

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy.

ELUCIDATING FATTY ACID BIOSYNTHESIS AND METABOLITE PROFILING OF *MESSASTRUM GRACILE* STRAIN SE-MC4 UNDER DIFFERENT CULTURE CONDITIONS

ANNE MARIE KABEN

2023

Main Supervisor: Associate Professor Cha Thye San, Ph.D

Co-supervisors: Professor Aziz Bin Ahmad, Ph.D

School/ Institute: Institute of Climate Adaptation and Marine Biotechnology

Many microalgae species accumulate substantial amounts of oil under environmental stresses, presumably by channeling the photosynthesis product originally allocated to support cell division and growth to the production of the energy-rich storing molecules such as the triacylglycerol (TAG). Nitrogen and phosphorus limitation; and sodium bicarbonate supplementation in culture medium are always associated with high oil production and influences the fatty acid composition of microalgae. *M. gracile* SE-MC4 is a non-model microalgae species native to Setiu Wetland with high oil production capability but still lacking in gene discovery and stress response cultivation studies. Therefore, this study aimed to elucidate the fatty acid biosynthesis pathway with the focus on regulatory mechanism of desaturase genes under nitrate- and phosphate-deficient and excess culture conditions. In addition, a metabolite profiling was also conducted on the species under salinity stress to uncover the metabolic responses towards mitigating salinity fluctuation during cultivation. The results confirmed that *M. gracile* SE-MC4 was in fact an oleaginous strain which was capable of producing between 25.36 to 47.50 % (% of dry weight basis) oil content under the studied culture conditions. Both nitrate- and phosphate-deficient culture conditions were found to induce accumulation of total oil content in the strain. The species showed tolerance towards a wide range of nitrate and phosphate concentrations concomitant with a high production of the saturated palmitic (C16:0) and monounsaturated oleic (C18:1) acids.

Both fatty acids altogether contributed between 81-87% of total oil content. However, the polyunsaturated fatty acids (PUFAs), in particular the linoleic (C18:2) and α -linolenic (C18:3) acids content were relatively low at between 1.87-10.92%. Interestingly, nitrate- and phosphate-deficient culture condition up-regulated the expression levels of desaturase genes, for example, *stearoyl-ACP desaturase (SAD)*, *omega-6 desaturase (ω -6 D)* and *omega-3 desaturase (ω -3 D)* which involve in the biosynthesis of monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids. The increased accumulation of PUFAs was at the expense of saturated fatty acids (SFAs), in particular the C16:0 content. On the other hand, metabolite profiling under salinity stress revealed that the *M. gracile* SE-MC4 was dominated by sugars and lipids. This suggests that the strain can adapt and maintain the composition of both metabolites under immediate and adapted salinity stresses from 2ppt to 8ppt. In conclusion, the high C16:0 and C18:1 concomitant with low PUFAs content favored the biodiesel properties of the oil produced by *M. gracile* SE-MC4. Whilst the presence of both sugars and lipids as dominant metabolites under normal and stressed culture conditions further suggests the potential of the strain as a consistent biodiesel feedstock. Additionally, the elucidated fatty acid biosynthesis pathway in particular the regulatory mechanisms of desaturase genes could pave the way for future genetic modification of the strain towards enhancement of PUFAs production for pharmaceutical, nutraceutical and other biotechnological applications.

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia Terengganu sebagai memenuhi keperluan untuk Ijazah Doktor Falsafah

**MENJELASKAN BIOSISTESIS ASID LEMAK DAN PEMPROFILAN
METABOLIT DALAM *MESSASTRUM GRACILIS* (STRAIN SE.MC4) DI
BAWAH KEADAAN KULTUR YANG BERBEZA**

