

Universidad de Huelva

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales



Aislamiento, caracterización y manipulación genética de microalgas marinas para la producción de compuestos de alto valor añadido

**Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:**

Marta de la Vega Naranjo

Fecha de lectura: 23 de julio de 2014

Bajo la dirección de la doctora:

Rosa M^a León Bañares

Huelva, 2014





**Aislamiento, caracterización
y manipulación genética de
microalgas marinas para la
producción de compuestos de
alto valor añadido**

Tesis Doctoral

Marta de la Vega Naranjo

Huelva, 2014



**Universidad
de Huelva**

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Dpto. de Química y Ciencia de los Materiales

“Profesor José Carlos Vilchez Martín”

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y
MANIPULACIÓN GENÉTICA DE MICROALGAS
MARINAS PARA LA PRODUCCIÓN DE
COMPUESTOS DE ALTO VALOR AÑADIDO
Programa de Doctorado: Ciencia y Tecnología Química**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en
Bioquímica con Mención Internacional por la Licenciada

MARTA DE LA VEGA NARANJO

Directora:

Dra. Rosa M^a León Bañares

Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular

Huelva, 2014

A mi abuelo Juan, porque siempre creyó en mi...

Nunca dejes que nadie te diga que no puedes hacer algo. Si tienes un sueño tienes que protegerlo. Las personas que no son capaces de hacer algo te dirán que tú tampoco puedes. Si quieres algo ve a por ello y punto

“En busca de la felicidad”

Agradecimientos



Compañeros que ya habían defendido su tesis me lo decían...escribir los agradecimientos es de las partes más complicadas que tiene este proceso. Y es tan difícil porque tienes que resumir en un par de páginas las vivencias de estos años de locura, pero no solo de estos, sino también de aquellos más lejanos que formaron el camino para que hoy esté aquí. Este trayecto ha sido especial, porque he aprendido muchísimo de mucha gente, he vivido momentos espectaculares, pero también he sufrido (y mucho) en otras situaciones que considero no son menos importantes porque también han contribuido en mi crecimiento tanto personal como profesional.

En primer lugar quisiera empezar agradeciendo a la Universidad de Huelva por la financiación de parte de esta Tesis Doctoral; por desgracia me ha tocado vivir un momento económicamente difícil, pero lo hemos conseguido.

Este trabajo no hubiese sido posible sin ti. Mi directora de tesis, o como yo la llamo, mi mamá académica, **Rosa**. Has sido un ejemplo siempre, me has enseñado casi todo lo que se de este mundo, me has guiado, me has animado cuando el camino se ponía difícil, me has dado el toque de atención cuando me veías disiparme. No tendré palabras para agradecerte todo lo que has hecho, sobre todo en el campo de lo personal y lo emocional. Desde el primer día que empecé a trabajar contigo fuiste más que una directora de tesis, fuiste una amiga. Gracias mil veces. En este mismo sentido tengo que agradecer a mi papá académico, **Javi**, que aunque no eres codirector de mi tesis, has hecho las funciones de tal. Siempre ayudando y siempre dispuesto. Eres un ángel de persona y tu sola presencia da alegría y bienestar. Gracias otras mil veces a ti. Por este orden, quisiera también agradecer fuertemente a los otros padres del área, **Carlos** e **Inés**, ya que, aunque no trabajemos en la misma línea, habéis sido unos grandes compañeros, siempre dispuestos a echarme una mano o simplemente para tener una charla de desahogo. Muchas gracias de corazón.

Han sido muchos “becarios” a los que he tenido el placer de conocer en estos años de doctorado, procedentes de muy diferentes áreas. No quiero dejarme a ninguno atrás, por lo que voy a hacer un breve recorrido por cada parte de esta facultad. Voy a empezar por mi propio laboratorio, con las niñas de Bioquímica. A **Marta Vila**, **María Cuaresma**, **Encarni**, **Mari Carmen Romero**, **Eli**, **Mayca** y **María José**, gracias por vuestra compañía en la tediosa labor experimental, y por aguantar mis momentos malos y buenos, habéis sido grandes compañeras tanto dentro como fuera de este laboratorio. Quiero hacer una especial alusión a “las niñas de la sala de becarios”, **María**

Vázquez, Isa y **Marikuki**, por todas esas risas, lágrimas, bailes, pantalones rotos y demás momentazos que hemos vivido en estos últimos meses de escritura de tesis. Nunca había estado tan unidas a vosotras, y os tengo que agradecer mucho el apoyo moral que mutuamente nos hemos dado.

Bajando las escaleras encuentro a mis grandes apoyos aquí en la facultad, a los “analíticos” **Vero, Peli, Macarena** y **Migue**, gracias un millón de veces por todo, por esos desayunos y almuerzos, cafés de funcionarios, risas...por todo, porque habéis sido una tabla de salvación en momentos realmente duros para mí. Sois maravillosas personas con grandes corazones y con vosotros siempre he sentido una calma y una tranquilidad que poca gente aquí me ha dado. Y no me he olvidado de ti **José Manuel**, porque te dije que te tenía reservadas unas palabras personales, pero solo puedo decirte gracias con letras mayúsculas porque sin ti parte de esta trabajo hubiera sido imposible de realizar. Un huequito especial te quiero conceder a ti, **Mercedes**. Ahora estas lejos, pero siempre tan cercana. A ti tengo que agradecerte tanto...porque sin ti hubiera estallado muuuuuchas veces y sin embargo, hablar contigo me ha salvado de cometer muchos errores. Gracias por demostrarme lo grande que eres y sobre todo por ser mi amiga y tener un momento siempre para mí (aunque sea por Skype).

Pero al igual que cuando he necesitado desahogarme he bajado al área de analítica, cuando he querido reírme he subido al área de ecología, porque en un rinconcito allí escondido se encuentra la fuente de la felicidad, mis “Ecolokos”. Gracias **Alberto Vélez, Alberto Waka, Andrés** y **Adrian**, ese gran Equipo A, porque siempre conseguís hacerme un poquito más feliz. Sois un ejemplo de humanidad pero a la vez de locura. Gracias por tan grandes momentos vividos juntos, y espero que sigan siendo muchos más.

No me quiero olvidar de los “inorgánicos” **Lourdes, Manoli, Ana I, M^a Ángeles, Juan Urbano, Auxi**, porque aunque ya no sois nuestros vecinos, siempre habéis estado dispuestos a echar una mano cuando os la he solicitado; muchas gracias. Tampoco quiero dejar atrás a otras profesoras del departamento que siempre han estado ahí para darme un buen consejo, **Ana Sayago y M^a Ángeles “Reca”**, gracias. Al grupo del profesor **Uwe Pischel** por permitirme y enseñarme a trabajar con el espectrofluorímetro, un paso importante para que esta tesis llegara a su fin.

Y cruzando el “Campus del Carmen” dar las gracias a todas las personas con la que he tenido el gusto de compartir estos últimos

meses, los **“chicos de educación”**, tanto profesores, compañeros de máster o mis otros becarios. Gracias por darme otra visión del mundo y por permitirme un cambio de aires que tanta falta me hacía.

I would also like to thank **Dr. Saul Purton** for giving me the opportunity to be part of his research group during 3 months. **Steffie, Laura, Tom, Sofie, Henry, Chloe, Rosie, Joanna, Janet** and **Priscilla**, thank you for all the special moments. It was a great experience that made me learn a lot. Thank you very much because I made great friends. Quiero hacer extensivo este agradecimiento a mi compañero de fatigas en Londres, **Tacho**, sin ti no hubiera sido lo mismo.

Gracias a mi familia sanjuanera por ser precisamente eso, mi familia. A **Penélope** y **Kuman**, **Juani** y **Toscano**, **Inma** y **Juanito**, **María** y **Antonio**, **Mariló** y **Ale**, **Chicho** y **Jessi**, **Pedro** y **Reyes**, **Vane** y **Dani**, **Manolo**, **Juanete**, **Víctor**, **Diegu**, **Flores** y **Macarena**, que desde que desembarqué en este maravilloso lugar me habéis hecho sentir como en casa. Gracias también a los más pequeños, **Eneko**, **Alejandra**, **Marcos** y **Sofía**, porque aunque ellos aún no lo saben, me han hecho mucho bien. Y por supuesto a mi **Pepe**, que aunque a veces lo mataría, lo quiero con locura.

Como dije al principio, este camino viene de lejos, y en sus inicios estaban ellos, mis compis de Sevilla, mis biólogos incansables. **Rapul**, **Luichy**, **Marta**, **Ana**, **Chana**, **Helia**, **Carmen**, **Adela**, **Bruno**, **Pablo**, **Enrique**, **Guille**, siempre ha sido un honor compartir cualquier momento con vosotros, sois gente autentica y amigos para siempre. Sin olvidar a mis “chicos del café”, **Rocío**, **Machan**, **Paloma** y **Dani**, gracias por tantos momentos de tertulia. Y a **David**, mi bioquímico favorito, porque eres una bellísima persona por dentro y por fuera. Gracias a todos por vuestra amistad.

Pero sin duda alguna, una parte muy importante de esta tesis se la tengo que dedicar a dos personas especiales, las cuales han conseguido mantenerme cuerda en este proceso (o quizá me han vuelto más loca...no lo sé). A **Patri**, porque llegaste a mi vida en uno de los momentos más complicados que he tenido y fuiste tabla de salvación y amiga para siempre; por muy lejos que estés siempre estarás muy cerca. Y a **Lily**, mi hermana, por ser mi psicóloga particular, mi amiga indiscutible, la persona que mejor me conoce y mi compañera de “muchas cosas”. Te quiero con locura y lo sabes.

Pero como para cualquier persona, la familia es lo más importante, por ello quiero agradecer a mi familia ecijana, los que son

de sangre y los que no lo son, por ser los actores de la película de mi vida. A mis tíos, primos y amigos, gracias. Una mención especial a mi prima **Beatriz** por tanta ayuda con esta tesis, por ser mi traductora y correctora, y por hacer un esfuerzo tan grande sin corresponderte.

A mi abuela **Carmela** por ser una de las personas más importantes en mi vida, ejemplo de vitalidad y valentía, porque eres la mejor del mundo y nunca podré agradecerte todo lo que siempre has hecho por mí; te quiero, vieja.

A mi hermano **Salvi**, compañero, amigo, hermano. Porque en los malos momentos sé donde tengo que acudir. Como bien dijiste, soy la versión femenina de ti y eso lo dice todo. Y GRACIAS a ti y a mi cuñada y amiga **Mariló**, porque me habéis dado el mejor regalo que se le puede hacer a un hermano, **LOLA**.

Papá y Mamá, no sé cómo empezar a agradecerlos, es tan difícil. Habéis sido y seréis mi ejemplo siempre, por ser grandes luchadores, grandes trabajadores y bellísimas personas, por vuestra humildad como valor principal en vuestras vidas, por ser una pareja que se quiere siempre y enseñarnoslo a nosotros, pero sobre todo porque habéis sido padres intachables que nos habéis enseñado a tener unos grandes principios, a valorar lo que tenemos, a cuidar de los demás, a no desear el mal a nadie y a luchar por lo que queremos. Gracias infinitas por todo, porque sin vosotros nunca hubiera llegado hasta aquí. Gracias por permitirme ser quien quería ser y por ser el apoyo y la guía a la vez.

Ni en una vida ni haciendo 1000 tesis doctorales podría agradecerte todo lo que te mereces, **Juan**. Gracias por ser el mejor compañero que una persona puede tener, el amigo que cualquiera puede desear y el marido que toda mujer anhela. Tú has permitido que pudiera llegar hasta aquí, porque sin tu apoyo esta tesis no sería lo que es. Gracias por comprender que el mundo en el que me metía no era fácil, por acompañarme al laboratorio las noches y los fines de semana, por aceptar mis ausencias y por cuidar mis cansancios. Gracias por aguantar mi mal humor en los momentos malos y por sacarme a flote cuando me hundía. GRACIAS POR SER EL CULPABLE DE TODO LO BUENO QUE ME PASA EN LA VIDA. Te quiero, para siempre.

Abstract



Microalgae are a group of photosynthetic microorganisms with highly attractive due its simple structure and unicellular nature, which facilitates its cultivation and genetic manipulation (**Chapter 1**). Nowadays, there is increasing interest in microalgae as a source of high-value compounds such as vitamins, antioxidants, lipids, proteins, etc. Moreover, the rapid growth rate outdoors makes them good candidates for bulk production of many compounds, including biodiesel, although its commercial applications are still limited.

The best strategy to find microalgae well adapted to the local climatological conditions, able to simultaneously grow at high rates and produce different compounds of biotechnological interest is the selection of new autochthon strains. In **chapter 2**, the isolation and characterization of a new microalgae isolated from the marshlands of Odiel River is described. The new microalga belonging to the genus *Picochlorum*, is able to grow at a high growth rate and thrive with adverse conditions. The fatty acids profile of this microalga makes it a promising candidate for the production of biodiesel, and its high content in the carotenoids lutein and zeaxanthin indicates that the microalga could also be a good source of natural eye vitamin supplements.

However, for an economically feasible biodiesel production based of this microalga, the lipid content should be significantly increased. In **chapter 3** we have optimized the cultivation method of this microalga in order to improve the content of neutral lipids. The optimization of the operation mode, the initial nutrient content and the bioreactor diameter allowed increasing four-fold the final biomass of *Picochlorum sp HM1*. Furthermore, by mixotrophic and nutritional starvation conditions, the neutral lipids synthesis in the microalga was induced. Nitrate and phosphate starvation resulted in an increase of neutral lipids, of about 2.27 and 2-fold, respectively. With a two-step culture method, a lipid values up to 10 times higher than in the control culture could be achieved.

The genetic manipulation of microalgae is a promising strategy claimed for many authors as the best approach to obtain production systems of compounds with commercial interest. Despite the biotechnological interest of microalgae, no robust and stable methods for genetic transformation of most microalgal strains exist and most of the work in this field has been carried out with a couple of strains. In **Chapter 4** approaches for the genetic transformation of marine microalgae *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* and the recently

identified *Picochlorum* sp *HM1* have been established. Transformation conditions for the three strains were optimized using the gene that confers resistance to the antibiotic paromomycin (*APHVIII*) and the gene that confers resistance to the antibiotic zeocin (*BLE*), both under the control of different heterologous promoters.

Lipid metabolism is a network involving hundreds of proteins and many subcellular compartments, including plastids, endoplasmic reticulum and lipids granules. The acyl-CoA-diacylglycerol acyltransferase (DGAT) plays an important role in the triacylglycerols biosynthesis, being the last enzyme in the biosynthesis pathway. These lipids have a high value due to both their use in human and animal nutrition and as feedstock for the production of third generation biodiesel. In **Chapter 5** the gene *EpDGAT1* from the boraginaceae *Echium pitardi* was overexpressed in the model microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, by transformation with a binary expression vector. Two obtained transformants were selected in which high gene expression was observed and a constitutive neutral lipids accumulation up 30% over that in the control culture. This is the first time that this gene is overexpressed in *Chlamydomonas reinhardtii* with satisfactory results, opening a promising line of study for the fatty acids biosynthesis pathway in this and other microalgae, as well as a valuable tool for the development of high added value products in microalgae.

Resumen



Las microalgas son un grupo de microorganismos fotosintéticos con gran atractivo debido su simple estructura y carácter unicelular, lo que facilita su cultivo y manipulación genética (**Capítulo 1**). En la actualidad, existe un creciente interés en las microalgas como fuente de compuestos de alto valor añadido como son vitaminas, antioxidantes, lípidos, proteínas, etc. Es más, su rápido crecimiento en el exterior las hace candidatas para la producción a granel de muchos compuestos, incluido biodiésel, aunque sus aplicaciones comerciales en este sentido son aún limitadas.

La mejor estrategia para encontrar microalgas bien adaptadas a las condiciones climatológicas locales, capaces de crecer a altas velocidades y producir al mismo tiempo diferentes compuestos de interés biotecnológico es la selección de nuevas estirpes autóctonas. En el **capítulo 2**, se describe el aislamiento y caracterización de una nueva estirpe de microalga aislada de las marismas del Río Odiel. La nueva microalga perteneciente al género *Picochlorum*, es capaz de crecer a una alta tasa de crecimiento y sobrevivir a condiciones adversas. Las características de su perfil lipídico la hace una prometedora candidata para la producción de biodiésel, igual que su alto contenido en los carotenoides luteína y zeaxantina indican que la microalga podría ser una buena fuente natural de suplementos vitamínicos oculares.

No obstante, para que una producción de biodiésel basada en el cultivo de esta microalga sea económicamente factible, el contenido en lípidos debe ser significativamente incrementado. En el **capítulo 3** se ha optimizado el método de cultivo de la microalga con el objetivo de mejorar el contenido en lípidos neutros. La optimización del modo de operación, del contenido inicial de nutrientes y del diámetro del bioreactor permitió incrementar hasta cuatro veces la biomasa final alcanzada en cultivos de *Picochlorum sp HM1*. Por otro lado, mediante el cultivo de la microalga en condiciones mixotróficas y carencias nutricionales, se ha inducido la síntesis de lípidos neutros. La carencia de nitrato y fosfato en el medio de cultivo incrementó el contenido en lípidos neutros en 2,27 y 2 veces respectivamente. Con un método de cultivo en dos fases se podría conseguir valores en lípidos hasta 10 veces mayores que en el cultivo control.

