resultar em um maior acúmulo de licopeno e conseqüentemente na quantidade total de carotenoides. MARIAM et al., (2021) demonstraram que a enzima limitante na via do MEP em *Botryococcus braunii* é a DXS1 que converte G3P em DXP. Neste mesmo trabalho, foi indicado que a

enzima *Phytoene Synthase* (PSY) é a etapa limitante na formação de carotenoides. A PSY é regulada positivamente em situações de estresse nas microalgas, resultando em um maior acúmulo de carotenoides (MAO et al., 2018). É também descrito na literatura uma outra enzima limitante da carotenogênese, sendo ela a *phytoene desaturase* (PDS) que converte o fitoeno em Φ -caroteno (LEMOINE; SCHOEFS, 2010). Artigos mostram que o aumento na expressão da PDS pode elevar a concentração de astaxantina em *H. pluvialis* (STEINBRENNER; SANDMANN, 2006). COUSO et al., (2012) demonstraram que a alta intensidade luminosa aumentou a expressão das enzimas PSY e PDS em *C. reinhardtii* e conseqüentemente elevou a concentração de carotenoides. Os genes pertencentes a rota de produção de luteína como LCYb e LCYe, também precisam ser estimulados visando aumentar sua expressão para que se desvie o fluxo para a produção de α -caroteno em vez de β -caroteno. A biossíntese de luteína a partir do α -caroteno é mediada por dois citocromos P450 hidroxilases dependentes. Os genes *cyp97a5* e *cyp97c3* que codificam as hidroxilases são reguladas positivamente em alta intensidade luminosa aumentando consideravelmente a produção de luteína, como foi demonstrado em *C. reinhardtii* (COUSO et al., 2012). A regulação negativa de genes envolvidos no consumo de precursores da produção de carotenoides também é uma estratégia efetiva no desenvolvimento de uma linhagem super-produtora. A regulação negativa da enzima *farnesyl diphosphate farnesyl synthase* (FPPS), que participa na produção de esqualeno, se mostrou efetiva no aumento na produção de carotenoides em *Botryococcus braunii* (MARIAM et al., 2021). Huang et al., (2016) identificaram uma regulação negativa nos genes *Lcye* e *cyp97c*, que suprimiu a via de competição a jusante e, assim, garantindo o fornecimento de precursor (β -caroteno) para a produção de astaxantina. Esta mesma estratégia poderia ser utilizada para diminuir o fluxo de produção do β -caroteno para α -caroteno podendo melhorar a produção de luteína.

Outros estudos de transcriptoma foram realizados utilizando *C. sorokiniana*. CECCHIN et al., (2018) avaliaram a expressão de genes envolvidos em condições mixotróficas e autotróficas, enquanto LI et al., (2016) analisaram a expressão diferencial de genes envolvidos na produção de lipídios. SUN et al (2016) avaliaram a expressão de genes de *C. sorokiniana* envolvidos no acúmulo de lipídeos em exposição a altas taxas de CO₂. Os estudos de transcriptoma são uma fonte

importante de informação a respeito da regulação gênica e podem ser utilizados para se desenvolver estratégias de engenharia metabólica a fim de atuar em genes chaves de determinado metabolismo. Estes estudos conseguem indicar genes para serem manipulados por meio de ferramentas de biologia sintética a fim de alterar a sua expressão. Por exemplo, os genes que estão sendo expressos em determinada condição podem ser alterados propositalmente para serem expressos a qualquer momento visando alterar o perfil metabólico da linhagem para o acúmulo de algum composto de interesse. Para isso, se faz necessário a utilização de técnicas de biologia sintética para uma fina manipulação do metabolismo da microalga.