ANNE MARIE KABEN

2023

Penyelia utama : Profesor Madya Cha Thye San, Ph.D

Penyelia bersama : Profesor Aziz Bin Ahmad, Ph.D

Pusat Pengajian/Institut : Institut Adaptasi Iklim dan Bioteknologi Marin

Terdapat banyak spesis mikroalga yang berupaya menghasilkan minyak yang banyak apabila terdedah kepada tekanan-tekanan persekitaran, dengan andaian bahawa ia mampu menyalurkan produk-produk hasil fotosintesis yang pada asalnya berfungsi untuk digunakan dalam pembahagian dan pertumbuhan sel kepada molekul-molekul yang kaya tenaga seperti triasilgliserol (TAG). Pengehadan nitrogen dan fosforus; dan penambahan natrium bikarbonat ke dalam media pengkulturan biasanya dikaitkan dengan penghasilan minyak yang lebih tinggi dan mempengaruhi komposisi asid lemak dalam mikroalga. *Messastrum gracile* strain SE-MC4 adalah spesis mikroalga bukan-model berasal dari Tanah Bencah Setiu berupaya menghasilkan minyak yang banyak tetapi masih kurang kajian dilakukan untuk penemuan gen dan respon terhadap tekanan-tekanan. Oleh yang demikian, kajian ini bertujuan untuk menjelaskan tapak jalan asid lemak dengan menumpu kepada mekanisma pengawalaturan gen-gen desaturase pada persekitaran pengkulturan kekurangan- dan berlebihan-nitrat dan -fosfat. Sebagai tambahan, pemprofilan metabolit juga telah dijalankan di bawah tekanan kemasinan untuk memperjelaskan tindak balas spesis tersebut ke arah mitigasi kesan naik-turun kemasinan semasa pengkulturan. Keputusan kajian mengesahkan bahawa *M. gracile* SE-MC4 sebenarnya adalah strain kaya minyak yang berupaya menghasilkan jumlah kandungan minyak di antara 25.36 ke 47.50% (% dari berat kering) dalam keadaan kultur yang dikaji. Kedua-dua persekitaran kultur kekurangan-nitrat dan -fosfat didapati

merangsang peningkatan pengumpulan minyak dalam strain tersebut. Spesies ini menunjukkan toleransi kepada pelbagai kepekatan nitrat dan fosfat seiring dengan penghasilan asid lemak tepu (SFA) palmitik (C16:0) dan monotaktepu (MUFA) oleik (C18:1) yang tinggi. Kedua-dua asid lemak ini secara keseluruhan menyumbang di antara 80 ke 87% daripada jumlah kandungan minyak. Walau bagaimanapun, tahap asid lemak politatepu (PUFA), khususnya linoleik (C18:2n6) and α -linolenik (C18:3n3) adalah rendah pada 1.87 ke 10.92%. Menariknya, persekitaran pengkulturan kurang nitrat dan fosfat telah meningkatkan pengawalaturan pengekspresan gen-gen penyahtepu seperti *Streoyl-ACP desaturase (SAD)*, *omega-6 desaturase (ω -6 D)* and *omega-3 desaturase (ω -3 D)* yang terlibat dalam biosintesis asid lemak monotaktepu (MUFA) dan politatepu (PUFA). Peningkatan pengumpulan PUFA adalah hasil daripada kesan pengurangan kandungan asid lemak tepu (SFA), khususnya C16:0. Di samping itu, pemprofilan metabolit di bawah tekanan kemasinan telah mendedahkan bahawa metabolit di dalam mikroalga ini sebahagian besar adalah terdiri daripada gula dan lipid. Ini mencadangkan bahawa strain ini berupaya untuk menyesuaikan diri dan mengekalkan kandungan kedua-dua metabolit ini di bawah keadaan tekanan kemasinan yang setra-merta secara adaptasi dari 2ppt ke 8ppt. Kesimpulannya, kandungan C16:0 dan C18:1 yang tinggi seiring dengan kandungan PUFA yang rendah menggalakkan sifat biodiesel dalam minyak yang dihasilkan *M. gracile* strain SE-MC4. Kehadiran gula dan lipid sebagai metabolit dominan di bawah persekitaran kultur yang biasa dan tekanan mencadangkan potensi strain ini sebagai sumber bahan suapan biodiesel yang konsisten. Sebagai tambahan, pencerahan tapak jalan biosintesis asid lemak khususnya mekanisme pengawalaturan gen-gen penyahtepu dapat membuka jalan kepada modifikasi genetik strain ini ke arah peningkatan penghasilan PUFA untuk farmaseutikal, nutraseutikal and aplikasi bioteknologi yang lain.