La manipulación genética de microalgas es una estrategia prometedora aclamada por muchos como la mejor aproximación para obtener sistemas productores de compuestos de interés comercial. A pesar del interés biotecnológico de las microalgas, actualmente no existen métodos estables para la transformación genética de muchas

estirpes de estos microorganismo y la mayoría del trabajo realizado en este campo ha sido llevado a cabo con un par de estirpes. En el **capítulo 4** se han establecido aproximaciones a sistemas de transformación genética de microalgas marinas. En este trabajo se han utilizado las microalgas *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* y, la recientemente identificada, *Picochlorum* sp *HM1* debido a su potencial biotecnológico en la producción de compuestos de alto valor añadido. Las condiciones de transformación para las tres estirpes fueron optimizadas utilizando el gen que otorga resistencia a paramomicina (*APHVIII*) y el gen que otorga resistencia a zeocina (*BLE*), ambos bajo el control de diferentes promotores heterólogos.

El metabolismo lipídico es una red en la que están involucrados cientos de proteínas y muchos compartimentos subcelulares, incluyendo a los plastidios, retículo endoplásmico y gránulos lipídicos. La enzima Acil-CoA-diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) juega un importante papel en la biosíntesis de triacilglicéridos, siendo la última enzima de su ruta de síntesis. Este tipo de lípidos tiene un alto valor debido tanto a su uso en nutrición animal y humana, como para la producción de biocombustibles de tercera generación. En el **capítulo 5** se ha sobreexpresado el gen *EpDGAT1* de la planta borraginácea *Echium pitardi*, en la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii*, mediante la transformación con un vector binario de expresión. De los transformantes obtenidos, se han seleccionado dos en los que se ha observado alta expresión del gen y una acumulación constitutiva de hasta un 30% más de lípidos neutros que en el cultivo control. Esta es la primera vez que se consigue sobreexpresar este gen en *Chlamydomonas reinhardtii* con resultados satisfactorios, abriendo una línea prometedora del estudio de la ruta de síntesis de ácidos grasos en esta y en otras microalgas, así como representa una valiosa herramienta para el desarrollo de productos de alto valor añadido de microalgas.

Índice



ÍNDICE

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL, OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

1.1.	Las microalgas	3
1.1.1.	La importancia de las microalgas	3
1.1.2.	Evolución histórica del uso de las microalgas	4
1.1.3.	Aplicaciones actuales de las microalgas	5
1.2.	Microalgas genéticamente modificadas	9
1.2.1.	Métodos para la transformación nuclear	10
1.2.2.	Principales problemas para la expresión de transgenes en microalgas	12
1.3.	Lípidos en microalgas	13
1.3.1.	Definición y tipos	13
1.3.2.	Carotenoides. Definición, importancia y biosíntesis	14
1.3.3.	Importancia de los lípidos saponificables en microalgas	19
1.3.4.	Ruta de síntesis de TAGs	21
1.3.5.	Manipulación genética de la ruta en microalgas	25
1.4.	El biodiesel	27
1.4.1.	Definición y producción	27
1.4.2.	Fuente de materia prima	28
1.5.	Objetivos y organización de la tesis	31

CAPITULO 2: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA ESTIRPE DE *PICOCHLORUM SP*

Abstract	35
Resumen	36
2.1. Introducción	37
2.2. Materiales y Métodos	39

2.2.1.	Organismos y condiciones de cultivo estándar	39
2.2.2.	Aislamiento de ADN genómico	40
2.2.3.	Amplificación del gen que codifica el ARNr 18S	41
2.2.4.	Microscopía electrónica de transmisión	41
2.2.5.	Determinación del peso seco y conteo de células	41
2.2.6.	Contenido en lípidos y análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de su composición de ácidos grasos	42
2.2.7.	Extracción de pigmentos y análisis por cromatografía líquida	42
2.3.	Resultados y Discusión	43
2.3.1.	Aislamiento e identificación de una nueva estirpe de <i>Picochlorum</i>	43
2.3.2.	Efecto de las diferentes condiciones de cultivo en el crecimiento de <i>Picochlorum sp HM1</i>	45
2.3.3.	Perfil de carotenoides	49
2.3.4.	Contenido en lípidos	53
2.3.5.	Perfil de ácidos grasos	54
2.4.	Conclusiones	59
2.5.	Conclusions	60

CAPITULO 3: OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE CULTIVO Y ENRIQUECIMIENTO EN LÍPIDOS DE LA MICROALGA PICOCHLORUM SP HM1

Abstract	63
Resumen	64
3.1. Introducción	65
3.2. Materiales y Métodos	68
3.2.1. Organismos y condiciones de cultivo	68

	estándar	
3.2.2.	Determinación del peso seco y de la densidad óptica del cultivo	68
3.2.3.	Contenido en lípidos totales	69
3.2.4.	Extracción y análisis de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases-espectrometría de masas	69
3.2.5.	Determinación del contenido en lípidos neutros por espectrofluorimetría	69
3.3.	Resultados y Discusión	70
3.3.1.	Aumento de la biomasa final de un cultivo de <i>Picochlorum sp HM1</i>	70
3.3.2.	Crecimiento y acumulación de lípidos neutros en cultivos con deficiencia de nutrientes	73
3.3.3.	Cambios en el perfil de ácidos grasos en carencia de nitrógeno y fósforo	77
3.3.4.	Aumento del contenido de triacilglicéridos de la microalga <i>Picochlorum sp HM1</i> mediante crecimiento mixotrófico	79
3.4.	Conclusiones	84
3.5.	Conclusions	85

CAPITULO 4: OPTIMIZACIÓN DE LA MANIPULACIÓN GENÉTICA DE PICHLORUM SP HM1 Y OTRAS MICROALGAS MARINAS

	Abstract	89
	Resumen	90
4.1.	Introducción	91
4.2.	Materiales y Métodos	93
4.2.1.	Organismos y condiciones de cultivo estándar	93
4.2.2.	Prueba de resistencia a antibióticos	93
4.2.3.	Extracción de ADN genómico a pequeña escala	94

4.2.4.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	94
4.2.5.	Aislamiento de plásmidos	94
4.3.	Resultados y Discusión	95
4.3.1.	Prueba de resistencia a antibióticos	95
4.3.2.	Construcción de vectores de expresión para la transformación genética	98
4.3.3.	Aproximación a la manipulación genética de microalgas salinas	102
4.4.	Conclusiones	109
4.5.	Conclusions	110

CAPITULO 5: SOBREEXPRESIÓN DEL GEN *DGAT1* DE *EQUIUM PITARDI* EN LA MICROALGA MODELO *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Abstract	113
Resumen	114
5.1. Introducción	115
4.1. Materiales y Métodos	117
5.2.1. Organismos y condiciones de cultivo estándar	117
5.2.2. Transformación nuclear de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	117
5.2.3. Determinación del contenido en lípidos neutros por espectrofluorimetría	118
5.2.4. Extracción de ADN genómico a pequeña escala	118
5.2.5. Extracción de ARN y transcripción reversa	118
5.2.6. Análisis de los transformantes por PCR	119
5.2.7. Análisis lipídico de los transformantes	119
5.3. Resultados y Discusión	120
5.3.1. Construcción de vectores de expresión para la transformación genética	120
5.3.2. Análisis del uso de codones del gen	123

5.3.3.	Transformación de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> y selección de transformantes	126
5.3.4.	Caracterización molecular de los transformantes seleccionados y expresión del gen	127
5.3.5.	Análisis de la acumulación de lípidos y del perfil de ácidos de los transformantes seleccionados	130
5.4.	Conclusiones	135
5.5.	Conclusions	136
CONCLUSIONES		141
CONCLUSIONS		145
REFERENCIAS		149
ANEXOS		193

Capítulo 1

Introducción general, objetivos y organización de la tesis



1.1. Las microalgas

1.1.1. La importancia de las microalgas

Las microalgas constituyen un grupo extremadamente heterogéneo de microorganismos que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos y que, por tanto, son capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Estos microorganismos poseen una gran variedad de formas y tamaños, habitan prácticamente la totalidad de los ecosistemas acuáticos y se encuentra también en suelos, rocas y plantas (Figura 1.1.). Pueden crecer autotrófica o heterotróficamente con un amplio rango de tolerancia a diferentes temperaturas, salinidades, pH y disponibilidad de nutrientes (Hu *et al.*, 2008; Brennan and Owende, 2010; Feng *et al.*, 2011). Contribuyen a casi el 50% del total de carbón orgánico fijado y poseen un enorme potencial biotecnológico. (Field, 1998; Wijffels *et al.*, 2013).

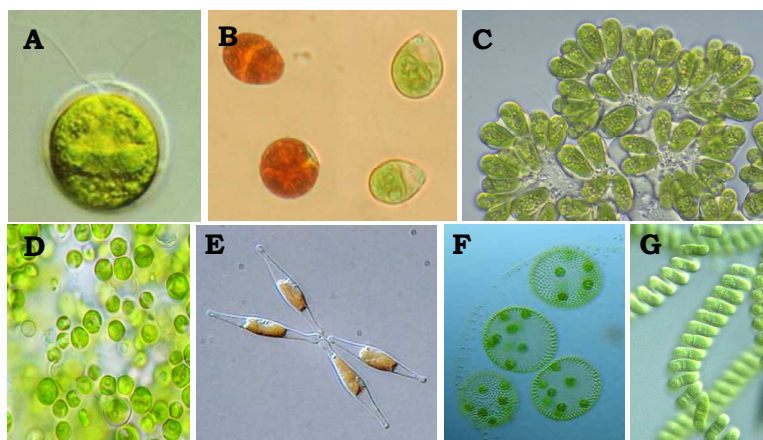


Figura 1.1. Variedad de microalgas más comunes. A: *Chlamydomonas reinhardtii*; B: *Dunaliella salina*; C: *Brothyococcus braunii*; D: *Chlorella vulgaris*; E: *Phaeodactylum tricornutum*; F: *Volvox carteri*; G: *Spirulina platensis*.

El grupo de las microalgas incluye dos tipos celulares distintos: cianobacterias, con estructura celular procariota y las restantes microalgas de estructura celular eucariota. Se estima que existen entre 200.000-800.000 especies de microalgas, de las cuales hay identificadas más de 35.000 (Tabatabaei *et al.*, 2011), cuya clasificación ha ido modificándose con el tiempo (South and Whittick, 1987; Ben-Amotz and Avron, 1990; Richmond, 1990; Henley *et al.*, 2004). Las microalgas se consideran los organismos fotosintéticos más eficientes,

ya que absorben más CO₂ y liberan más O₂ que cualquier planta, crecen extremadamente rápido y llegan a acumular grandes cantidades de diversos productos. Algunas microalgas son capaces de doblar su biomasa durante la fase exponencial en períodos tan cortos como 3,5 h (Chisti, 2007).

1.1.2. Evolución histórica del uso de las microalgas

A lo largo de la historia las microalgas han venido empleándose para distintos fines. El más antiguo de ellos es su uso como alimento para consumo animal o humano. El pueblo azteca recolectaba microalgas (cianobacterias del género *Spirulina*) de las aguas del lago Texcoco y las empleaba en la elaboración de distintos alimentos (García-González et al., 2003). El estudio científico de las microalgas comenzó en 1890 cuando el microbiólogo holandés Biejelink estableció cultivos puros de la microalga de agua dulce *Chlorella vulgaris*. Algo más tarde, en 1919, Otto Warburg consiguió cultivos densos de *Chlorella* en el laboratorio e introdujo la idea de utilizar estos cultivos como una herramienta de trabajo en el estudio de la fotosíntesis. Estos cultivos y otros de otras especies y tipos de microalgas fueron objeto de atención por parte de numerosos investigadores y se observó que bajo condiciones de cultivo adecuadas y, especialmente, a intensidad de luz de saturación, eran mucho más productivos que las plantas.

El concepto de *producción masiva de microalgas* aparece por primera vez en Alemania durante la II Guerra mundial, dirigido a la producción de lípidos para su uso como fuente de combustible. Se utilizaron las microalgas *Chlorella pyrenoidosa* y *Nitzschia palea*. No fue hasta después de la II Guerra Mundial cuando comenzó a considerarse la biomasa de microalgas como un suplemento alimenticio e incluso como una posible alternativa a las proteínas animales o vegetales convencionales para consumo directo del ganado o del hombre. Así, a partir de 1948, un grupo de científicos de la Carnegie Institution de Washington realizaron el primer trabajo sistemático que establece los fundamentos científicos del cultivo masivo el alga verde *Chlorella* para la producción a gran escala de alimentos.

El consumo de microalgas tiene especial aceptación en los países asiáticos donde, desde los años 60, se comercializa con éxito el alga *Chlorella*, admitida como producto dietético-medicinal (Richmond, 2004). En la década de los 80 se establecen ya numerosas industrias para la producción de microalgas, sobre todo de *Spirulina* y *Dunaliella*.

La producción de *Dunaliella* fue pronto considerada como una de las más prometedoras por su contenido en β -caroteno y sus propiedades terapéuticas (Ben-Amontz et al., 1986).

1.1.3. Aplicaciones actuales de las microalgas

a. Mitigación de las emisiones de CO₂:

La mitigación biológica de las emisiones de CO₂ ha llamado mucho la atención en los últimos años debido a la producción de energía en forma de biomasa en el proceso de fijación fotosintética de CO₂ (Pulz and Gross, 2004; Anjos et al., 2013).

Los gases de combustión producidos en centrales eléctricas son las responsables de más de un 7% del total de emisiones mundiales de CO₂ (Kadam, 1997). Asimismo, los gases de escape de otras industrias contienen hasta un 15% de CO₂ que puede proporcionar una fuente rica de este gas para el cultivo de microalgas (Maeda et al., 1995; Kadam, 2001). Esto proporciona una ruta más eficiente para la bio-fijación de CO₂. Por este motivo, la utilización de las emisiones industriales de este gas como fuente para el crecimiento de microalgas posee un gran potencial para reducir sus emisiones y para proporcionar una alternativa muy prometedora a las actuales estrategias de mitigación de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (Otsuki, 2001). Con esta finalidad, se considera beneficioso que las microalgas utilizadas sean tolerantes a altas concentraciones de CO₂ (Solovchenko and Khozin-Goldberg, 2013), como ocurre por ejemplo con *Chlorococcus littorale*, que muestra una tolerancia de más de 40% (Iwasaki et al., 1998).

b. Tratamiento de aguas residuales y bioremediación:

Alrededor de los años 80 cobra importancia la utilización de microalgas en el tratamiento de aguas residuales y en biorremediación. Se ha descrito la utilización de microalgas para eliminar fosfatos, nitrato, amonio (González-Fernández et al., 2011; Liu et al., 2012; Wang et al., 2013; Franchino et al., 2013), o metales pesados (Rajamani et al., 2007).

c. Nutrición y salud humana:

Hoy en día se estima que hasta un 75% de la producción mundial de microalgas se destina a la alimentación humana en forma de preparados en polvo, pastillas, cápsulas y tabletas. Su producción y comercialización se encuentra sometida a estrictas medidas de regulación por la normativa europea 258/97 CE.

Los efectos beneficiosos de la biomasa de microalgas para la salud humana se basan en las propiedades de la gran variedad de compuestos bioactivos que ésta contiene:

- Ácidos grasos poliinsaturados (Poliunsaturated Fatty Acids, PUFAs), que actúan como potentes antioxidantes; especialmente, las series de los ω 3 y ω 6 como son el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido docosahexaenoico (DHA) o el ácido araquidónico (AA). Estos ácidos grasos están considerados farmacológicamente importantes por sus propiedades dietéticas y terapéuticas (*Pulz and Gross, 2004*). Se cree que poseen efectos positivos en enfermedades cardiovasculares, enfermedades coronarias, aterosclerosis, hipertensión, colesterol y tratamiento del cáncer (*Mišurcová et al., 2011; Barrow et al., 2008*).
- Vitaminas, y carotenoides como β -caroteno (*Ye et al., 2008*), astaxantina (*Choi et al., 2011*), luteína (*Semba and Dagnelie, 2003; Del Campo et al., 2007*) o zeaxantina (*Semba and Dagnelie, 2003*), que poseen la capacidad de proteger frente al estrés oxidativo, causante de un amplio espectro de enfermedades y envejecimiento.
- Esteroles. Se han encontrado microalgas capaces de producir diferentes tipos de esteroles, como el clionasterol producido por *Spirulina sp* que ha mostrado que puede incrementar la producción del factor activador del plasminógeno en células endoteliales vasculares y que facilita la prevención de enfermedades cardiovasculares (*Barrow et al., 2008*).