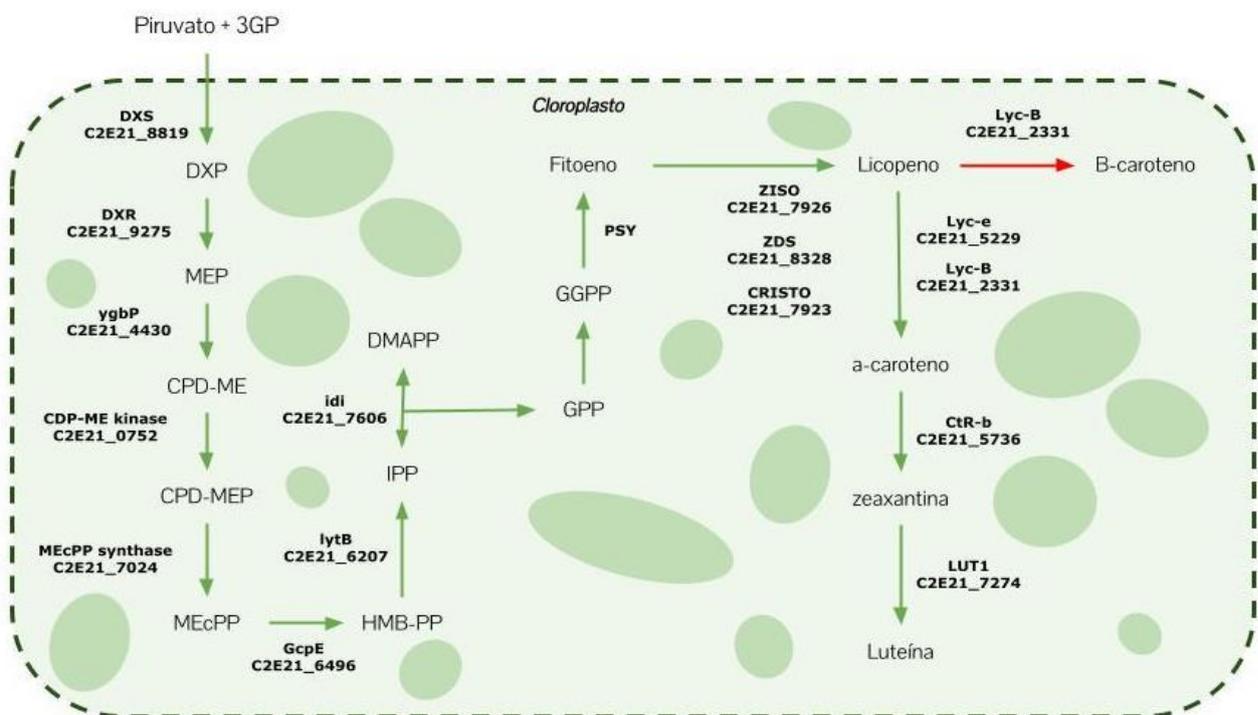


Figura 3 - Rota metabólica de produção de luteína em *Chlorella sorokiniana*. As setas em verde são a favor do fluxo de produção de luteína, enquanto a seta em vermelho indica o desvio do fluxo.

3 BIOLOGIA SINTÉTICA E ENGENHARIA METABÓLICA EM *CHLORELLA SOROKINIANA*

Para construção de uma *Chlorella sorokiniana* especializada na produção de luteína, se faz necessário a utilização de técnicas da biologia sintética e engenharia

metabólica. A engenharia metabólica é o uso da engenharia genética para modificar o metabolismo de um organismo, podendo envolver a otimização de vias bioquímicas existentes ou introduzir componentes de vias com o objetivo de produzir metabólitos específicos de alto rendimento para a indústria. Já a biologia sintética é uma área multidisciplinar que visa redesenhar organismos para fins úteis, projetando-os para que tenham novas habilidades e funções a partir de partes, dispositivos e sistemas biológicos. A utilização destas ferramentas tem impactado a indústria globalmente, movimentando cerca de US\$ 9,5 bilhões em 2021, com a projeção de aumentar para US\$ 33,2 bilhões até 2026, a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 28,4% durante o período de previsão de 2021-2026 segundo a BBC Research.

Estas duas ferramentas combinadas são capazes de alterar o perfil metabólico da linhagem escolhida, direcionando a sua energia para a produção de determinado composto, podendo ser aplicados para solucionar a problemática da produção industrial de luteína a partir de microalgas. Como citado nos tópicos anteriores, existem uma gama de genes a serem manipulados em *C. sorokiniana* visando aumentar a concentração de luteína e poucos exemplos são apresentados na literatura explorando esta estratégia. Ao passar dos anos, diversas ferramentas foram desenvolvidas visando facilitar a manipulação genética de microalgas, como por exemplo o desenvolvimento de técnicas de transformação, novos vetores de expressão, identificação de partes gênicas como promotores e terminadores, aplicação de ciências ômicas e análise de fluxo metabólico em nível genômico (GEMs). A seguir serão abordadas como estas técnicas poderiam ser utilizadas para o desenvolvimento de uma linhagem de *Chlorella sorokiniana* super produtora de luteína.

3.1 Partes genéticas disponíveis para *Chlorella sorokiniana*

Para que seja possível o desenvolvimento de uma linhagem super produtora a partir da engenharia metabólica, se faz necessária a manipulação da informação genética por meio da introdução de moléculas de DNA dentro da linhagem escolhida pelo processo conhecido como *transformação*. No tópico 2.1 foram abordadas as principais técnicas de transformação aplicadas em *C. sorokiniana*, sendo elas: biobalística, PEG, eletroporação e a mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, cada

uma possuindo suas vantagens e desvantagens, mas que possibilitam a introdução de nova informação genética na microalga. É bastante comum a utilização de vetores genéticos quando se deseja modificar uma linhagem, sendo os plasmídeos integrativos o tipo de vetor mais utilizado em microalgas. Um vetor necessita possuir algumas partes para que seja funcional, como por exemplo as regiões promotora e terminadora, o gene de interesse, o método de seleção e o mecanismo de replicação, que no caso dos plasmídeos integrativos é a sua própria inserção dentro do genoma da microalga.

Sharma et al (2021) desenvolveu um método eficiente de transformação de *C. sorokiniana* mediado por *Agrobacterium tumefaciens* que utiliza o vetor pCAMBIA 1301 para inserir aleatoriamente o gene de interesse no genoma nuclear da microalga. Esse vetor possui o promotor constitutivo forte (CaMV 35S) que é funcional para expressar genes em espécies de *Chlorella*.