Por otro lado, se ha demostrado la capacidad de algunas especies para producir compuestos terapéuticos (*Richmond, 2004*) con propiedades antibióticas, antiinflamatorias o antivirales. Un ejemplo muy conocido de esto es la microalga *Spirulina*, consumida desde hace muchos años porque puede estimular el sistema inmune ayudando a prevenir infecciones virales y el cáncer (*Barrow et al., 2008; Deng and Chow, 2010; Amaro et al., 2013*). Las microalgas o sus derivados son

utilizados también en la industria alimentaria como suplemento nutricional o como aditivos alimentarios (Becker, 2004; Pulz and Gross, 2004). Es muy conocido el uso de hidrocoloides extraídos de las algas como alginato, agar, y carragenanos utilizadas como agentes modificadores de la viscosidad en industria tanto alimentaria como farmacéutica (Barrow *et al.*, 2008).



Figura 1.2. Diferentes usos de las microalgas. A: tratamiento de agua residuales; B: suplemento alimenticio de astaxantina; C: alimentación animal en piscifactorías; D: suplemento alimenticio en pastillas de *Chlorella*; E: cosméticos; F: biocombustibles.

d. Nutrición animal y acuicultura:

Otra de las aplicaciones de las microalgas es su uso en alimentación animal (Becker, 2004). Se puede destacar la acuicultura, donde la biomasa resulta de vital interés para el cultivo de bivalvos, que se alimentan exclusivamente de microalgas, además de para los estadios tempranos de larvas de gambas y otros crustáceos, y de varias especies de zooplankton (artemias, rotíferos) que son a su vez la base para la alimentación de las larvas de peces (Zmora and Richmond, 2004; Guevara *et al.*, 2011). Igualmente, los pigmentos presentes en muchas especies de microalgas incrementan el color rosado de salmónidos y crustáceos (Duerr *et al.*, 1998; Jaime-Ceballos *et al.*, 2004). Las especies más empleadas como fuente alimenticia en acuicultura pertenecen a los géneros *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*,

Chaetoceros, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* y *Thalassiosira*. Su potencial procede de que son especies fácilmente cultivables, no tóxicas, con un tamaño adecuado para la ingesta, con pared celular de alta digestibilidad y gran valor nutricional debido a su contenido en ácidos grasos insaturados y vitaminas (Spolaore et al., 2006).

e) Producción de biocombustibles:

En los últimos años ha habido un interés creciente en las microalgas como posible materia prima para una tercera generación de biocombustibles renovables y para la mitigación de la emisión de gases de efecto invernadero debido a la fijación fotosintética del CO₂. Ha aparecido un asombroso número de revisiones acerca de este asunto (Sheehan et al., 1998; Chisti, 2007; Wang et al., 2008; Hu et al., 2008; Li et al., 2008; Tredici, 2010; Mata et al., 2010; Grobbeeelaar, 2010; Wijffels et al., 2010; Singh et al., 2011; Amaro et al., 2011; Ghasemi et al., 2012; Ratha and Prasanna, 2012; Halim et al., 2012). Sin embargo, en contraste con la producción de nutraceuticos de alto valor añadido o compuestos dietéticos, la comercialización de biocombustibles basados en algas tiene que competir con los precios de los combustibles fósiles y con el biodiésel obtenido de otras plantas de cultivo, como son la colza, la soja, el girasol o la palma. El uso de microalgas puede ser una alternativa sostenible al uso de estas plantas oleaginosas, porque ciertas especies contienen grandes cantidades de aceite, tienen rápidas tasas de crecimiento y permiten el uso de tierras no cultivables y aguas no potables, no desplazando el cultivo agrario (Gouveia and Oliveira, 2009; Mata et al., 2010).

f) Otros usos menos comunes:

Las microalgas pueden emplearse como biofertilizantes y acondicionadoras del suelo. Hay especies de microalgas que favorecen la fijación de nitrógeno y han hecho posible, por ejemplo, el cultivo de arroz sin adición de fertilizantes. Además, dada la importancia ecológica de las microalgas como productoras primarias de los ambientes acuáticos, pueden ser utilizadas como indicadores de contaminación ambiental (Olaizola, 2003; Torres et al., 2008).

Otro campo novedoso con potenciales aplicaciones es la utilización de microalgas como sistemas eucariotas para la expresión de proteínas heterólogas, que pueden ser desde hormonas o anticuerpos hasta antígenos para la inmunización de especies animales (León et al., 2004; Rosales-Mendoza et al., 2012). Recientemente se ha descrito la expresión de proteínas antigénicas en el cloroplasto de *Chlamydomonas*

reinhardtii y se ha demostrado su capacidad como vehículo para el suministro de vacunas recombinantes por vía oral en peces y conejos (Siripornadulsil et al., 2007).

Hoy en día, tanto la biomasa de algas como los extractos de las mismas han ganado una posición firme en el mercado. La demanda por parte de las industrias farmacéuticas, agroalimentarias o cosméticas de productos de alto valor añadido obtenidos a partir de estos microorganismos ha provocado que en los últimos años haya surgido un enorme interés por la biotecnología de microalgas (Raja et al., 2008). No obstante, las aplicaciones biotecnológicas de las microalgas han sido mucho menos estudiadas que las que implican el uso de bacterias o levaduras. Las limitaciones para la transformación genética de microalgas, que impiden su manipulación, y la menor experiencia en los sistemas de cultivo a gran escala son, sin duda, un hándicap importante. Todo esto ha disparado las investigaciones sobre la producción a gran escala de las especies de mayor interés comercial, los parámetros óptimos para el crecimiento de las distintas especies aisladas, y la mejora genética de estas cepas, no sólo desde el punto de vista biotecnológico, sino con el objetivo de alcanzar un mayor conocimiento fisiológico y bioquímico de las mismas.

1.2. Microalgas genéticamente modificadas

La manipulación genética de microalgas supondría una importante ventaja para su aplicación biotecnológica. La transformación de *Chlamydomonas reinhardtii* está bien establecida y ha sido ampliamente descrita (León et al., 2004; Purton, 2007; León and Fernández, 2007; Rosales-Mendoza et al., 2012). De hecho, fue la primera microalga modificada genéticamente de forma estable (Fernández et al., 1989; Debunchy et al., 1989). Diversas revisiones describen de forma exhaustiva las técnicas, promotores y genes marcadores utilizados para la transformación de *Chlamydomonas* (Lumbreras et al., 1998; Fuhrmann, 2001; Ruecker et al., 2008; Díaz-Santos et al., 2013) y otras microalgas (León and Fernández, 2007). A continuación, se resumen algunos de estos métodos y estrategias de transformación utilizados actualmente para la eficiente transformación nuclear de las microalgas, así como las principales dificultades encontradas para lograr este objetivo.

1.2.1. Métodos para la transformación nuclear

A diferencia del gran número de ejemplos de bacterias, levaduras e incluso plantas superiores transformadas genéticamente, tan sólo unas pocas especies de microalgas han sido transformadas con éxito.

La base de los métodos tradicionales utilizados para la transformación genética de microalgas es provocar, por diferentes métodos, una permeabilidad temporal de las membranas celulares, permitiendo así que las moléculas de ADN entren en las células sin alterar su viabilidad. Los principales métodos utilizados actualmente son:

- a. Agitación con perlas de vidrio en presencia de polietilenglicol (PEG), que se ha utilizado con éxito para la transformación de mutantes de *Chlamydomonas* carentes de pared celular (Kindle, 1990), o en estirpes silvestres en las que la pared se ha eliminado por tratamiento enzimático. Otras microalgas han sido transformadas con este método como por ejemplo, *Dunaliella salina* (Feng et al., 2009).
- b. Agitación con fibras de carburo de silicio descrita por Dunahay (Dunahay, 1997), que ha permitido la manipulación genética de *Chlamydomonas* (Kaeppeler et al., 1990; Asano et al., 1991; Kaeppeler et al., 1992; Dunahay et al., 1993) sin la necesidad de eliminar la pared celular, así como la manipulación de dinoflageladas como *Amphidinium* y *Symbiodinium* (Lohuis and Miller, 1998).
- c. Electroporación. Provoca una permeabilidad temporal de la membrana nuclear por la aplicación externa de un campo eléctrico. Ha sido utilizada para transformar una gran variedad de células y organismos, como es el caso de *Chlamydomonas* (Shimogawara et al., 1998), *Chlorella vulgaris* (Niu et al., 2011), *Scenedesmus obliquus* (Guo et al., 2013), *Dunaliella salina* (Lü et al., 2009), *Chlorella ellipsoidea* (Bai et al., 2013), *Phaeodactylum tricornutum* (Miyahara et al., 2013) y *Ostreococcus tauri* (van Ooijen et al., 2012).
- d. Bombardeo de partículas. Consiste en la aceleración, mediante pistola impulsada por helio, de partículas de oro o tungsteno recubiertas de ADN hacia las células diana. Este método ha sido particularmente satisfactorio para la transformación de diatomeas (Dunahay et al., 1995; Apt et al., 1996; Falciatore et al., 1999; Zaslavskaja et al., 2000; Muto et al., 2013), *Dunaliella*

- salina* y otras clorofitas (Kindle et al., 1989; Tan et al., 2005; Lü et al., 2005).
- e. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, descrita comúnmente para la transformación de plantas. Se basa en la capacidad de esta bacteria para transferir su ADN (plásmido Ti) a la célula hospedadora (Chen et al., 2012; Cha et al., 2012).
 - f. Otros métodos menos usuales: uso de virus recombinantes como medio de transporte del ADN exógeno (Hawkins and Nakamura, 1999), la utilización de transposones, o la microinyección (Langridge et al., 1985).

Solo unas cuantas estirpes de microalgas han sido utilizadas para establecer aproximaciones en ingeniería genética. Por ejemplo, las clorofitas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis gaditana* y *Ostreococcus tauri* o la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Derelle et al., 2006; Merchant et al., 2007; Radakovits et al., 2012; Wijffels et al., 2013).

Durante varios años el único método de selección disponible para la transformación de microalgas implicaba la complementación de mutantes específicos con genes homólogos, es decir, genes pertenecientes a la misma especie transformada (Kindle, 1998). No obstante, esta estrategia no es aplicable a estirpes silvestres o a microalgas diploides, como las diatomeas, debido a las dificultades para generar mutantes en los que ambos alelos de un gen sean defectuosos. Hoy en día contamos con una amplia colección de genes reporteros y marcadores seleccionables (León et al., 2004); los marcadores más potentes son aquellos que confieren resistencia frente a antibióticos o herbicidas, por ejemplo: *BLE*, *NPTI* y *APHVIII*, que otorgan resistencia a los antibióticos bleomicina, G418 y paramomicina, respectivamente.

Los únicos ejemplos de clorofitas genéticamente transformadas con promotores endógenos son un par de casos de complementación funcional de estirpes auxotróficas con genes homólogos (Sun et al., 2006; Streinbrenner and Sandmann, 2006), los intentos llevados a cabo para el aislamiento del promotor *RbcS* endógeno de *Dunaliella* (Walker et al., 2005) y el reciente aislamiento de promotores endógenos de *Nannochloropsis* (Kilian et al., 2011; Radakovits et al., 2012) y *Ostreococcus* (Corellou et al., 2009). No existen promotores endógenos aislados para otras clorofitas por lo que su transformación nuclear se ha basado normalmente en promotores de bacterias o virus.

Algunos promotores heterólogos ampliamente utilizados para la transformación de plantas han sido utilizados en la transformación genética de microalgas. Por ejemplo, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) ha sido utilizado para la transformación nuclear de *Chlorella elipsoidea* (Kim et al., 2002), *Dunaliella salina* (Tan et al., 2005; Feng et al. 2009), *Haematococcus pluvialis* (Teng et al., 2002), y *Nannochloropsis sp* (Cha et al., 2011) con variedad de grado de éxito. Asimismo, se han descrito otros promotores para conducir la expresión de genes exógenos en microalgas, como son el promotor de la ubiquitina ligasa de *Zea mais* (Bateman and Purton, 2000; Geng et al., 2003), el promotor SV40 del virus de simio (Teng et al., 2002), el promotor del virus de *Chlorella*, *Paramecium bursaria* (Ruecker et al., 2008) o el promotor del gen de la nopalina sintasa (NoS) de *Agrobacterium tumefaciens* (Díaz-Santos et al., 2013). Sin embargo, en la mayoría de los casos la eficiencia de la transformación fue baja o la expresión inestable.

1.2.2. Principales problemas para la expresión de transgenes en microalgas

Una vez que el transgen ha sido introducido en la célula e integrado en el cromosoma de la microalga, éste debe expresarse. El gen exógeno debe estar precedido por una región promotora que sea adecuadamente reconocida por la ARNpolimerasa de la célula hospedadora; después el ARNm debe ser traducido. La similitud entre el uso de codones del transcrito y el del organismo hospedador es un aspecto importante a considerar. El sesgo en el uso de codones hace que un codón, que es frecuentemente utilizado en ciertos organismos, sea raramente utilizado por otros. Esta situación causa diferencias en la abundancia de ARNt e influye en la eficiencia de traducción y en el nivel de expresión. Esta limitación es importante para la expresión de genes heterólogos en microalgas (León et al., 2004).

La proteína fluorescente verde o “green fluorescence protein” (GFP) y la proteína luciferasa (LUC) son dos marcadores extremadamente útiles, pero todos los intentos para expresarlos en microalgas fracasaron hasta que Fuhrmann y colaboradores (Fuhrmann et al., 1999; Fuhrmann et al., 2001) sintentizaron ADNs que codificaban la proteína fluorescente verde (GFP) y la luciferasa (LUC) con la preferencia de codones de *Chlamydomonas*. Los intentos para expresar la GFP en *Phaeodactylum tricornutum* (Zaslavskaja, 2000; Zaslavskaja, 2001) son también particularmente significativos para entender la

importancia del sesgo de codones en la expresión satisfactoria de genes heterólogos. Estos autores estudiaron la expresión de varios genes de la GFP bajo el control del promotor de la proteína de unión de la fucoxantina y la clorofila (FCP) en *Phaeodactylum tricornutum*. Observaron que la GFP (adaptada al uso de codones de humanos) con el uso de codones similar al de los genes de *Phaeodactylum tricornutum* era la única versión de GFP que se expresaba apreciablemente. La baja expresión de la GFP no modificada se atribuyó al efecto del sesgo en el uso de codones.

Aunque todos los elementos requeridos para la óptima transcripción y traducción de los transgenes se hayan incluido en la construcción genética, la expresión de un gen exógeno puede ser muy baja o nula. Más aún, si los clones de algas transgénicas no se mantienen en condiciones selectivas, la expresión de estos genes puede ser suprimida. El silenciamiento génico en microalgas se ha atribuido a diversos mecanismos epigenéticos, transcripcionales y postranscripcionales, y puede estar mediado por el mecanismo de interferencia por ARNi.

1.3. Lípidos en microalgas

1.3.1. Definición y tipos

A diferencia de otras macromoléculas, los lípidos no son polímeros, sino que son moléculas bastante pequeñas que presentan una fuerte tendencia a asociarse mediante fuerzas no covalentes. Los lípidos se suelen caracterizar por su estructura, formada por una “cabeza” hidrófila polar conectada a una “cola” hidrocarbonada hidrófoba apolar. Los lípidos constituyen un grupo muy heterogéneo compuesto principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno.

Una característica común debida a su estructura es la insolubilidad en agua y otros solventes polares. Son solubles solamente en solventes no polares como el éter, benceno, cloroformo, etc. Esta apolaridad se debe a que sus moléculas tienen muchos átomos de carbono e hidrógeno unidos de modo covalente puro y por lo tanto no forman dipolos que interactúen con el agua. Por su carácter tanto polar como apolar, se consideran a estas moléculas anfipáticas.

Los lípidos se clasifican de forma general en dos grandes grupos: lípidos saponificables e insaponificables.

Los insaponificables comprenden a tres categorías inferiores, los isoprenoides o terpenoides (por ejemplo carotenoides), esteroides (por ejemplo hormonas) y eicosanoides (por ejemplo ácido araquidónico).

Los lípidos que contienen ácidos grasos (o lípidos saponificables) pueden generalmente ser clasificados en dos categorías basándonos en la polaridad del grupo molecular de su cabeza (*Kates, 1986*):

1. Lípidos neutros, los cuales engloban a acilglicéridos y ácidos grasos libres.
2. Lípidos polares, los cuales pueden a su vez ser divididos en los siguientes subgrupos:
 - i. Fosfolípidos
 - ii. Glucolípidos

1.3.2. Carotenoides. Definición, importancia y biosíntesis

Los carotenoides son un amplio grupo de isoprenoides presentes en todos los organismos fotosintéticos y en algunas bacterias y hongos no fotosintéticos. La mayoría son poliisoprenoides de 40 átomos que poseen una cadena hidrocarbonada que se podría considerar la espina dorsal de la molécula. Los carotenoides que contienen exclusivamente carbono e hidrógeno en su estructura se conocen como carotenos, mientras que los derivados oxigenados de estos hidrocarburos se conocen como xantofilas. Los carotenoides, ya sean carotenos o xantofilas, pueden ser lineales o acíclicos como el fitoeno, monocíclicos como el γ -caroteno, o bicíclicos como el β -caroteno. La estructura de un carotenoide puede determinar en parte la función biológica del pigmento. Su coloración tiene relación directa con su estructura. Con el aumento del número de dobles enlaces conjugados la longitud de onda de la luz absorbida también aumenta, confiriendo al carotenoide un color más rojizo. Los máximos de absorción varían desde 450 a 490 nm.