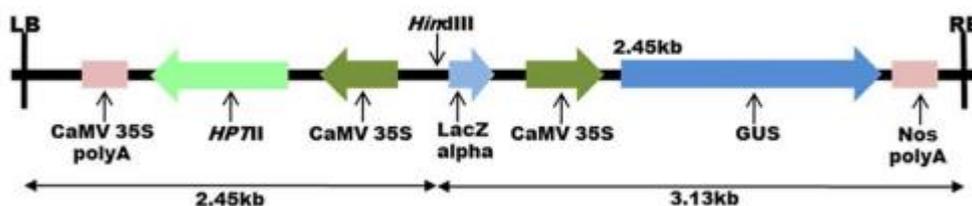


Figura 4 - Região T4 do pCAMBIA1301 inserido em *Chlorella sorokiniana*. O promotor caMV 35S permite a expressão do gene de resistência a higromicina HPTII, como também do gene repórter β -glucuronidase (GUS). **Fonte:** Sharma et al., 2021.

Outros promotores também poderiam ser utilizados para garantir uma alta expressão de genes de interesse, sendo eles o *maize polyubiquitin* (*ubi1*) e *rice actin* (*actin1*) (CHEN et al., 2001). Os *Chlorella virus promoters* também são uma ótima alternativa para obtenção de promotores fortes, como exemplo o promotor de *Methyltransferase*, que já foi utilizado para alta expressão de HGH em *Chlorella sorokiniana* (HAWKINS; NAKAMURA, 1999). O promotor de *alpha-tubulin* de *Chlorella vulgaris* se demonstrou funcional em *Chlorella sorokiniana* expressando proteínas de resistência a antibiótico (FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2020). Os promotores induzíveis também são altamente recomendados quando se deseja controlar a expressão de certos genes e são muito utilizados na engenharia metabólica. O

promotor da *small unit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase* (rbcS) de *C. reinhardtii*, é um forte promotor induzível à luz e foi demonstrado como funcional em *Chlorella* (LIU et al., 2014). O promotor do gene que codifica a *nitrato redutase* (NR) é negativamente regulado pela presença de amônio e induzido pela presença de nitrato, podendo ser utilizado para expressão controlada de genes de interesse ao longo do crescimento celular (Wang et al., 2004). SHIN et al., (2020) desenvolveram em seu trabalho dois promotores sensíveis a deficiência de nitrogênio, os promotores *Chlorella vulgaris N Deficiency Inducible* (CvNDI e CvnDII) que foram usados com sucesso para produzir hG-CSF em *Chlorella* transgênica cultivada em meio sem Nitrogênio. Além destes promotores que se demonstram funcionais em espécies de *Chlorella*, vários outros já foram utilizados e caracterizados em outras espécies de microalgas e poderiam ser testados para expressão de genes em *C. sorokiniana*. KUMAR et al., (2020) resumem os principais promotores utilizados em microalgas no seu trabalho.

Promotor	Descrição	Referência
CamV 35S	promotor constitutivo forte	Sharma et al., 2021
ubi1	promotor polyubiquitin em milho	Chen et al., 2001
actn1	promotor do gene actina em arroz	Chen et al., 2001
<i>Methyltransferase</i>	promotor de vírus de <i>chlorella</i>	Hawkins, et al., 1999
alpha-tubulin promoter	promotor de <i>Chlorella vulgaris</i>	Fernández-Rodríguez et al., 2020
small unit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (rbcS) promoter	forte promotor induzível à luz <i>C. reinhardtii</i>	Liu et al., 2014
Nitrate reductase (NR) promoter	negativamente regulado pela presença de amônia e induzido pela presença de nitrato	WANG et al., 2004
CvNDI e CvnDII	promotores sensíveis a deficiência de nitrogênio	Shin et al., 2020

Quadro 6 – Lista de promotores utilizados em *Chlorella*. **Fonte:** KUMAR et al., 2020.

A utilização de promotores constitutivos fortes pode ser uma alternativa para aumentar a expressão de determinados genes da via metabólica de produção de luteína. Entretanto, é importante notar que os genes podem sofrer regulação pós transcricional ou pós-traducionais e a garantia da super-expressão pode não levar a um aumento da formação de luteína. Apesar disso, como a estratégia de expressão dos genes da via de luteína a partir de promotores constitutivos ou induzíveis ainda não foi explorada, seria interessante analisar os efeitos de diferentes promotores na expressão de genes chaves na formação de carotenoides. Além da região promotora, existem outras partes que podem ser exploradas para o desenvolvimento de circuitos genéticos, como por exemplo a utilização de *enhancers*, que atuam estimulando a expressão dos genes. O *Ômega Enhancer* derivado do vírus do mosaico do tabaco pode aumentar significativamente a expressão gênica em *Chlorella* (CHEN et al., 2001).

Os marcadores de seleção são outra parte fundamental do vetor a ser utilizado, pois a partir dele que as linhagens transformadas serão identificadas dentre as não transformadas. A literatura apresenta uma vasta gama de marcadores seletivos e genes repórteres funcionais em *Chlorella*.