Los carotenoides se unen a ciertas proteínas integrales de membrana donde participan en los procesos de captación y transferencia de energía. Los carotenoides presentes en los complejos antena fotosintéticos captan energía en sus longitudes de onda características, gracias a sus sistemas de dobles enlaces conjugados y la transfieren a las clorofilas. De este modo, amplían el espectro de luz que un organismo puede emplear para la fotosíntesis. Las xantofilas

juegan un papel decisivo en la disipación de la energía excedente (fotoprotección) y en la detoxificación de formas reactivas del oxígeno que se forma durante la fotosíntesis (*Demming-Adams et al., 1996; Baroli and Niyogi, 2000; Iliaia et al., 2013*). Además, gracias a sus dobles enlaces conjugados juegan un importante papel como antioxidantes, desactivando radicales libres altamente agresivos para el organismo. Los carotenoides son también factores provitamínicos de vital interés en muchos organismos que deben estar incluidos en la dieta, puesto que solo los organismos fotosintéticos, y ciertas bacterias y hongos, son capaces de sintetizarlos.

Sus aplicaciones en la industria agroalimentaria, cosmética y acuícola, así como sus ventajas nutricionales y terapéuticas se basan en su color y en su alta capacidad de protección frente a radicales libres (*Borowitzka, 1997; Richmond, 2000; Lorenz and Cysewski, 2000; Eonson et al., 2003; Butnariu and Giuchici, 2011*). Se ha demostrado que la ingesta de carotenoides ofrece protección frente la degeneración macular, los daños inducidos en la piel por la luz UV y algunas enfermedades degenerativas asociadas a la edad avanzada (*Nishino et al., 2002; Guerin et al., 2003; Semba and Dagneile, 2003; Sunkireddy et al., 2013*). Pueden proporcionar beneficios adicionales para la salud. Este es el caso de la luteína, que puede reducir el riesgo de diversos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas y oftalmológicas (*Hu et al., 2011; Trejo-Solís et al., 2013*). La ingesta de luteína y zeaxantina disminuye el riesgo de padecer cataratas y enfermedades degenerativas de la retina relacionadas con el envejecimiento (*Moeller et al., 2000; Guerin et al., 2003*). Otros carotenoides presentan también acción anticarcinogénica, antimutagénica, estimuladora del sistema inmune, antiinflamatoria (*Demming-Adams, 2002; Stahl and Sies, 2005; Soontornchainboon et al., 2012; Firdous et al., 2013*), reductora de hipertensión, desintoxicante y reductora de colesterol.

Existen varias revisiones que ofrecen una buena visión general de la ruta de biosíntesis de carotenoides en células vegetales, tanto de plantas como de microorganismos (*Sandmann, 1994; Armstrong, 1997; Cunningham and Gantt, 1998; Botella-Pavía and Rodríguez-Concepción, 2006; Sandmann, 2006*). Los carotenoides se forman a partir de un bloque constructor de 5 átomos de carbono, el isopentenil pirofosfato (IPP), precursor de todos los isoprenoides.

El IPP formado se isomeriza por acción de la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa (IPPi) a dimetilalil pirofosfato, que por la adición consecutiva de tres moléculas de IPP se convierte en geranil-geranil

pirofosfato (GGPP). La condensación de dos moléculas de GGPP catalizada por la fitoeno sintasa (PSY) nos conduce a la síntesis del primer carotenoide de 40 átomos de carbono lineal e incoloro, el fitoeno (Figura 1.3.). A partir del fitoeno se sintetizan el resto de carotenoides por una serie de desaturaciones y ciclaciones. Las xantofilas, a su vez, se forman por hidroxilación, oxidación o epoxidación de los correspondientes carotenoides. Así, el fitoeno sufre una serie de cuatro desaturaciones consecutivas que transforman el fitoeno incoloro en licopeno de color rosado. En plantas y microalgas esta conversión está catalizada por dos enzimas muy relacionadas: la fitoeno desaturasa (PDS) y la z-caroteno desaturasa (ZDS). La molécula intermediaria sufre entonces una isomerización a licopeno gracias a la enzima caroteno isomerasa (CRTISO). Parece que esta isomerización puede tener también lugar de forma espontánea en presencia de luz, aunque la actividad CRTISO se ha encontrado en muchas plantas y algas (*Isaacson et al., 2002*). PDS y ZDS siguen el mismo mecanismo de reacción utilizando plastoquinona como aceptor de hidrógeno y conectando así la desaturación del caroteno con la cadena de transporte electrónico fotosintético.

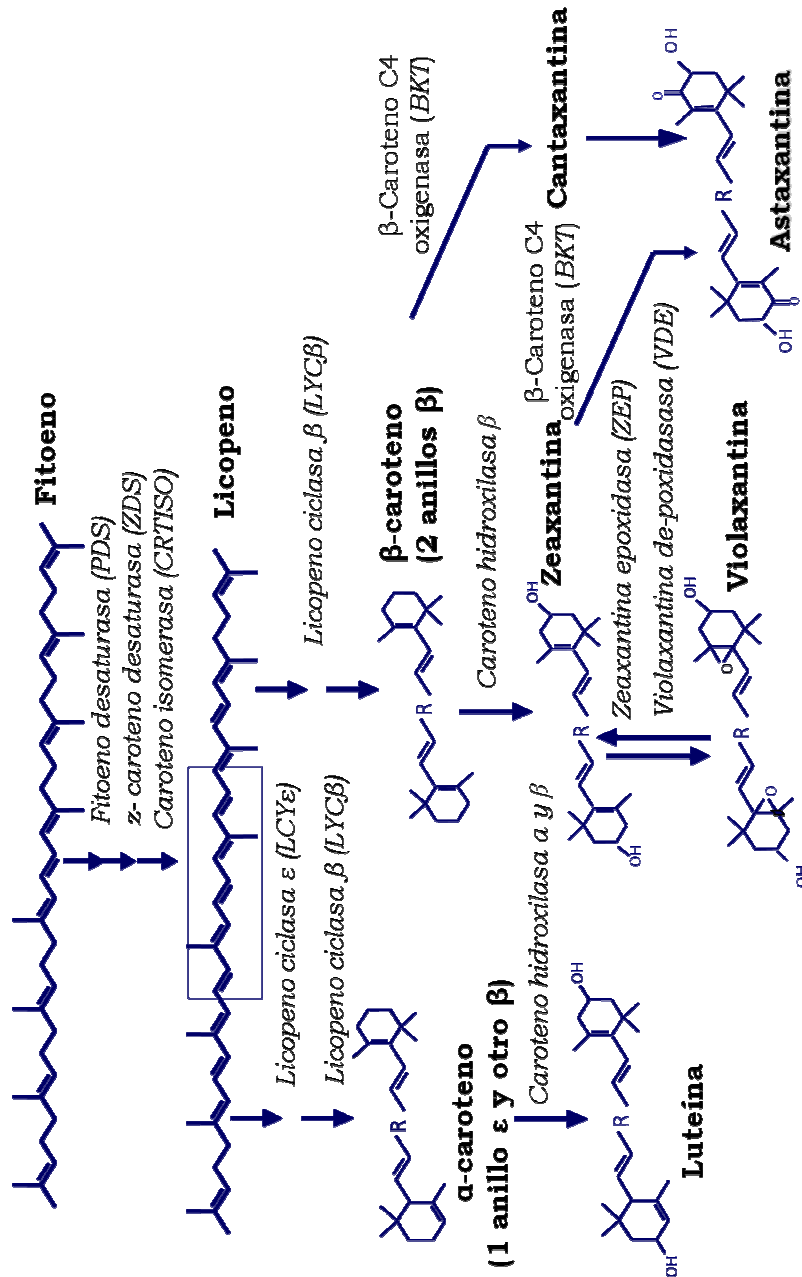


Figura 1.3. Ruta general de carotenogénesis en células vegetales empezando desde el fitoeno como primer carotenoide.

El licopeno puede ciclarse por la acción de la licopeno ciclasa- β (LCY β) para dar γ -caroteno con un anillo β , o por la acción de la licopeno ciclasa- ϵ (LCY ϵ) para dar δ -caroteno con un anillo ϵ . A su vez cada uno de ellos puede ciclarse nuevamente por la acción de cualquiera de las dos ciclasas. De forma que se puede obtener β -caroteno con los dos anillos β , o α -caroteno con un anillo β y otro ϵ . Los anillos β y ϵ sólo se diferencian en la posición de un doble enlace.

La hidroxilación en el carbono 3 (C3) de cada anillo del β -caroteno produce zeaxantina (3,3'-hidroxi- β -caroteno) y la hidroxilación del C3 de cada anillo de α -caroteno produce luteína (3,3'-hidroxi- α -caroteno), ambos xantofilas. A partir del β -caroteno y de la zeaxantina, con la acción de la enzima β -caroteno-C4-oxigenasa (BKT), se puede formar la astaxantina, molécula con grandes propiedades terapéuticas (*Fasset and Coombes, 2011*). Esta enzima no existe en plantas superiores, tan solo existe en algunas microalgas como *Haematococcus pluvialis* (*Li et al., 2011*) o *Chlorella zofingiensis* (*Rise et al., 1994*), bacterias fotosintéticas como *Agrobacterium aurantiacum* (*Yokoyama and Miki, 1995*) y algunos hongos.

Generalmente, en las células vegetales en condiciones no estresantes se acumula la xantofila violaxantina. Cuando la intensidad lumínica es mayor que la requerida para la saturación de la fotosíntesis, se pone en marcha el Ciclo de las Xantofilas (Figura 1.4.). En este ciclo la violaxantina pasa a zeaxantina a través del intermediario anteraxantina mediante la acción de la enzima violaxantina deepoxidasa (VDE) que se localiza en el lumen tilacoidal del cloroplasto (*Hager and Holocher, 1994*). En estas circunstancias se acumula en los tilacoides esta xantofila, esencial para la captación y transporte de la energía de excitación excedente a los centros de reacción, permitiendo hacer frente a los potenciales efectos tóxicos de la luz (*Lawlor, 2001; Jin et al., 2003*). A intensidades de luz no saturantes para la fotosíntesis o en condiciones de oscuridad, la zeaxantina es convertida de nuevo a violaxantina por la acción de la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) (*Hager, 1980*). En resumen, el ciclo de las xantofilas funciona como un mecanismo esencial para la adaptación de las células vegetales a diferentes condiciones de luz, proporcionando rápidamente pigmentos accesorios (violaxantina) a bajas intensidades de luz o en ausencia de ésta, así como un pigmento fotoprotector (zeaxantina) contra los productos altamente reactivos generados en condiciones de luz intensa (*Eskling et al., 1997; Jahns et al., 2009*).

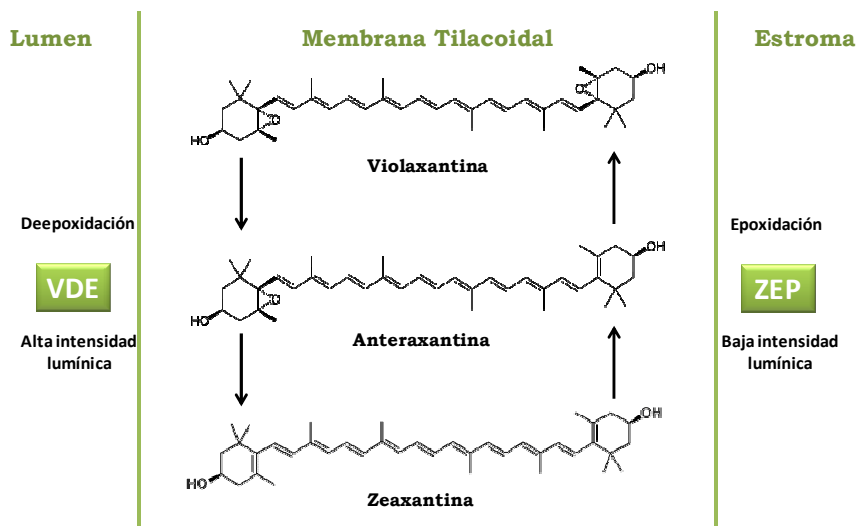


Figura 1.4. Esquema de las reacciones ocurridas en el Ciclo de las Xantofilas (Jahn et al., 2009)

1.3.3. Importancia de los lípidos saponificables en microalgas

Los lípidos más sencillos son los ácidos grasos, que son también componentes de muchos lípidos complejos. Un ácido graso es una molécula que consiste en un grupo carboxilo hidrofílico unido en uno de los extremos de una cadena hidrocarbonada hidrofóbica. Estos ácidos grasos se nombran basándose en sus dos atributos más importantes: el número total de átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada y el número de dobles enlaces a lo largo de ella. Los ácidos grasos saturados no poseen dobles enlaces en su cadena, mientras que los ácidos grasos insaturados poseen al menos un doble enlace (Nelson and Cox, 2000; Halim et al., 2012) (Figura 1.5.). Cuando el grupo carboxilo terminal de la molécula de ácido graso se une a un grupo no cargado (por ejemplo glicerol), se forma una molécula de lípido neutro (por ejemplo triacilglicéridos, TAGs). Por otro lado, si la asociación del ácido graso es con un grupo con carga (por ejemplo un complejo de glicerol y fosfato), se forma una molécula de lípido polar, por ejemplo un fosfolípido (Halim et al., 2012). La mayoría de los ácidos grasos presentes en la naturaleza presentan un número par de átomos de carbono. Aunque las cadenas hidrocarbonadas son lineales en la mayor parte de los ácidos grasos, algunos de ellos presentes fundamentalmente en bacterias, contienen ramificaciones o incluso estructura cíclica.

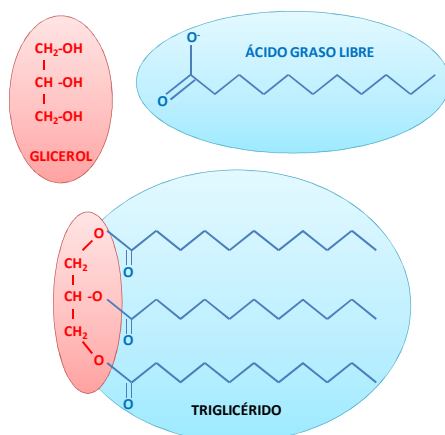


Figura 1.5. Esquema básico de la estructura del glicerol, un ácido graso libre y un triacilglicérido.

Los lípidos neutros suelen tener la función de almacenaje de energía en la célula, mientras que los lípidos polares forman parte de las membranas. Los acilglicéridos consisten en ácidos grasos esterificados en un esqueleto de glicerol y se nombran según el número de ácidos grasos que posea la molécula en triacilglicéridos (TAGs), diacilglicéridos (DAGs) y monoacilglicéridos (MAGs). Los ácidos grasos libres están unidos a un átomo de hidrógeno. Existen también otros tipos de lípidos neutros que no contienen ácidos grasos en su estructura, como son hidrocarburos, esteroides, cetonas y pigmentos (Roessler, 1988; Volkman et al., 1989; Bigogno et al., 2002; Mansour et al., 2003; Basova, 2005; Khozin-Goldberg and Cohen, 2006).

El análisis de miles de especies de microalgas ha mostrado grandes diferencias en el contenido de lípidos entre las diferentes especies, siendo entre un 1% y un 85% aproximadamente del total de su peso seco celular (Spolaore et al., 2006; Chisti, 2007; Li et al., 2008b). Las microalgas producen una amplia variedad de ácidos grasos con longitud de cadena que va desde C10 a C24 (Hu et al., 2008), dependiendo de las especies o estirpes. Por ejemplo, la cianobacteria filamentosa *Trichodesmium erythraeum* puede sintetizar ácidos grasos de C10 con una densidad de un 50% del total de sus ácidos grasos (Parker et al., 1967), mientras que la microalga dinoflagelada *Cryptothecodinium cohnii* puede producir DHA (C22:6 ω 3) con un 30-50% del total de sus ácidos grasos (De Swaaf et al., 1999). Por lo general, los ácidos grasos tienen configuración *cis*. Los ácidos grasos de 16C a 18C son los más frecuentes. No obstante, las moléculas de cadena media

(10C, 12C, 14C) o demasiado largas (> 20C) predominan en algunas especies. Por lo general, en las microalgas de agua dulce predominan los ácidos grasos saturados y mono-insaturados; así, se observa una menor proporción de PUFAs. Estos últimos, ocasionalmente, constituyen la mayor fracción de ácidos grasos en especies marinas. Por otra parte, la clase de lípidos de las microalgas, puede variar bajo condiciones diferentes de cultivo (*Emdadi and Berland, 1989; Peeler et al., 1989; Reitan et al., 1994; Khozin-Goldberg and Cohen, 2006; Hu et al., 2008; Griffiths and Harrison, 2009*).

1.3.4. Ruta de síntesis de TAGs

El metabolismo lipídico de las algas es similar al de las plantas superiores, particularmente, en la biosíntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos, como consecuencia de las homologías de secuencia y la similitud de características bioquímicas observadas entre ciertos genes y enzimas, de origen vegetal y algal, involucrados en la producción de lípidos.

La biosíntesis de ácidos grasos está muy bien estudiada tanto en bacterias (*Rock and Jackowski, 2002*) como en plantas (*Harwood, 1996*), sin embargo, la ruta de síntesis en algas ha sido deducida teóricamente a partir de la homología con estos sistemas (*Blatti et al., 2013*). En el cloroplasto ocurre la síntesis *de novo* de ácidos grasos, cuyo paso inicial consiste en la carboxilación de acetil-CoA dependiente de ATP para su conversión en malonil-CoA. Esta reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) y es considerada el paso limitante del proceso (*Postbeittenmiller et al., 1991; Postbeittenmiller et al., 1992*), ya que compromete el flujo de acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos. Las unidades de acetil-CoA probablemente derivan del piruvato procedente de la glucólisis.

La reacción anterior es seguida por la acción del complejo de la ácido graso sintasa (FAS), que está formado por siete polipéptidos separados, pero estrechamente asociados formando el complejo. El malonil-CoA formado por la ACCase entra en el complejo uniéndose a la proteína portadora de grupos acilos (ACP), formándose malonil-ACP. Sobre esta unión actúan cinco de los componentes del complejo: la cetosintetasa (KS), la ceto-reductasa (KR), la deshidratasa (DH) y la enoil reductasa (ER). Mediante varios ciclos de adición descarboxilativa de malonil-CoA a la cadena en crecimiento y β -reducción, se obtiene como producto final moléculas de C16 y C18 saturadas. Una vez ocurrido esto, el componente tioesterasa (TE) del complejo cataliza la hidrólisis

del ácido graso de la ACP. Los ácidos grasos libres son esterificados con CoA por una enzima ligasa de CoA para su transporte hacia el citoplasma y la mitocondria, donde sufrirá desaturación aerobia y elongación para formar el resto de ácidos grasos. Finalmente tomarán diferentes rutas dependiendo si van a formar parte de los fosfolípidos de membrana o de los TAGs de almacenamiento (Figura 1.6.) (Guschina and Harwood, 2006; Blatti et al., 2013).

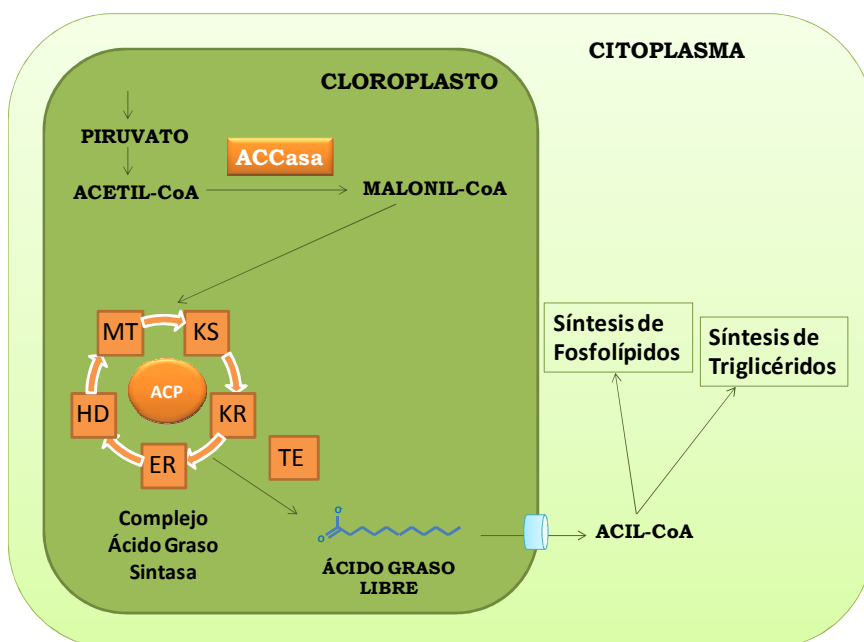


Figura 1.6. Ruta de biosíntesis de ácidos grasos. El acetil-CoA transformado por la ACCasa en malonil-CoA, entra en el ciclo de catalítico llevado a cabo por el complejo de la ácido grasos sintasa. Finalmente se obtienen ácidos grasos que pasan al citoplasma y al retículo endoplásmico para la formación del resto de los lípidos. ACCasa: Acetil-CoA Carboxilasa; MT: Malonil Transacilasa; KS: Cetoacil Sintasa; KR: Cetoacil Reductasa; ER: Enoil Reductasa; HD: Hidroxiácil Deshidratasa; ACP: Proteína Transportadora de Grupos Acilos; TE: Tioesterasa.

Por su parte, se sugiere que la biosíntesis de triglicéridos sucede en el citosol y en el retículo endoplásmico esencialmente a través de la catálisis por acil-transferasas del traslado secuencial de ácidos grasos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato (Fischer et al., 2008; Hu et al., 2008). A la ruta de síntesis que ocurre en el retículo endoplásmico se la conoce como Ruta de Kennedy (Kennedy, 1961). Las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y ácido fosfatídico

aciltransferasa (LPAT) catalizan la transferencia de grupos acilos desde el acil-CoA hacia las posiciones 1 y 2 del glicerol-3-fosfato, respectivamente. Después, la enzima ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) hidroliza el fosfato del ácido fosfatídico para producir diacilglicerol (DAG) (Figura 1.7.). En el último paso de la ruta en la que se utiliza el diacilglicerol como aceptor de grupos acilos, se han descrito, al menos, tres enzimas diferentes (Figura 1.8.).

La primera es la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), que es la ruta principal de biosíntesis *de novo* de TAGs. Esta enzima utiliza moléculas de acil-CoA como donadoras de grupos acilos como ocurre con el resto de enzimas de la ruta de Kennedy. Existen dos isoformas no homólogas, DGAT1 y DGAT2, que catalizan la misma reacción, pero que, sin embargo, no presentan ningún tipo de similitud en cuanto a secuencia o estructura. Las otras dos enzimas de síntesis de TAGs son independientes de acil-CoA. Una de ellas es la fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa (PDAT), que usa fosfolípidos como donadores de grupos acilos y parece estar implicada en la regulación de la composición de los lípidos de membrana en células eucariotas (*Dahlqvist et al., 2000*). Por otro lado, la tercera enzima que cataliza la formación de TAGs se denomina diacilglicerol transacilasa (DGTA) y utiliza una segunda molécula de diacilglicerol como donador de grupos acilos. Se ha descrito que esta tercera ruta es importante en la reconstitución de TAGs digeridos en el intestino de mamíferos (*Lehner and Kuksis, 1993*), aunque también se ha encontrado esta actividad en semillas de lino (*Linum usitatissimum L.*), girasol (*Helianthus annuus*) y en la levadura oleaginoso *Candida curvata D* (*Waters et al., 2003*).

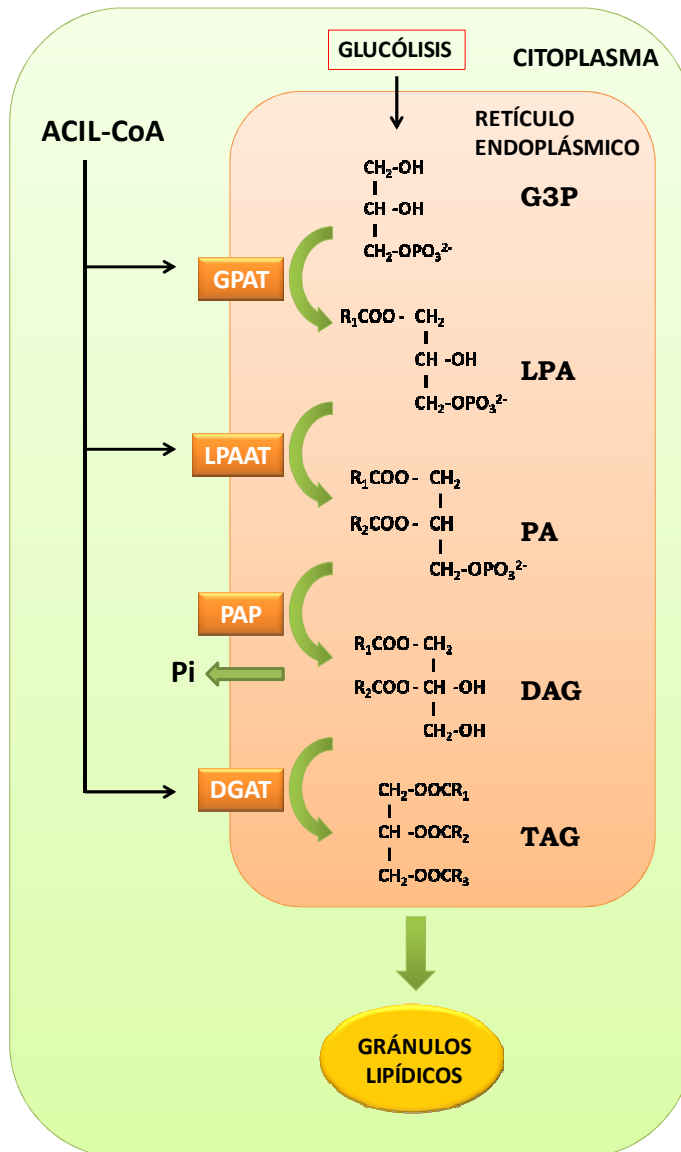


Figura 1.7. Biosíntesis de triacilglicerol a partir de acilglicéridos. Las moléculas de Acil-CoA sintetizadas en el citosol a partir de ácidos grasos libres van siendo unidas secuencialmente a una molécula de glicerol-3-fosfato (G3P), hasta llegar a la estructura de triacilglicérido (TAG) en la que el glicerol está unido a tres moléculas de ácidos grasos. GPAT (Glicerol-3-Fosfato Acil Transferasa), LPAAT (Ácido Lisofosfatídico Acil Transferasa), PAP (Ácido Fosfatídico Fosfatasa), DGAT (Diacilglicerol Acil Transferasa), PDAT (Fosfatidilcolina Acil Transferasa), LPA (Ácido Lisofosfatídico), PA (Ácido Fosfatídico), DAG (Diacilglicerol), Pi (Fosfato inorgánico).

1.3.5. Manipulación genética de la ruta en microalgas

Algunas revisiones tratan los modestos avances conseguidos en las últimas décadas en el campo de la ingeniería genética para mejorar el rendimiento de la acumulación de lípidos en microalgas (Rosenberg *et al.*, 2008; Radakovits *et al.*, 2010; Costa and de Morais, 2011). La mayoría de los avances en ingeniería genética de la ruta de almacenamiento de carbono en microalgas ha sido llevado a cabo en *Chlamydomonas reinhardtii* (Wang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Work *et al.*, 2010), pero los métodos genéticos y moleculares han sido desarrollados para otras especies modelo de algas entre que las que se incluye *Phaeodactylum tricornutum* (Apt *et al.*, 1996; Zaslavskaja *et al.*, 2000; Siaut *et al.*, 2007; Bowler *et al.*, 2008; De Riso *et al.*, 2009; Saade and Bowler, 2009).

Los primeros trabajos en biología molecular y genética de microalgas fueron el aislamiento y sobreexpresión de la enzima ACCasa de *Cyclotella cryptica* (Dunahay *et al.*, 1996). Esta enzima cataliza un punto clave en la síntesis de ácidos grasos en algas. Aunque la secuencia completa del gen de la ACCasa fue sobreexpresado en levaduras y en *Cyclotella cryptica*, no se observó un aumento en la síntesis de lípidos (Sheehan *et al.*, 1998). Muchos intentos por manipular los genes que codifican para la ACCasa y otros genes de la ruta de síntesis de ácidos grasos no han encontrado los resultados esperados. Así, se pensó que la manipulación de la ruta de síntesis de ácidos grasos no era una estrategia prometedora. Sin embargo, la manipulación de los genes de la ruta de ensamblado de los TAGs, como por ejemplo la GPAT o la DGAT, han mejorado el contenido en aceite de muchas semillas de plantas (Radakovits *et al.*, 2010). Esto sugiere que las enzimas en la ruta de ensamblado de TAGs son candidatas interesantes para la manipulación genética en la mejora del contenido en lípidos en microalgas.

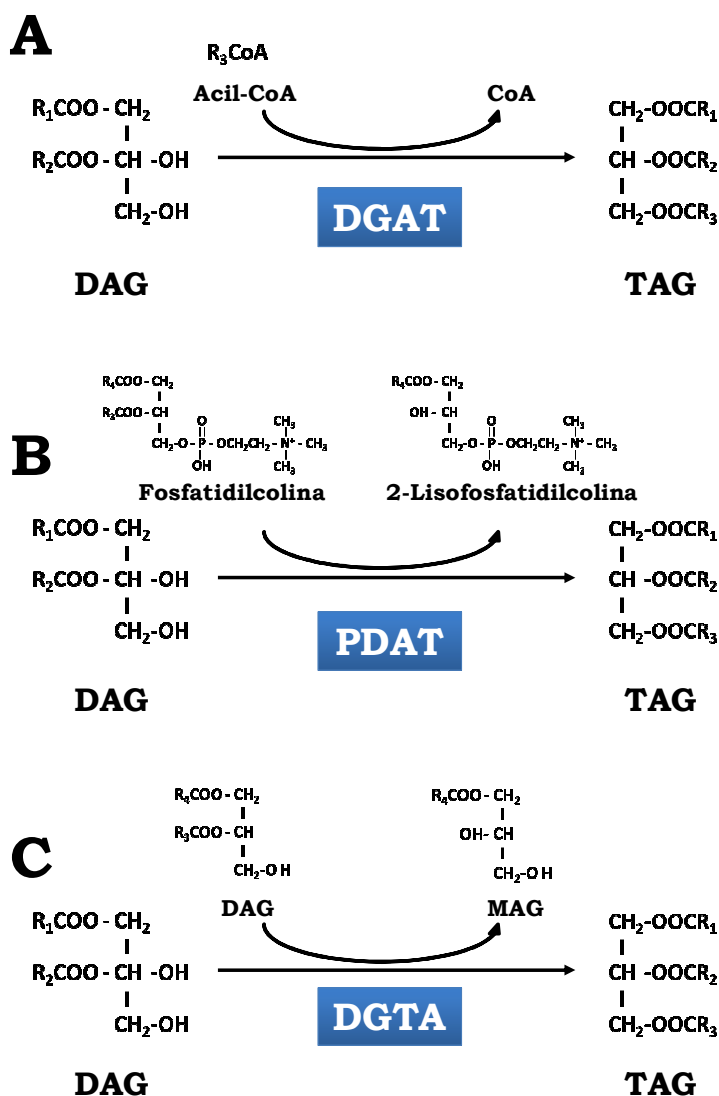


Figura 1.8. Posibles reacciones de biosíntesis de TAGs. Las tres enzimas usan el DAG (Diacilglicerol) como aceptor de grupos acilos pero cada una posee un donador diferente de ellos. (A) DGAT (Diacilglicerol aciltransferasa) usa acetil-CoA como donador de grupos acilos y se considera la principal ruta de biosíntesis de TAGs. (B) PDAT (Fosfolípido.diacilglicerol aciltransferasa) utiliza fosfolípidos como donadores de grupos acilos y se cree que está envuelta en el mantenimiento de la composición lipídica de la membrana. (C) DGTA (Diacilglicerol transacilasa) utiliza un segundo DAG como donador de grupos acilos, dando como resultado una molécula de TAG y otra de MAG (Monoacilglicerol). La letra R simboliza a los grupos acilos.

1.4. El biodiésel

1.4.1. Definición y producción

El biodiésel es un combustible diésel derivado de aceites de plantas o animales y que normalmente está compuesto por metil ésteres de ácidos grasos de cadena larga. La composición química detallada, en particular la longitud de las cadenas de los ácidos grasos, dependen de la fuente de aceite utilizada.

En contraste con el petrodiesel, el biodiésel ofrece varias ventajas, ya que es una fuente de energía renovable y biodegradable (se degrada cuatro veces más rápido que el diésel fósil). Gracias a su estado oxigenado produce menos emisiones indeseables durante su combustión (CO, hidrocarburos aromáticos policíclicos, partículas de hollín, óxidos de azufre y nitrógeno, metales). Además, posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste del motor y es un material seguro para su transporte, almacenamiento y manejo debido a su baja volatilidad y elevado punto de inflamación (100-170°C). Asimismo, debido a la similitud de las propiedades físicas y químicas del diésel fósil con las del biocombustible, su uso no requiere de modificaciones en los motores diésel convencionales (*Liu and Zhao, 2007*).