Gene	Descrição	Organismo	Funcional em	Referência
NR	Nitrate reductase (resgate de mutantes deficientes em nitrato redutase)	<i>C. vulgaris</i>	<i>C. sorokiniana</i>	Dawson et al., 1997
PDS	Modified phytoene desaturase (resistência a norflurazon)	<i>C. zofingiensis</i>	<i>C. zofingiensis</i>	Liu et al., 2014
nptII	Neomycin phosphotransferase II (resistência a G418)	<i>E. coli</i>	<i>C. sorokiniana</i>	Hawkins & Nakamura, 1999
ble	Bleomycin resistance protein (resistência a phleomycin e antibióticos relacionados)	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>	<i>C. ellipsoidea</i>	Liu et al., 2014
hpt	Hygromycin B phosphotransferase	<i>E. coli</i>	<i>Chlorella</i> sp. DT	Lin et al., 2013
cat	Chloramphenicol acetyltransferase (chloramphenicol resistance)	<i>E. coli</i>	<i>C. vulgaris</i>	NIU et al., 2011

Quadro 7 - Marcadores de seleção comumente utilizados em microalgas. Quadro adaptada de Yang et al., 2016.

De fato, ainda existe uma gama de partes genéticas a serem exploradas em microalgas, como diferentes terminadores, *internal ribosome entry sites* (IRES) e operadores, etc, sendo que os maiores exemplos de aplicação de biologia sintética são em linhagens de *Chlamydomonas*. Apesar disso, existem exemplos na literatura de desenvolvimento de ferramentas para linhagens de microalgas não modelos, como por exemplo POLINER et al., (2018) realizaram a expressão múltipla de genes do metabolismo de ácido graxos de cadeia longa em *Nannochloropsis oceanica* resultando em um aumento na produção. Com as partes mencionadas neste trabalho já seria possível a perturbação do metabolismo de *C. sorokiniana* a fim de se atingir a alta produção de luteína. PASIN et al., (2017), desenvolveram uma versão melhorada do vetor pCAMBIA para plantas, onde se apresenta como menor, mais estável, de alto espectro de hospedeiro e de fácil manipulação com as técnicas de biologia molecular atuais, podendo ser utilizado na transformação com *Agrobacterium*. Esse vetor ainda não foi utilizado em microalgas, mas sua aplicação poderia facilitar ainda mais o desenvolvimento da engenharia genética em *C. sorokiniana*.

3.2 Ferramentas de edição gênica para *Chlorella sorokiniana*

As ferramentas de edição gênica realizam um papel fundamental quando se deseja modificar o metabolismo natural de um organismo. Com o passar dos anos, as técnicas como *zinc fingers nucleases* (ZFNs), *transcription activator-like effector nucleases* (TALEN) e *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR/Cas9) foram aplicadas em microalgas (DABOUSSI et al., 2014; JIANG et al., 2014; SIZOVA et al., 2013). Dentre estas técnicas, apenas a CRISPR foi testada com sucesso em *C. sorokiniana*. LIN et al., (2021) desenvolveram uma estratégia utilizando CRISPRa/i para perturbar o perfil transcricional global e aumentar a concentração de lipídeos em *C. sorokiniana*. Entretanto, ainda se faz necessário o desenvolvimento de técnicas para *knockout* gênico em *C. sorokiniana* visando eliminar genes que competem com a via de produção de luteína, como por exemplo os genes de produção de β -carotene. KIM et al., (2021) estabeleceram o método de CRISPR/cas9 para *Chlorella vulgaris* e realizou a deleção de dois genes na microalga. Atualmente o tratamento com químicos mutagênicos foi a principal estratégia adotada

para modificação genética em *C. sorokiniana*. Apesar de poderosa para gerar uma diversidade de genótipos, as mutações são aleatórias impedindo mutações pontuais e racionais necessárias para a regulação fina do metabolismo (CHEN, et al., 2017; SHI; JIANG; CHEN, 2002). Também já foi demonstrada a utilização de CRISPR para edição gênica em *P. tricornutum* (NYMARK et al., 2016) e *Chlamydomonas reinhardtii* (SHIN et al., 2016). Entretanto, precisam ser desenvolvidos e testados os protocolos existentes de edição para a linhagem de *C. sorokiniana*. Há uma escassez de trabalhos utilizando as técnicas moleculares disponíveis nesta linhagem, a maioria mostra que os caminhos adotados para o melhoramento da produtividade da microalga estão direcionados para a manipulação do meio de cultivo e fatores ambientais, como o estresse. Adotar e aplicar as estratégias de engenharia metabólica e biologia sintética nestes organismos pode ser a chave para atingir a produção industrial de luteína por *C. sorokiniana*.

3.3 Ciências ômicas aplicada em *Chlorella sorokiniana*

Com o avanço e o barateamento das técnicas de sequenciamento de nova geração, foi possível o sequenciamento de uma diversidade de organismos, incluindo as microalgas. Com o passar dos anos, muitas microalgas tiveram seu genoma sequenciado, assim como trabalhos envolvendo seus respectivos transcriptomas, proteômicas e metabolômicas. As informações genéticas contidas nestes trabalhos podem ser utilizadas para investigar regulação gênica e perfis metabólicos complexos. Existe uma grande quantidade de dados ômicos para microalgas em diferentes condições ambientais, principalmente em situações de estresse, como a falta de nitrogênio ou alta intensidade luminosa. A linhagem de *C. sorokiniana* linhagem 1230 apresenta seu genoma sequenciado (Assembly ASM313072v1) assim como alguns trabalhos de transcriptômica, proteômica e metabolômica em diferentes condições de estresse focados para produção de biocombustíveis. LU et al., (2013) demonstraram por análise de HPLC acoplado ao espectrofotômetro de massa (LS-MS) que a concentração dos inóculos afetaram significativamente o perfil de fosfolípidios da *C. sorokiniana*. A cultura com concentração de inóculo contendo 1×10^6 células por mL apresentou o melhor estado de membrana, fornecendo dados importantes para o cultivo industrial em alta densidade. (MA et al., 2013) também investigaram a partir de proteômica os efeitos da concentração celular do inóculo e a luminosidade em *C.*

sorokiniana, demonstrando que estas duas variáveis influenciam na expressão de proteínas global da microalga, especialmente em proteínas que participam da fotossíntese e do ciclo de Calvin. Mais estudos são necessários a fim de obter-se informações a respeito do metabolismo completo de *C. sorokiniana*, podendo revelar alvos interessantes para desenvolver-se estratégias de engenharia metabólica. Os dados provenientes das ciências ômicas podem ser utilizados no desenvolvimento de modelos metabólicos em *softwares* de *Flux Balance Analysis* (FBA). Entretanto, ainda não foi desenvolvido nem mesmo um modelo metabólico de escala genômica (GEMs) para *Chlorella sorokiniana*.

4 CONCLUSÃO

As estratégias atuais para o desenvolvimento de microalgas super produtoras de luteína se deram em sua maioria por meio da estimulação da produção por estresse das culturas em diferentes meios de cultivo. Diversas microalgas já foram estudadas nos mais variados ambientes, mas ainda a concentração de luteína nestes organismos é insuficiente para o desenvolvimento de um processo economicamente viável. A linhagem de *C. sorokiniana* se mostrou como uma ótima candidata para produção de luteína, uma vez que ela é capaz de acumular uma grande quantidade deste carotenoide, sendo alvo de diversos estudos e estando presente em registros de patentes. Entretanto, apesar da extensa pesquisa, ainda não foi possível o desenvolvimento em escala industrial de produção de luteína a partir de *C. sorokiniana*. Apesar desta linhagem produzir uma quantidade expressiva de luteína em ambientes de estresse, a sua concentração máxima identificada não justifica a substituição do atual processo de produção a partir de calêndulas, sendo necessário o melhoramento da linhagem. Diversas técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para espécies de *Chlorella* e existem protocolos de transformação gênica bem estabelecidos para *C. sorokiniana*, fazendo com que surjam novas oportunidades para a aplicação de uma abordagem mais racional de engenharia metabólica e biologia sintética nas rotas de produção de carotenoides, como também no melhoramento da captura de carbono e crescimento da linhagem. A microalga *C. sorokiniana* também possui seu genoma inteiramente sequenciado, o que viabiliza a

utilização da estratégia de biologia molecular no desenvolvimento de estratégias para o melhoramento da produção de luteína. Não foi encontrado nenhum estudo que manipulou vários genes de *C. sorokiniana* de maneira racional para o aumento na produção de carotenoides ou luteína. Também não foi identificado modelo metabólico de escala genômica ou estudos de FBA para a linhagem. A abordagem de engenharia metabólica e biologia sintética pode ser o caminho para o melhoramento da microalga e viabilizar a produção industrial de luteína. Entretanto, esta abordagem se apresenta em fase embrionária, necessitando de um longo caminho para seu desenvolvimento e aplicação. Por esta razão se faz necessário mais estudos e trabalhos que apliquem estratégias de engenharia metabólica em linhagens de *C. sorokiniana*.

REFERÊNCIAS

- ALCÁNTARA, C. et al. Mixotrophic metabolism of *Chlorella sorokiniana* and algal-bacterial consortia under extended dark-light periods and nutrient starvation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2393–2404, 19 fev. 2015.
- ALMEIDA, J. de. Dicionário de Botânica Brasileira. **Compêndio dos vegetais do Brasil tanto indígenas como aclimatadas**. Rio de Janeiro, 1873, 433p.
- ALSENANI, F. et al. Transcriptome-wide analysis of *Chlorella* reveals auxin-induced carotenogenesis pathway in green microalgae. **Algal Research**, v. 37, p. 320–335, 1 jan. 2019.
- ALVES-RODRIGUES et al. The science behind lutein. **Toxicology Letters**, v. 150, n. 1, p. 57–83, 15 abr. 2004.
- ARRIOLA, M. B. et al. Genome sequences of *Chlorella sorokiniana* UTEX 1602 and *Micractinium conductrix* SAG 241.80: implications to maltose excretion by a green alga. **Plant Journal**, v. 93, n. 3, p. 566–586, 1 fev. 2018.
- ARUNKUMAR, R. et al. Biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol nanocapsules: An efficient carrier for improved solubility, bioavailability, and anticancer property of lutein. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 6, p. 2085–2093, 1 jun. 2015.
- BELKOURA, M. et al. Effects of temperature, light intensity and growth phase on the biochemical composition of *Chlorella sorokiniana* Shihira and Krauss. **Annales de Limnologie**, v. 33, n. 1, p. 3–11, 1997.
- BLANCO, A. M. et al. Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 6, p. 1259–1266, jan. 2007.
- CALVO, M. M. **Lutein: A valuable ingredient of fruit and vegetables**. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 1 out. 2005.
- Carotenoides market to reach USD 2.19 Billion by 2026. Reports and Data.
<<https://www.globenewswire.com/news-release/2019/04/11/1802980/0/en/Carotenoids-Market-To-Reach-USD-2-19-Billion-By-2026-Reports-And-Data.html>> Acesso em: 18 de junho de 2020:
- CECCHIN, M. et al. Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.
- CERÓN, M. C. et al. Recovery of lutein from microalgae biomass: Development of a process for *Scenedesmus almeriensis* biomass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 24, p. 11761–11766, 24 dez. 2008.