Existen muchos caminos para la producción de biodiésel, pero uno de los más comunes es la transesterificación (*Li et al., 2007; Demirbas, 2008*). La transesterificación o alcoholisis es una reacción química ocurrida entre los aceites (TAGs) y un alcohol, normalmente metanol, para producir glicerol como coproducto y alquil ésteres de ácidos grasos (FAMEs), los cuales son conocidos como biodiésel (Figura 1.9.). La relación molar teórica alcohol/aceite es 3:1, aunque generalmente se usa 6:1 para que la reacción, que es reversible, se lleve a cabo por completo (*Mata et al., 2010*).

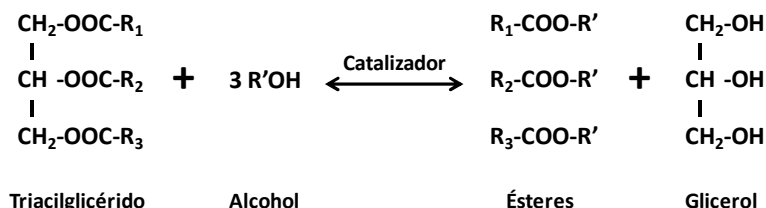


Figura 1.9. Reacción general de transesterificación. R1, R2, R3 y R' son radicales hidrocarburos. Los catalizadores pueden ser álcalis, ácidos o enzimas (lipasas) (Ma and Hanna, 1999; Fukuda et al., 2001; Sharma et al., 2008; Chisti, 2007; Huang et al., 2010).

1.4.2. Fuentes de materia prima

El amplio rango de materias primas disponibles para la producción de biodiésel representa uno de los factores más significativos en este proceso (Janaun and Ellis, 2010; Shahid and Jamal, 2011). La materia prima utilizada para la producción de biodiésel debe cumplir dos requerimientos principales: bajo coste de producción y disponibilidad a gran escala. En general, las materias primas para la producción de biodiésel se pueden dividir en cuatro grupos principales (Pinto et al., 2005; Rashid et al., 2008; Karmee and Chardha, 2005; Kafuku and Mbarawa, 2010; Singh and Singh, 2010; Lim and Teong, 2010; Wang et al., 2011; Ahmad et al., 2011; Silitonga et al., 2011; Juan et al., 2011):

- Aceites vegetales comestibles (Soja, palma, coco, girasol, etc)
- Aceites vegetales no comestibles (*Jatropha curcas*, *Calophyllum inophyllum*, *Pongamia pinnata*, *Ricinus communis*, algas, halófitos, etc)
- Aceites de desecho o reciclados
- Grasas animales (grasa de pollo, coproductos del aceite de pescado, etc)

El uso de aceites vegetales comestibles requiere el uso de enormes extensiones de terreno fértil, lo cual podría conllevar a una crisis alimentaria por la escasez de suelos cultivables (Dismukes et al., 2008; Schenk et al., 2008; Mutanda et al., 2011). El uso de aceites de desecho y de grasas animales supone una alternativa que no ha sido satisfactoria a causa de los gastos adicionales necesarios para el refinamiento y la transesterificación del material (Al-Zuhair, 2007; Liu and Zhao, 2007; Meng et al., 2009). Como consecuencia de esto, se ha planteado el uso de aceites no comestibles, de los cuales, el de microalgas, es el más prometedor.

Muchos artículos científicos describen las ventajas del uso de microalgas para la producción de biodiésel en comparación con otras materias primas disponibles. Se predice que las microalgas son capaces de producir 10 veces más biodiésel por unidad de área de tierra que las plantas terrestres típicamente oleaginosas (Sheehan *et al.*, 1998; Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008b; Hu *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009). Las microalgas poseen muchas ventajas frente a las plantas oleaginosas como son las siguientes: mayor eficiencia fotosintética, eficacia superior en la asimilación de nutrientes, periodos cortos de producción sostenida durante todo el año e independencia de la estacionalidad y de la fertilidad del suelo. Por ello, se pueden utilizar territorios marginales. Además, requieren de menores cantidades de agua y son flexibles ante el tipo y calidad de ésta (Sheehan *et al.*, 1998; Chisti, 2007; Li *et al.*, 2007; Dismukes *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008a; Hu *et al.*, 2008; Rittmann, 2008; Gouveia and Oliveira, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009).

Aunque el biodiésel producido a partir del aceite de microalgas parece ser prometedor, existen desventajas importantes que son necesarias solventar. El mayor problema de este tipo de combustible es el alto coste de producción, que hace que pierda competitividad frente al petrodiesel (Chisti, 2007, Li *et al.*, 2008). Además, la baja productividad en aceites de la mayoría de las microalgas hace que se busquen alternativas de cultivo. Para el aumento de esta productividad es ampliamente conocido que el cultivo de las microalgas en carencias de nutrientes, como por ejemplo el nitrato, hace que se acumule en estas grandes cantidades de aceite. Sin embargo, este tipo de cultivo conlleva a una baja tasa de crecimiento de los mismos. Por todas estas razones, la producción económicamente factible de biodiesel a partir de microalgas necesita de la mejora de todos los puntos del proceso.

Tabla 1.1. Porcentaje máximo de lípidos totales de las microalgas más importantes.
Los valores se representan como porcentaje del total de peso seco.

Especie	% Lípidos (p/p)	Referencia
<i>Botryococcus braunii</i>	86	<i>Brown et al., 1986</i>
<i>Chlorella minutissima</i>	57	<i>Gouveia et al., 2009</i>
<i>Chlorella protothecoides</i>	57,8	<i>Mata et al., 2010</i>
<i>Chlorella sorokiniana</i>	22	<i>Mata et al., 2010</i>
<i>Cyclotella cryptica</i>	37	<i>Chisti, 2007</i>
<i>Dunaliella salina</i>	25	<i>Mata et al., 2010</i>
<i>Ellipsoidion sp.</i>	27,4	<i>Mata et al., 2010</i>
<i>Euglena gracilis</i>	55	<i>Arredonde and Vázquez-Duhalte, 1991</i>
<i>Nannochloropsis oculata</i>	30	<i>Gong and Jiang, 2011</i>
<i>Neochloris oleabundans</i>	65	<i>Gong and Jiang, 2011</i>
<i>Pavlova lutheri</i>	35,5	<i>Rodolfi et al., 2008</i>
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	57	<i>Mata et al., 2010</i>
<i>Scenedesmus sp.</i>	21,1	<i>Rodolfi et al., 2008</i>
<i>Tetraselmis suecica</i>	23	<i>Chisti, 2007</i>

Como se describió anteriormente, el contenido en lípidos de las microalgas varía considerablemente entre especies y puede estar entre un 1% y un 85% aproximadamente del total de su peso seco celular (*Spolaore et al., 2006; Chisti, 2007; Li et al., 2008b*). La composición del perfil de ácidos grasos de las microalgas se va a ver afectado por su ciclo de vida, pero también por las condiciones de cultivo como son, la composición del medio, la temperatura, la intensidad lumínica, la aireación, etc (*Rao et al., 2007; Ota et al., 2009; Guzman et al., 2010*).

Las aproximaciones a la biología de sistemas como la transcriptómica, la proteómica o la metabolómica, se han convertido en esenciales para la comprensión de cómo los microorganismos responden y se adaptan a los cambios en su entorno físico. La aplicación de tales enfoques podría acelerar en gran medida la comercialización de compuestos de alto valor añadido procedente de microalgas, como por ejemplo el biodiésel, proporcionando un marco idóneo para la mejora de cepas de interés.

1.5. Objetivos y organización de la tesis

La creciente demanda mundial en productos de alto valor añadido basados en microalgas, como pueden ser antioxidantes, proteínas recombinantes o biocombustibles, hace necesaria la selección de estirpes mejor dotadas y con mayor capacidad de adaptación, así como su posible manipulación genética. En este sentido hemos planteado los siguientes objetivos para esta tesis doctoral:

- I. El aislamiento de una nueva estirpe de microalga autóctona de la costa andaluza, con mejores características para el cultivo a gran escala.
- II. La mejora de la productividad de los cultivos de *Picochlorum sp HM1* y de su contenido lipídico, mediante la optimización de las condiciones de cultivo de dicha estirpe..
- III. La puesta a punto de la manipulación genética de esta microalga, así como de otras microalgas marinas.
- IV. El desarrollo de una estrategia para incrementar el contenido en lípidos neutros en microalgas mediante ingeniería genética de la ruta de síntesis de TAGs.

Esta tesis está compuesta por una introducción, cuatro capítulos principales y un capítulo último de conclusiones generales. A su vez cada capítulo principal está estructurado en introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, y conclusiones; de tal forma que pueden ser leídos de forma independiente. Esta estructuración tiene el inconveniente de que cierta información puede resultar redundante, sin embargo debido a la variedad de temas tratados y enfoques empleados en los cuatro capítulos principales, se hace deseable dotar a cada capítulo de la independencia necesaria para su óptima comprensión. Según esto, la estructura de la tesis queda de la siguiente forma:

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL, OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

En este capítulo se ofrece una visión general del contexto donde se sitúa la tesis, abordando el plano histórico de la importancia de las microalgas y su transformación genética, así como la ruta de biosíntesis de lípidos.

CAPÍTULO 2: AISLAMIENTO DE UNA NUEVA ESTIRPE DE *PICOCHLORUM SP* Y CARACTERIZACIÓN DE SUS POTENCIALES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

En este segundo capítulo se describe el aislamiento de una nueva estirpe de microalga autóctona de las costas onubenses, así como su identificación molecular y su caracterización fisiológica.

CAPÍTULO 3: OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE CULTIVO Y ENRIQUECIMIENTO EN LÍPIDOS DE LA MICROALGA *PICOCHLORUM SP HM1*

Continuando con el capítulo anterior, en este se pretende mejorar el rendimiento tanto de la biomasa final alcanzada por la microalga, como de lípidos neutros producidos, mediante la optimización de sus condiciones de cultivo.

CAPÍTULO 4: OPTIMIZACIÓN DE LA MANIPULACIÓN GENÉTICA DE *PICOCHLORUM SP HM1* Y OTRAS MICROALGAS MARINAS

Abordamos aquí la puesta a punto de la manipulación genética de microalgas con diferentes promotores heterólogos para su posterior transformación con genes exógenos. Para ello utilizamos las microalgas *Picochlorum sp HM1*, *Tetraselmis suecica* y *Dunaliella salina*, todas ellas microalgas marinas.

CAPÍTULO 5: SOBREEXPRESIÓN DEL GEN DGAT1 DE *ECHIUUM PITARDI* EN LA MICROALGA MODELO *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Por último, el capítulo 5 se establece un método de sobreexpresión de uno de los genes de la ruta de síntesis de TAGs utilizando *Chlamydomonas reinhardtii* como organismo modelo, con el objetivo de aumentar la síntesis de este tipo de lípidos.

Capítulo 2

Aislamiento de una nueva
estirpe de *Picochlorum sp* y
caracterización de sus
potenciales aplicaciones
biotecnológicas

Este capítulo ha sido publicado como:

M. de la Vega, E. Díaz, M. Vila, R. León. Isolation of a New Strain of *Picochlorum sp* and Characterization of Its Potential Biotechnological Applications. *Biotechnology Progress*. 2011; 27(6):1535-154.



Abstract

Selection of new autochthon strains is necessary, and for the moment the best strategy, to find microalgae well adapted to the local climatological conditions, able to simultaneously produce several compounds of biotechnological interest and grow at high rates. We describe the isolation and characterization of a new microalgal strain isolated from the marshlands of the Odiel River in the Southwest of Spain. The new microalga belongs to the genus *Picochlorum* sp, as deduced from the analysis of its 18S rRNA encoding gene, is able to grow at a high growth rate and thrive with adverse conditions. It has an appreciable constitutive level of lutein (3.5 mg g⁻¹ DW) and zeaxanthin (0.4 mg g⁻¹ DW) which is increased to 1.8 mg g⁻¹ DW at high light intensities. This strain is also characterized by a very low level of linolenic acid (3.8% of total fatty acids) and no PUFAs with four or more double bonds. Although the total lipid content is not particularly high, 23% of the dry weight, its fatty acid profile makes of *Picochlorum* sp *HM1* a promising candidate for biodiesel production, and the high content in the carotenoids lutein and zeaxanthin indicates that the microalga could also be a good source for natural eye vitamin supplements, which could be obtained as co-product.

Resumen

La selección de nuevas estirpes autóctonas es necesaria, y por el momento, la mejor estrategia para encontrar microalgas bien adaptadas a las condiciones climatológicas locales, capaces de crecer a altas velocidades y producir al mismo tiempo diferentes compuestos de interés biotecnológico. En este capítulo, se describe el aislamiento y caracterización de una nueva estirpe de microalga aislada de las marismas del Río Odiel en el Suroeste de España. La nueva microalga perteneciente al género *Picochlorum*, como se deduce del análisis del gen que codifica para su ARNr 18S, es capaz de crecer a una alta tasa de crecimiento y sobrevivir a condiciones adversas. Tiene un apreciable nivel constitutivo de luteína ($3,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$) y de zeaxantina ($0,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$), el cual se incrementa hasta $1,8 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$ a altas intensidades lumínicas. Esta estirpe se caracteriza además, por un bajo contenido en ácido linolénico (3.8% del total de ácidos grasos) y por la ausencia de PUFAs de 4 o más dobles enlaces. Aunque el contenido en lípidos totales no es particularmente alto, un 23% del peso seco, su perfil de ácidos grasos hace de *Picochlorum sp HM1* una prometedora candidata para la producción de biodiésel, y el alto contenido en los carotenoides luteína y zeaxantina, indican que la microalga podría ser también una buena fuente natural de suplementos vitamínicos oculares, que se podrían obtener como coproducto.

2.1. Introducción

Las microalgas constituyen un grupo muy diverso de microorganismos fotosintéticos que se distribuyen en un amplio rango de ecosistemas, y contribuyen a un 50% de la fijación global de carbono orgánico (*Field et al., 1998*). La biomasa de algas ha sido tradicionalmente recolectada y consumida en muchos países. En la actualidad más de 5000 toneladas de biomasa seca de microalga por año son producidas y comercializadas con un valor medio de 1,25 millones de euros (*Wijffels et al., 2010*). La biomasa de microalga se explota principalmente en acuicultura, alimentación animal y para la extracción de compuestos de alto valor añadido, que se usan como nutraceúticos o complementos dietéticos para nutrición humana, siendo los carotenoides naturales y los aceites ricos en PUFAs los principales compuestos producidos. La mayoría del mercado de carotenoides corresponde al β -caroteno (*Ye et al., 2008*) y la astaxantina (*Rodríguez-Sainz et al., 2010*), pero existe una demanda creciente de otros carotenoides, tales como la luteína y la zeaxantina, que parecen jugar un papel fundamental en la prevención de enfermedades oculares degenerativas (*Semba et al., 2003*).

En los últimos años, ha surgido un interés creciente en las microalgas como posible materia prima para una tercera generación de biocombustibles renovables, así como para la mitigación de la emisión de gases de efecto invernadero debido a la fijación fotosintética del CO₂. Ha aparecido un asombroso número de revisiones acerca de este asunto (*Wijffels et al., 2010; Tredici, 2010; Mata et al., 2010; Grobbeeelaar, 2010; Singh et al., 2011; Wang et al., 2008; Hu et al., 2008; Chisti, 2007; Sheehan et al., 1998; Li et al., 2008; Amaro et al., 2008*). Sin embargo, en contraste con la producción de nutraceúticos de alto valor añadido o compuestos dietéticos, la comercialización de biocombustibles basados en algas tiene que competir con los precios de los combustibles fósiles y con el biodiésel obtenido de otras plantas de cultivo, como son la colza, la soja, el girasol o la palma. El uso de microalgas puede ser una alternativa sostenible al uso de estas plantas oleaginosas, porque ciertas especies contienen grandes cantidades de aceite, tienen rápidas tasas de crecimiento y permiten el uso de tierras no cultivables y aguas no potables, sin desplazar el cultivo agrario (*Mata et al., 2010; Gouveia and Oliveira, 2009*).

Bajo condiciones estándar, los lípidos constituyen entre un 15-20% del peso seco del alga y son normalmente, lípidos polares

diacilglicéridos (galactolípidos y fosfolípidos), que forman parte de las membranas celular y tilacoidal. Solo bajo condiciones excepcionales de estrés, algunas microalgas acumulan TAGs en glóbulos lipídicos como reserva de fuente de carbono y energía. Otra reserva normal de fuente de carbono y energía en microalgas y plantas superiores es el polisacárido almidón. Estudios recientes sugieren que la incapacidad en la síntesis de almidón en microalgas resulta en un aumento en la producción de lípidos (Wang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Work *et al.*, 2010).