- CHEN, et al. Lutein production with wild-type and mutant strains of *Chlorella sorokiniana* MB-1 under mixotrophic growth. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 79, p. 66–73, 1 out. 2017.
- CHEN, Y. et al. Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. **Current Genetics**, v. 39, n. 5–6, p. 365–370, 2001.
- Cognis IP Management GmbH, Albrecht Weiss; Wilhelm Johannsbauer; Bernhard Gutsche; Baldomero F. Cordero; Lucia Martin; Herminia Rodriguez; M. Angeles VargasIrina Obratsova, **US8357510B2**, 01 de dez. 2012.
- CORDERO, B. F. et al. Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. **Marine Drugs**, v. 9, n. 9, p. 1607–1624, 2011.
- COUSO, I. et al. Overexpression of an exogenous phytoene synthase gene in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* leads to an increase in the content of carotenoids. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 1, p. 54–60, jan. 2011.
- COUSO, I. et al. Synthesis of carotenoids and regulation of the carotenoid biosynthesis pathway in response to high light stress in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **European Journal of Phycology**, v. 47, n. 3, p. 223–232, ago. 2012.
- COUSO, Inmaculada et al. Efficient heterologous transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* npq2 mutant with the zeaxanthin epoxidase gene isolated and characterized from *Chlorella zofingiensis*. **Marine Drugs**, v. 10, n. 9, p. 1955-1976, 2012.
- DAWSON, Hana et al. Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. **Current microbiology**, v. 35, n. 6, p. 356-362, 1997.
- DABOUSSI, F. et al. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. **Nature Communications**, v. 5, 29 maio 2014.
- DE SWAAF, M. et al. T. High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 666–672, 20 mar. 2003.
- DEL CAMPO, J. A. et al. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 848–854, jun. 2004.
- FARALONI, C.; TORZILLO, G. Synthesis of Antioxidant Carotenoids in Microalgae in Response to Physiological Stress. Em: **Carotenoids**. InTech, 2017.
- Economic benefits using lutein and zeaxanthin in food supplements in European Union. The Growth Pipeline. <<https://ww2.frost.com/event/calendar/economic-benefits-using-lutein-and-zeaxanthin-food-supplements-european-union/>> Acesso em 18 de Junho de 2020.

- Eye Health Ingredients Market worth over 290 Million by 2024. Global Market Insights, inc. <<https://www.globenewswire.com/news-release/2017/05/18/987651/0/en/Eye-Health-Ingredients-Market-worth-over-290-Million-by-2024-Global-Market-Insights-Inc.html>> Acesso em: 18 de junho de 2020.
- FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, R. et al. Alpha-tubulin promoter from *Chlorella vulgaris* allows genetic transformation of green coccoid microalga. **Revista Tecnología en Marcha**, 28 maio 2020.
- Fernández-Sevilla JM, et al. Novel microalgal species and use thereof for animal and/or human consumption and in the production of carotenoids. **Spanish P200500374**, 18 de fev. 2005
- FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M. et al. Biotechnological production of lutein and its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, mar. 2010.
- FU, W. et al. **Effects of abiotic stressors on lutein production in the green microalga Dunaliella salina**. Disponível em: <<http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/3>>.
- Fuzhou University, et al. A kind of method of the synchronous lutein and carbohydrate production for improving autotrophy microalgae, **China CN106399111B**, 22 de nov. 2016.
- GALARZA, J. I. et al. Over-accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* through chloroplast genetic engineering. **Algal Research**, v. 31, p. 291–297, 1 abr. 2018.
- Global Lutein market to witness a CARG of 5.2 during 2018-2024. Energia Market Researcher, Disponível em: <<https://www.globenewswire.com/news-release/2019/04/25/1809676/0/en/Global-Lutein-market-to-witness-a-CAGR-of-5-2-during-2018-2024.html>>, Acesso em: 15 de junho de 2020.
- GÓMEZ-ESPINOZA, O. et al. Transformación genética de *Chlorella sorokiniana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **Revista Tecnología en Marcha**, v. 31, n. 1, p. 162, 22 mar. 2018.
- GUARDINI, Z. et al. High carotenoid mutants of *Chlorella vulgaris* show enhanced biomass yield under high irradiance. **Plants**, v. 10, n. 5, 1 maio 2021.
- HAWKINS, R. L.; NAKAMURA, M. **Expression of Human Growth Hormone by the Eukaryotic Alga, Chlorella**. Vol. 38 p. 335–341. 25 de jan 1999.
- Hee Sik KIM, Novel microalgae having high productivity for lutein, **KR101128080B1**, 14 fev. 2018.
- HEO, J. et al. Indigenous microalga *Parachlorella* sp. JD-076 as a potential source for lutein production: Optimization of lutein productivity via regulation of light intensity and carbon source. **Algal Research**, v. 33, p. 1–7, 1 jul. 2018.