A pesar de que los TAGs son preferibles como fuente de biodiésel debido a su alta proporción de ácidos grasos, su acumulación está normalmente asociada con condiciones de estrés y bajo crecimiento (Wijffels *et al.*, 2010). Otra limitación en el uso de microalgas como fuente de acilglicéridos para la producción de biodiésel es la presencia de un alto porcentaje de ácidos grasos PUFAs como, por ejemplo, el AA, el EPA y el DHA. Estos PUFAs omega-3 tienen un alto valor nutricional, pero son indeseables en la producción de biodiésel, por su pobre estabilidad oxidativa. De acuerdo con la normativa europea (*European Standard EN 14214*), su concentración no puede sobrepasar el 1%. No obstante, en muchas especies de microalgas, estos constituyen entre un 15% y un 22% del total de los ácidos grasos.

A parte de la reducción de costes de cultivo, recogida y procesamiento de las microalgas, la mejora de las estirpes conocidas o el descubrimiento de nuevas estirpes de algas que puedan proporcionar alta productividad de biomasa enriquecida en compuestos deseables son los desafíos más importantes para poder aplicar las microalgas en la producción de productos químicos a granel (Norsker *et al.*, 2011). Una aproximación económicamente factible implicaría, muy posiblemente, la producción de varios compuestos de interés de forma simultánea, acoplado a la mitigación de flujo de CO₂ gaseoso y/o la biorremediación de aguas, además de la utilización de la biomasa residual, siguiendo aproximación de biorefinería (Sialve *et al.*, 2009; Mussgnug *et al.*, 2010; Harun *et al.*, 2010).

La producción de microalgas a gran escala está por el momento restringida a unas cuantas especies. La manipulación genética de microalgas es una estrategia prometedora (León-Bañares *et al.*, 2004), aclamada por muchos como la mejor aproximación para obtener sistemas productores de biodiésel (Gressel, 2008). La sobreexpresión o silenciamiento de ciertos genes en microalgas han permitido la síntesis de nuevos carotenoides (Vila *et al.*, 2008; León *et al.*, 2007), la

producción de nuevas estirpes de microalgas con tamaños de antena reducidos, que son más tolerantes a altas intensidades lumínicas (Melis, 2009), y la reducción de la longitud de las cadenas de los ácidos grasos (Radakovits *et al.*, 2011). Sin embargo, muchos problemas han de ser mejorados en las microalgas transgénicas para poder ser cultivadas a gran escala en el exterior. La mejor microalga en el laboratorio, pierde robustez al ser cultivada en el exterior. En cultivos exteriores, las microalgas se contaminan y comienzan a ser desplazadas en los cultivos por organismos autóctonos. Además el silenciamiento de los transgenes puede ocurrir cuando la presión selectiva se elimina. El rechazo político y social hace, asimismo, muy difícil el cultivo a gran escala de microalgas transgénicas en muchos países. La selección de estirpes autóctonas es por tanto necesaria y, por el momento, la mejor estrategia para encontrar microalgas bien adaptadas a las condiciones climatológicas locales capaces de producir compuestos de interés biotecnológico, a la vez que crecer a altas tasas (Rodolfi *et al.*, 2009; Mutanda *et al.*, 2011).

En este capítulo describimos el aislamiento y caracterización de una nueva estirpe de microalga aislada de las marismas del río Odiel en el suroeste de España. Se han evaluado su productividad bajo diferentes condiciones fisiológicas de laboratorio, y su perfil de ácidos grasos y carotenoides en estas condiciones. Al mismo tiempo, se discutirá su potencial como materia prima para la producción de biodiésel y carotenoides.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Organismos y condiciones de cultivo estándar

El alga usada en este estudio fue aislada de las marismas del río Odiel en Huelva, al suroeste de España. Se recogieron muestras de agua y se distribuyeron en placas de Petri con medio F2 y 1% de agar. Las colonias individuales obtenidas después de subcultivos secuenciales se transfirieron a nuevas placas con medio F2. Las colonias aisladas fueron tratadas con los antibióticos Ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), Cloranfenicol ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) y Kanamicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) para inhibir el crecimiento de posibles bacterias contaminantes. Las placas de Petri se mantuvieron en la cámara de cultivo a 25°C y bajo una irradiancia continua de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los cultivos líquidos se cultivaron en matraces con medio F2 y burbujeado con aire enriquecido

con CO₂ (5% v/v) bajo las mismas condiciones de luz y temperatura descritas. La composición del medio F2 es la siguiente (*Guillard and Ryther, 1962*):

1 ml L ⁻¹ Solución de Trazas		
4,16 gr L ⁻¹		Na ₂ EDTA
3,15 gr L ⁻¹		FeCl ₃ ·6H ₂ O
10 mg L ⁻¹		CuSO ₄ ·5H ₂ O
22 mg L ⁻¹		ZnSO ₄ ·7H ₂ O
10 mg L ⁻¹		CoCl ₂ ·6H ₂ O
180 mg L ⁻¹		MnCl ₂ ·4H ₂ O
6 mg L ⁻¹		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
1 ml L ⁻¹ Solución de Vitaminas		
500 µg L ⁻¹	Cianocobalamina-Vitamina B12	
0,1 gr L ⁻¹	Tiamina-Vitamina B1	
500 µg L ⁻¹	Biotina	
565 µg L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O		
1 gr L ⁻¹ KNO ₃		
En 1L de agua marina fresca filtrada		

Dunaliella salina CCAP 19/18 y *Dunaliella bardawil* UTEX 2538 se obtuvieron de la Colección de Cultivo de Algas y Protozoos (CCAP-Reino Unido) y del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF-Sevilla, España), respectivamente, y se cultivaron en el medio descrito por Johnson y colaboradores (*Johnson et al., 1968*). *Nannochloropsis gaditana* fue amablemente cedida por el Dr. Lubián del Instituto de Ciencias Marinas (Cádiz, España) y cultivada en medio F2. Todas las estirpes de microalgas fueron cultivadas bajo las mismas condiciones de luz y temperatura descritas previamente.

2.2.2. Aislamiento de ADN genómico

Una muestra de 200 mL de cultivo se recogió por centrifugación y el pellet resultante fue resuspendido en 3 mL de tampón de Lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA, 2% SDS). La mezcla se agitó en el vórtex durante 15 min y el ADN genómico fue extraído con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitado con etanol absoluto. El pellet se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 50 µL de tampón Tris 10 mM pH 8. La cuantificación del ADN genómico obtenido se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

2.2.3. Amplificación del gen que codifica el ARNr 18S

Usando el ADN genómico aislado y los cebadores NS1-X y 18L-X (Fawley and Fawley, 2007), se amplificó una región de 1700 pb del gen que codifica para el ARNr 18S. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ L que contenían 1 μ L de ADN genómico, 10 pM de cada cebador, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 U de la ADN polimerasa Taq de Biotools (B&M Labs, Madrid, España), 2,5 μ L del tampón específico para la enzima (conteniendo 2,5 mM $MgCl_2$), y 1% de dimetilsulfoxido (DMSO). La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorff. El programa de la reacción fue el siguiente: 0,5 min a 96°C, 0,5 min a 58°C, y 2 min a 72°C por ciclo, repitiéndose durante 30 ciclos.

2.2.4. Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras para el microscopio electrónico de transmisión (TEM) fueron fijadas con glutaraldehído 1,6% en tampón cacodilato (CB) 0,1 M, pH 7,2 a 4°C durante 1 h. Los especímenes se lavaron dos veces con CB y post-fijados con tetraóxido de osmio al 1% en el mismo tampón durante 1 h a 4°C. Después, se deshidrataron en una serie de diferentes porcentajes de acetona (50-100%) y fueron embebidos en resina Spurr. Se cortaron secciones que se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo al 2%. Las muestras teñidas se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM10.

2.2.5. Determinación del peso seco y conteo de células

Una muestra de 10 mL de cultivo se filtró a través de filtros Whatman GF/F (Whatman International, Maidstone, Reino Unido) pesados previamente y lavada con una solución 0,5 M de formiato amónico. Los filtros se secaron en una estufa a 100°C, enfriados en un desecador y pesados. El peso seco de las muestras se obtuvo mediante el cálculo de la diferencia de peso de los filtros antes y después de filtrar la muestra. Todas las medidas se hicieron por triplicado. El número de células se determinó mediante el conteo de éstas en una cámara de Neubauer usando un microscopio óptico Olympus CX41.

2.2.6. Contenido en lípidos y análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de su composición de ácidos grasos

El contenido en lípidos se determinó mediante el método de Bligh y Dyer (*Bligh and Dyer, 1959*) con pequeñas modificaciones. Se centrifugaron aproximadamente 200 mL de cultivo. Los lípidos se extrajeron del pellet obtenido mediante extracción soxhlet con cloroformo:metanol (2:1) recirculado durante 8 horas, y se cuantificaron gravimétricamente.

La composición de ácidos grasos se determinó usando el método de extracción de lípidos y metilación de ácidos grasos en un solo paso descrito por Garcés y Mancha (*Garcés and Mancha, 1993*). El método consiste básicamente en recoger 50 mL de cultivo por centrifugación y adicionar a este pellet 3,3 mL de una mezcla metanol:tolueno:dimetoxipropano:H₂SO₄ (39:20:5:2) y 1,7 mL de hexano. Para la cuantificación de ácidos grasos, se añadió como estándar interno el ácido nonadecanoico (C19:0). Las mezclas se incubaron a 80°C durante 1 h. Después del calentamiento se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente. Se formaron dos fases. La superior contenía los ácidos grasos metilados (FAMES). Esta fase fue recogida de cada muestra en tubos nuevos y el disolvente se evaporó hasta sequedad con nitrógeno gas. El extracto resultante se resuspendió en 1 mL de hexano y fue analizado por cromatografía de gases en un cromatógrafo HO6890 con detector de espectrometría de masas equipado con una columna capilar TR-CN100 (60 metros de longitud, 0,25 mm de diámetro interno). Se usó helio como gas portador con un flujo de 1 mL min⁻¹. La temperatura del inyector fue 240°C y el programa de temperatura del horno fue: temperatura inicial 185°C (50 min), una rampa creciente de 5°C min⁻¹ hasta 200°C, y una meseta constante de 200°C durante 7 min. El tiempo total del programa fue de 60 min.

2.2.7. Extracción de pigmentos y análisis por cromatografía líquida

Para determinar la composición de carotenoides, 10 mL de un cultivo se centrifugaron y el pellet resultante se extrajo por sonicación en 10 mL de metanol. La mezcla se centrifugó y se recogió el sobrenadante, que se filtró mediante filtros de acetato de celulosa (25 mm, 0,45 µm; VWR International). La separación y análisis cromatográfico de los pigmentos se llevó a cabo en un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) Merck Hitachi con un detector diodo-array como se describió por Young y colaboradores

(Young *et al.*, 1996), usando una columna LiChroCART RP-18 (5 μm ; 250 x 4,0 mm) y un flujo de 1 mL min⁻¹. La fase móvil consistió en acetato de etilo como solvente A, y la mezcla acetonitrilo:agua (9:1) como solvente B. El programa del gradiente aplicado a las muestras fue el siguiente: 0-16 min 0-60% A; 16-30 min 60% A; 30-35 min 100% A. El volumen de inyección fue 100 μL y la detección de los pigmentos se llevó a cabo a 450 nm. Los patrones de los pigmentos fueron suministrados por SIGMA y DHI (Hoershold, Dinamarca).

2.3. Resultados y Discusión

2.3.1. Aislamiento e identificación de una nueva estirpe de *Picochlorum*

La nueva microalga marina aislada de las marismas del río Odiel es una célula pequeña, ligeramente ovoide y no flagelada, con un tamaño de unos 2 μm de diámetro (Figura 2.1.). En la imagen al microscopio electrónico podemos observar la ultraestructura típica de las microalgas verdes con los diferentes orgánulos celulares, como son el cloroplasto (C) y el núcleo (N). Los cuerpos de inclusión blancos corresponden con gránulos de reserva de almidón (SG). La microalga muestra una robusta pared celular y un único cloroplasto con un sistema lamelar bien desarrollado.

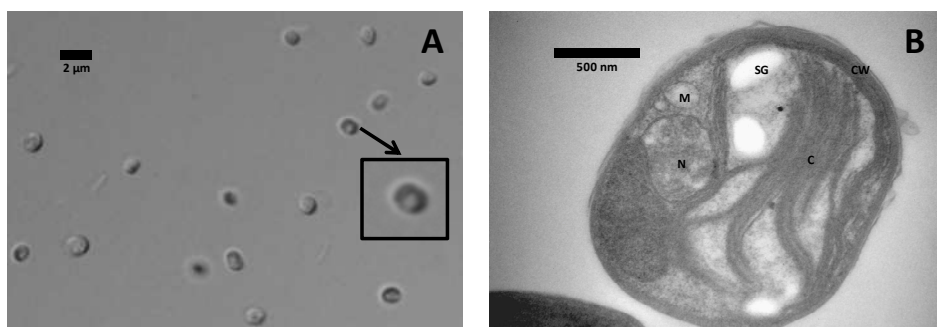


Figura 2.1. Micrografías de microscopio óptico (A) y electrónico de transmisión (B) de *Picochlorum* sp HM1. Se muestran los principales componentes celulares: núcleo (N), mitocondrias (M), glóbulos de almidón (S), cloroplasto (C) y pared celular (CW).

La estirpe fue depositada en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (CCAP, Reino Unido) como *Picochlorum* sp HM1 CCAP 6079/1. La identificación de la estirpe se basó en estudios moleculares.

La amplificación del ADN cromosómico de la nueva estirpe con los cebadores NS1-X y 18L-X dio como resultado una sola banda, cuya secuenciación permitió identificar unas 1700 pb del gen codificador del ARNr 18S. La secuencia de este fragmento fue publicada en la base de datos EBI bajo el número de acceso FR854360 y sometida a análisis de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool/ Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico). La secuencia aislada mostró un alto porcentaje de similitud con secuencias publicadas del gen que codifica para el ARNr 18S de otras estirpes del grupo de las trebouxiophyceae, como se puede observar en el árbol filogenético de la Figura 2.2.

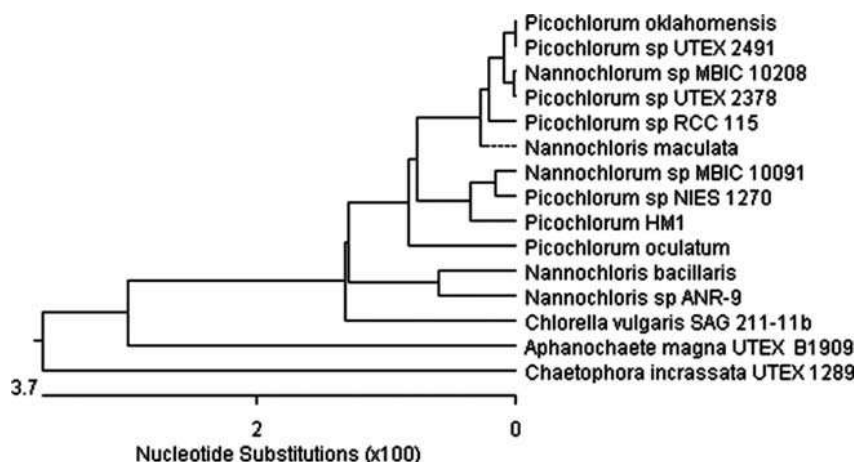


Figura 2.2. Árbol de análisis filogenético de las secuencias de ADN 18S ribosómico de varias microalgas trebouxiophyceae. Las clorofitas *Chaetophora incrassata* y *Aphanochaete magna* han sido también incluidas. El alineamiento de las secuencias fue realizado por el método Clustal W, usando el módulo MegAlign del programa DNASTAR. La longitud de cada par de ramas representa la distancia entre pares de secuencias, mientras que las unidades en el extremo del árbol indican el número de eventos de sustitución. Los números de acceso de las estirpes usadas son: *Picochlorum* sp *HM1* (FR666872); *Nannochlorum* *MBIC10208* (AB058331.1); *Picochlorum* sp *UTEX2378* (AY422076.1); *Picochlorum* *oklahomensis* (AY422073.1); *Picochlorum* sp *UTEX2491* (AY422077.1); *Picochlorum* *RCC115* (AY526738.1); *Nannochloris* *maculata* *MBIC10596* (AB080302); *Nannochlorum* sp *MBIC10091* (AB058309); *Picochlorum* sp *NIES1270* (AB488603.1); *Picochlorum* *oculatum* (AY422075.1); *Chlorella* *vulgaris* *SAG211-11b* (X13688); *Aphanochaete* *magna* *UTEXB1909* (AF182816); *Chaetophora* *incrassata* *UTEX1289* (D86499); *Nannochloris* *bacillaris* (AB080300); *Nannochloris* sp *ANR-9* (AY220081).