- HUANG, W. et al. Induced High-Yield Production of Zeaxanthin, Lutein, and β -Carotene by a Mutant of *Chlorella zofingiensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 891–897, 31 jan. 2018.
- JIANG, W. et al. Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 11, p. 1465–1469, 1 nov. 2014.
- KIM, J. et al. Establishment of a genome editing tool using CRISPR-Cas9 in *Chlorella vulgaris* UTEX395. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 1–11, 2 jan. 2021.
- KIM, J. E. et al. Lutein decreases oxidative stress and inflammation in liver and eyes of guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. **Nutrition Research and Practice**, v. 6, n. 2, p. 113–119, abr. 2012.
- KRINSKY, N. I. **Symposium: Can Lutein Protect Against Chronic Disease? Possible Biologic Mechanisms for a Protective Role of Xanthophylls 1**. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article-abstract/132/3/540S/4687236>>.
- KUMAR, G. et al. Bioengineering of Microalgae: Recent Advances, Perspectives, and Regulatory Challenges for Industrial Application. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology S.A.**, , 3 set. 2020.
- LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 28–40, 1 jan. 2001.
- LEE, A. K. et al. Force and energy requirement for microalgal cell disruption: An atomic force microscope evaluation. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 199–206, 2013.
- LEMOINE, Y.; SCHOEFS, B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: A multifunctional response to stress. **Photosynthesis Research**. Kluwer Academic Publishers, , 2010.
- LI, L. et al. De novo transcriptomic analysis of *Chlorella sorokiniana* reveals differential genes expression in photosynthetic carbon fixation and lipid production. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, 26 set. 2016.
- LIN, J. et al. Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, 1 maio 2015.
- LIN, W. et al. Development of CRISPR/Cas9 system in *Chlorella vulgaris* FSP-E to enhance lipid accumulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, 1 fev. 2020.
- LIN, Jia-Yi; LIN, Way-Rong; NG, I.-Son. CRISPRa/i with Adaptive Single Guide Assisted Regulation DNA (ASGARD) mediated control of *Chlorella sorokiniana* to enhance lipid and protein production. **Biotechnology Journal**, p. 2100514, 2021.
- LIU, J. et al. Engineering of an endogenous phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker for *Chlamydomonas reinhardtii* transformation and enhanced biosynthesis of carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5–6, p. 788–795, maio 2013.

- LIU, J. et al. Genetic engineering of the green alga *Chlorella zofingiensis*: A modified norflurazon-resistant phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 5069–5079, 2014.
- LIZZUL, A. M. et al. Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. **Biology**, v. 7, n. 2, 1 jun. 2018.
- LOU, S. et al. Molecular cloning and functional characterization of CvLCYE, a key enzyme in lutein synthesis pathway in *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 55, 1 maio 2021.
- LU, S. et al. Phospholipid Metabolism in an Industry Microalga *Chlorella sorokiniana*: The Impact of Inoculum Sizes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 5 ago. 2013.
- CANTRIL, R. et al. Lutein esters from *Tagetes erecta*, 82nd JECFA - **Chemical and Technical Assessment (CTA) 2016**.
- Lutein Market: Maximize Market Research pvt. Ltda.
<<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/lutein-market-69753879.html>>.
Acesso em 19 de agosto de 2021.
- Lutein Market report. Marketsandmarkets
<<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/lutein-market-69753879.html>>.
Acesso em 19 de agosto de 2021.
- MA, Q. et al. ARTICLE Quantitative Proteomic Profiling Reveals Photosynthesis Responsible for Inoculum Size Dependent Variation in *Chlorella sorokiniana*. **Biotechnol. Bioeng**, v. 110, p. 773–784, 2013.
- MA, R. et al. Two-stage bioprocess for hyper-production of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* FZU60: Effects of temperature, light intensity, and operation strategies. **Algal Research**, v. 52, 1 dez. 2020.
- MARES-PERLMAN, J. A. et al. **Symposium: Can Lutein Protect Against Chronic Disease? The Body of Evidence to Support a Protective Role for Lutein and Zeaxanthin in Delaying Chronic Disease. Overview.** Disponível em:
<<https://academic.oup.com/jn/article-abstract/132/3/518S/4687218>>.
- MAO, Xuemei et al. Differential responses of the green microalga *Chlorella zofingiensis* to the starvation of various nutrients for oil and astaxanthin production. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 791-798, 2018.
- MARIAM, I. et al. Channeling of Carbon Flux Towards Carotenogenesis in *Botryococcus braunii*: A Media Engineering Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 29 jul. 2021.
- MARTINEZFEREZ, Isabel. et al. Mutagenesis of an amino acid responsible in phytoene desaturase from *Synechocystis* for binding of the bleaching herbicide norflurazon. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 48, n. 3, p. 185-190, 1994.

- MONSEN, Elaine R. Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 100, n. 6, p. 637, 2000.
- MORIKAWA, T. et al. Overexpression of DnaJ-Like Chaperone Enhances Carotenoid Synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 1, p. 80–91, 1 jan. 2018.
- MORITA, M. et al. Photosynthetic Productivity of *C. sorokiniana* 203 High Photosynthetic Productivity of Green Microalga *Chlorella sorokiniana*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 1 mar 2000.
- NEURINGER, M. et al. Nutritional manipulation of primate retinas, I: Effects of lutein or zeaxanthin supplements on serum and macular pigment in xanthophyll-free *Rhesus* monkeys. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 45, n. 9, p. 3234–3243, set. 2004.
- NIU, Y. F. et al. A new inducible expression system in a transformed green alga, *Chlorella vulgaris*. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3427–3434, 21 out. 2011.
- NYMARK, M. et al. A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. **Scientific Reports**, v. 6, 25 abr. 2016.
- OCHOA BECERRA, M. et al. **Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability**. **Journal of Functional Foods** Elsevier Ltd, 1 mar. 2020.
- PASIN, F. et al. Multiple T-DNA Delivery to Plants Using Novel Mini Binary Vectors with Compatible Replication Origins. **ACS Synthetic Biology**, v. 6, n. 10, p. 1962–1968, 20 out. 2017.
- PERRY, A. et al. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 1, p. 9–15, fev. 2009.
- POLINER, E. et al. A toolkit for *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 enables gene stacking and genetic engineering of the eicosapentaenoic acid pathway for enhanced long-chain polyunsaturated fatty acid production. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 1, p. 298–309, 1 jan. 2018.
- QUINLAN, R. F. et al. Synergistic interactions between carotene ring hydroxylases drive lutein formation in plant carotenoid biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 160, n. 1, p. 204–214, 2012.
- RAMANNA, L. et al. The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 127–135, 2014.
- RANARD, K. M. et al. Dietary guidance for lutein: consideration for intake recommendations is scientifically supported. **European Journal of Nutrition**, v. 56, p. 37–42, 1 dez. 2017.

- RATHOD, J. P. et al. Metabolic Engineering of *Chlamydomonas reinhardtii* for Enhanced β -Carotene and Lutein Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 4, p. 1457–1469, 1 abr. 2020.
- RICHER, S. et al. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: The Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). **Optometry**, v. 75, n. 4, p. 216–229, 2004.
- ROCHAIX, J.-D.; VAN DILLEWIJN, Jeannette. Transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with yeast DNA. **Nature**, v. 296, n. 5852, p. 70-72, 1982.
- Roquette Freres SA. Philippe Looten et al., Method for preparing a composition rich in lutein produced by microalgae. **US 20150225322A1**, 2012 ago. 2008.
- SAHA, S. K.; ERMIS, H.; MURRAY, P. Marine microalgae for potential lutein production. **Applied Sciences (Switzerland)** MDPI AG, 1 set. 2020.
- SAINI, D. K. et al. Enhancing production of microalgal biopigments through metabolic and genetic engineering. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** Taylor and Francis Inc., , 4 fev. 2020.
- SÁNCHEZ, J. F. et al. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 398–405, abr. 2008.
- SHARMA, P. K. et al. Efficient Agrobacterium tumefaciens-mediated stable genetic transformation of green microalgae, *Chlorella sorokiniana*. **3 Biotech**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2021.
- SHI, X. M. et al. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 4, p. 723–727, 2002.
- SHIN, J. H. et al. The establishment of new protein expression system using N starvation inducible promoters in *Chlorella*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.
- SHIN, S. E. et al. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Scientific Reports**, v. 6, 13 jun. 2016.
- SIZOVA, I. et al. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. **Plant Journal**, v. 73, n. 5, p. 873–882, mar. 2013.
- SOROKIN, Constantine; MYERS, Jack. A high-temperature strain of *Chlorella*. **Science**, v. 117, n. 3039, p. 330-331, 1953.
- STEINBRENNER, J.; SANDMANN, G. Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7477–7484, dez. 2006.

- SUN, Z. et al. Elevated CO₂ improves lipid accumulation by increasing carbon metabolism in *Chlorella sorokiniana*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 557–566, 1 fev. 2016.
- Synthetic Biology: Global Markets, BBC Research,
<<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/synthetic-biology-global-markets.html#:~:text=The%20global%20market%20for%20synthetic,forecast%20period%20of%202021%2D2026> > Acessado em 22 de Março de 2022.
- TSAO, R. et al. Separation of geometric isomers of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, n. 1–2, p. 65–70, 6 ago. 2004.
- VAN HERPEN-BROEKMANS, W. M. R. et al. **Serum carotenoids and vitamins in relation to markers of endothelial function and inflammation**. 7 abr 2004.
- VECHPANICH, J.; SHOTIPRUK, A. Recovery of free lutein from *tagetes erecta*: Determination of suitable saponification and crystallization conditions. **Separation Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 265–271, jan. 2011.
- WANG, P. et al. Rapid isolation and functional analysis of promoter sequences of the nitrate reductase gene from *Chlorella ellipsoidea*. **Journal of Applied Phycology**. 11–16, 29 ago 2004.
- WOO, T. T. Y. et al. Neuroprotective effects of lutein in a rat model of retinal detachment. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 251, n. 1, p. 41–51, jan. 2013.
- XIE, Y. et al. Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. for lutein production: Effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 435–444, 2013.
- YANG, B. et al. *Chlorella* species as hosts for genetic engineering and expression of heterologous proteins: Progress, challenge and perspective. **Biotechnology Journal**, Wiley-VCH Verlag, , 1 out. 2016.
- YEN, H. et al. The comparison of lutein production by *scenedesmus* sp. in the autotrophic and the mixotrophic cultivation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 353–361, jun. 2011.
- ZHENG, H. et al. Recent advances in lutein production from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 153, 1 jan. 2022.