El porcentaje de identidad más alto (99%) se observó cuando comparamos el fragmento del ADN 18S de la microalga aislada con otras estirpes de los géneros *Picochlorum*, *Nannochlorum*, y

Nannochloris. Este porcentaje fue menor cuando lo comparamos con otras especies de microalgas de la familia chlorellaceae, como por ejemplo, *Chlorella vulgaris* CCAP 111/11b (96%). La nueva microalga está especialmente relacionada con *Picochlorum* sp NIES 1270 y *Nonnochlorum* sp MBIC 10091, que ha sido recientemente reasignada al género *Picochlorum* (Hanley et al., 2004). Además, un análisis filogenético detallado basado en el ADN 18S ribosómico de un gran número de microalgas relacionadas con el género *Nannochloris* llevado a cabo por Henley y colaboradores (Henley et al. 2004) ha dado lugar a una nueva clasificación taxonómica para estos taxones relacionados. De acuerdo con el análisis filogenético y también con el patrón de división celular y el hábitat de las estirpes estudiadas, estos autores concluyeron que la mayoría de las estirpes marinas previamente asignadas como *Nannochloris* y *Nannochlorum* deberían ser incluidas realmente en el género designado como *Picochlorum*. Entre las estirpes usadas en nuestro análisis comparativo del ADN 18S ribosómico sólo dos auténticas estirpes del género *Nannochloris* han sido incluidas, *Nannochloris bacillaris* y *Nannochloris* sp ANR-9. Ambas mostraron alineamiento en un clado diferente lejos de la nueva microalga aislada. La nueva estirpe se aisló de un hábitat marino y el análisis filogenético basado en el ADN 18S ribosómico la emplaza en el subclado *Picochlorum*, por lo que ésta fue designada como *Picochlorum* sp HM1.

2.3.2. Efecto de las diferentes condiciones de cultivo en el crecimiento de *Picochlorum* sp HM1

La tasa específica de crecimiento de *Picochlorum* sp HM1 ha sido calculada y comparada con los valores correspondientes a otras microalgas marinas con interés biotecnológico, cultivadas bajo las condiciones estándar de cultivo descritas en la sección Materiales y Métodos (Tabla 2.1.). La densidad celular y el contenido en biomasa alcanzado en la fase estacionaria de crecimiento también han sido medidos.

Tabla 2.1. Tasa específica de crecimiento (μ) calculada para *Picochlorum sp HM1* y otras microalgas marinas con interés biotecnológico. Las microalgas se cultivaron en condiciones estándar ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25°C). También se muestran la densidad celular y el contenido en biomasa máxima alcanzado en la fase estacionaria.

Microalga	μ (h^{-1})	Densidad Celular ($\times 10^7$ células mL^{-1})	Biomasa (gr L^{-1})
<i>Dunaliella bardawil</i>	$0,025 \pm 0,0018$	$1,3 \pm 0,09$	$0,86 \pm 0,050$
<i>Dunaliella salina</i>	$0,023 \pm 0,0006$	$1,5 \pm 0,14$	$0,71 \pm 0,016$
<i>Nannochloropsis gaditana</i> *	$0,011 \pm 0,0008$	$5,5 \pm 0,10$	Nd
<i>Picochlorum sp HM1</i>	$0,032 \pm 0,0004$	$4,4 \pm 0,12$	$1,8 \pm 0,040$

Datos obtenidos de Rocha et al., 2003

Las tasas específicas de crecimiento fueron calculadas a partir de la pendiente de la recta en escala logarítmica obtenidas de las curvas de crecimiento de cada microalga mediante la medida de la densidad óptica a 660 nm dependiente del tiempo. *Picochlorum sp HM1* crece más rápido que las especies del género *Dunaliella* y mucho más rápido que *Nannochloropsis gaditana*, usadas normalmente en acuicultura. La biomasa y densidad celular máximas alcanzadas en estado estacionario para *Picochlorum sp HM1* en cultivos por lotes fue de $1,8 \text{ gr L}^{-1}$ PS y $4,4 \times 10^7$ células mL^{-1} , respectivamente. La densidad celular observada para *Dunaliella salina* y *Dunaliella bardawil* en estas mismas condiciones equivale aproximadamente a un tercio de la densidad celular máxima alcanzada por *Picochlorum sp HM1*, mientras que la densidad celular para *Nannochloropsis gaditana* fue ligeramente superior. Todas las microalgas incluidas en la comparación son especies marinas que se cultivaron en su medio óptimo de crecimiento y con las mismas condiciones de luz ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y temperatura (25°C).

Asimismo, se ha investigado el efecto de la temperatura, la luz y la salinidad en el crecimiento de la nueva estirpe aislada *Picochlorum sp HM1*. Un cultivo bajo condiciones estándar ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25°C) se recogió en mitad de la fase exponencial de crecimiento, se resuspendió en medio de cultivo fresco y se subdividió en varios matraces de 1 L. Se evaluó la tasa específica de crecimiento de estos cultivos expuestos a diferentes intensidades lumínicas, temperaturas y salinidades. Los datos se muestran en la Tabla 2.2. La productividad volumétrica, calculada después de 72 h de crecimiento exponencial, se muestra también en dicha tabla. En condiciones estándar, la nueva microalga aislada crece a una tasa específica de crecimiento de $0,031 \text{ h}^{-1}$, con una productividad volumétrica de $0,31 \text{ gr L}^{-1} \text{d}^{-1}$, pero ambos parámetros se ven incrementados a $0,034 \text{ h}^{-1}$ y $0,39 \text{ gr L}^{-1} \text{d}^{-1}$ en

intensidades lumínicas más altas. La comparación de los valores de productividad con datos de la literatura no es fácil ya que la mayoría de los estudios de productividad de microalgas se realizan en cultivos continuos en el exterior y la mayoría de las veces se expresan por unidad de área. Rodolfi y colaboradores (*Rodolfi et al., 2009*), estudiaron la productividad de un gran grupo de estirpes de microalgas en cultivos por lotes en el laboratorio, y encontraron productividades entre 0,04 y 0,37 gr L⁻¹ d⁻¹ para estirpes marinas cultivadas a 25°C y 100 µE m⁻² s⁻¹.

El incremento en la intensidad lumínica causa un ligero aumento en el crecimiento de *Picochlorum sp HM1*. El alga es capaz de tolerar un amplio rango de intensidades lumínicas sin que haya una influencia significativa en su tasa específica de crecimiento, la cual se mantuvo más o menos constante en valores entre 0,031 y 0,034 h⁻¹ para 100 y 1200 µE m⁻² s⁻¹, respectivamente. El crecimiento de *Picochlorum sp HM1* pareció saturarse a valores de intensidades lumínicas relativamente bajos, aunque no se observó fotoinhibición a intensidades lumínicas tan altas como 1200 µE m⁻² s⁻¹.

Tabla 2.2. Efecto de las diferentes condiciones de cultivo en la tasa específica de crecimiento (μ) y en la productividad volumétrica (gr L⁻¹ d⁻¹) calculada después de 72 h de crecimiento exponencial de *Picochlorum sp HM1*.

Condiciones Operacionales	μ (h ⁻¹)	Productividad (gr L ⁻¹ d ⁻¹)
Intensidad Lumínica (µE m ⁻² s ⁻¹)		
100	0,031±0,00070	0,31±0,005
300	0,032±0,00049	0,33±0,002
500	0,033±0,00014	0,36±0,005
1000	0,034±0,00014	0,39±0,002
1200	0,034±0,00042	0,39±0,006
Temperatura (°C)		
15	0,007±0,0008	0,05±0,002
20	0,016±0,0004	0,11±0,002
25	0,031±0,0011	0,31±0,003
30	0,033±0,0004	0,36±0,005
35	0,027±0,0012	0,23±0,006
40	0,016±0,0012	0,11±0,003
Concentración Molar (M)		
0,015 (H ₂ Od)	0,018±0,0016	0,13±0,005
0,085 (12% H ₂ Om)	0,031±0,0038	0,31±0,008
0,140 (25% H ₂ Om)	0,031±0,0007	0,31±0,006
0,275 (50% H ₂ Om)	0,035±0,0005	0,41±0,005
0,490 (H ₂ Om)	0,031±0,0005	0,31±0,003
0,585 (H ₂ Om + 0,1M NaCl)	0,026±0,0003	0,22±0,006
0,765 (H ₂ Om + 0,3M NaCl)	0,023±0,0012	0,17±0,005
0,925 (H ₂ Om + 0,5M NaCl)	0,019±0,0041	0,13±0,005

H₂Od (Agua Destilada), H₂Om (Agua Marina)

La temperatura óptima de crecimiento para *Picochlorum sp HM1* fue 30°C con una tasa específica de crecimiento de 0,033 h⁻¹. La tasa de crecimiento a 25°C fue ligeramente más baja y a 35°C fue sobre un 18% más baja que a temperatura óptima. Las temperaturas de 40°C y 20°C reducen a la mitad la tasa de crecimiento que se obtiene a temperatura óptima y a 15°C el crecimiento es extremadamente bajo.

Para estudiar la influencia de la salinidad en el crecimiento de *Picochlorum sp HM1*, las células fueron recogidas por centrifugación y resuspendidas en medio de cultivo nuevo con diferentes concentraciones salinas. Como control de estándar de salinidad, se preparó un cultivo con medio F2 preparado en agua marina filtrada estéril (0,47 M). Para los estudios de baja salinidad, el medio F2 se preparó en diluciones seriadas, diluyendo dos veces el agua marina en agua destilada cada vez. Así, se obtuvo medio F2 con molaridades de 0,275 M (50% agua marina), 0,14 M (25% agua marina), 0,085 M (12.5% agua marina), y 0,015 M (100% agua destilada). Para los estudios de alta concentración de sal, el medio F2 fue preparado en agua marina suplementada con 0,1, 0,3 y 0,5 M de NaCl con el que se obtuvo medio F2 con molaridades de 0,58, 0,76 y 0,92 M, respectivamente. *Picochlorum sp HM1* puede crecer en agua marina, pero su tasa óptima de crecimiento se obtiene en medio F2 preparado con un 50% de agua marina. Sin embargo, *Picochlorum sp HM1* es capaz de crecer en todo el rango de salinidad probado, incluyendo el medio preparado con agua marina suplementada con NaCl. Para concentraciones molares más bajas de 0,085 M, el crecimiento disminuye drásticamente. Para medios de cultivo preparados en agua marina suplementada con NaCl, la tasa de crecimiento disminuye con el aumento de salinidad. No se observa crecimiento en cultivos con salinidades mayores a 0,92 M (agua marina suplementada con 0,5 M de NaCl). Esta estirpe es idónea para el crecimiento en aguas salobres de marismas con fluctuaciones de salinidad dependientes de las mareas. Además, podría vivir incluso en aguas altamente eutróficas o aguas residuales mezcladas con agua marina.

En condiciones estándar la microalga acumula alrededor de un 20% de su peso seco en lípidos y sobre un 0.75% de su peso seco en carotenoides totales. Éstos son los valores normales que se describen para muchas microalgas, pero análisis adicionales de los perfiles de ácidos grasos y carotenoides de *Picochlorum sp HM1* mostraron características interesantes que no se encuentran en la mayoría de las clorofitas.

La nueva microalga es capaz de crecer a altas tasas de crecimiento y sobrevivir bajo condiciones adversas de cultivo. Se ha descrito que especies muy relacionadas con este género son robustas y dominantes para el crecimiento a gran escala en cultivos exteriores (Cho *et al.*, 2007). Witt y colaboradores (Witt *et al.*, 1981) describieron la adaptabilidad y la rápida tasa de crecimiento en cultivos exteriores de *Nannochloris oculata*, denominada actualmente *Picochlorum oculatum* (Henley *et al.*, 2004), como alimento para acuicultura marina. Algunas estirpes de *Nannochloris*, género muy relacionado con *Picochlorum*, han sido también descritas como tolerantes a altos niveles de CO₂ y NO gas.

2.3.3. Perfil de carotenoides

En la Figura 2.3. se muestra un cromatograma típico de *Picochlorum sp HM1* en el que se señalan los principales pigmentos sintetizados por la microalga bajo condiciones estándar de cultivo. La composición de pigmentos del cultivo de *Picochlorum sp HM1* en fase exponencial de crecimiento se determinó mediante medida de HPLC tal y como se indica en la sección Materiales y Métodos. El carotenoide mayoritario encontrado en esta microalga fue luteína, que alcanzó un contenido intracelular de 3,5 mg gr⁻¹ PS, seguido por neoxantina, violaxantina y β-caroteno, que alcanzaron un contenido intracelular de 12,5, 1 y 0,9 mg gr⁻¹ PS, respectivamente. Además, esta microalga posee un contenido intracelular de 0,4 mg gr⁻¹ de la xantofila zeaxantina en condiciones estándar de cultivo que resulta muy significativo ya que no es normal que aparezca en clorofitas de forma constitutiva, sino en condiciones de estrés normalmente lumínico.

Para investigar el efecto de diferentes condiciones de estrés abiótico en la composición de carotenoides de la microalga, se recogió un cultivo de *Picochlorum sp HM1* en fase exponencial de crecimiento, se resuspendió en medio de cultivo fresco y se subdividió en diferentes matraces. Estos matraces se expusieron a las condiciones indicadas anteriormente de intensidad de luz y salinidad y, además, a carencia de nitrato. Después de 24 h de crecimiento en estas condiciones, se extrajeron los carotenoides totales con metanol y su composición fue determinada mediante HPLC (Figura 2.4). La exposición a alta intensidad lumínica induce a un fuerte descenso en el contenido de violaxantina, mientras que la zeaxantina se ve extraordinariamente incrementada hasta alcanzar un contenido de 1,8 mg gr⁻¹ de peso seco. La producción de zeaxantina fue también estimulada, aunque en menor medida, por otras condiciones de estrés como son la alta salinidad o la carencia de nitrato.

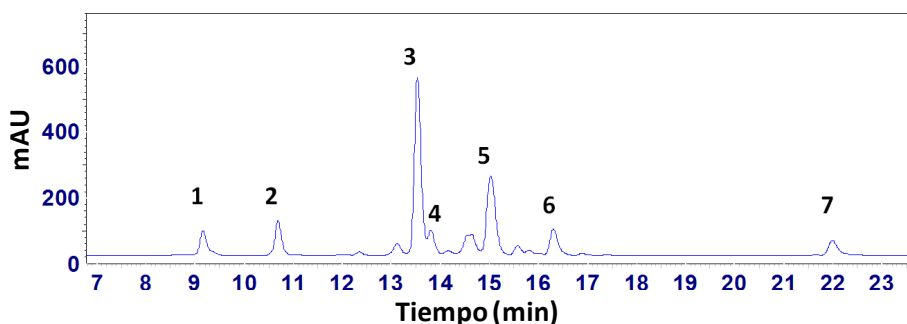


Figura 2.3. Cromatograma de HPLC típico de los pigmentos de *Picochlorum* sp HM1, cultivada bajo condiciones estándar ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25°C). Neoxantina (1), Violaxantina (2), Luteína (3), Zeaxantina (4), Clorofila b (5), Clorofila a (6) y β -Caroteno (7).

El hecho de que el contenido en zeaxantina de *Picochlorum* se vea incrementado bajo diferentes condiciones de estrés es debido al bien conocido Ciclo de las Xantofilas, ciclo que opera en la mayoría de las microalgas y plantas superiores, catalizando la conversión de violaxantina a zeaxantina bajo condiciones de estrés (Baroli *et al.*, 2000; Demming-Adams *et al.*, 1996). No obstante, el alto contenido de zeaxantina de forma constitutiva en células no estresadas de *Picochlorum* es muy interesante. Bajo condiciones normales, la zeaxantina no es detectable en la mayoría de las estirpes de clorofitas, como por ejemplo *Chlamydomonas reinhardtii* (Niyogi *et al.*, 1997) o *Chlorella zofingiensis* (Del Campo *et al.*, 2004). Sólo cuando están sujetas a condiciones de estrés, el contenido de zeaxantina se ve incrementado en estas algas a $0,2$ o $0,3 \text{ mg gr}^{-1} \text{ PS}$. Por lo contrario, *Picochlorum* sp HM1 tiene un nivel constitutivo de zeaxantina apreciable ($0,4$ - $0,5 \text{ mg gr}^{-1} \text{ PS}$), que se ve incrementado hasta $1,8 \text{ mg gr}^{-1} \text{ PS}$ a altas intensidades de luz y en otras condiciones de estrés (Figura 2.4.).

La zeaxantina es, junto con la luteína, un componente esencial de los pigmentos presentes en la mácula lútea en la retina del ojo (Alves-Rodrigues *et al.*, 2004; Whitehead *et al.*, 2006). Muchos estudios han demostrado que la ingesta diaria de estos dos carotenoides esenciales (que no pueden ser sintetizados por los humanos) reduce el riesgo de padecer enfermedades oculares crónicas, entre las que se encuentran la degeneración macular asociada a la edad (AMD) y las cataratas (Carpentier *et al.*, 2009). Mientras que la luteína es un carotenoide común encontrado en la mayoría de las frutas y vegetales, la zeaxantina está presente en la mayoría de éstas sólo en una muy pequeña cantidad (Ribaya-Mercado *et al.*, 2004). Una microalga con un

alto contenido en ambos carotenoides podría ser una buena fuente natural de suplementos vitamínicos para la visión.

Actualmente la mayor fuente de luteína son los pétalos de la flor de la caléndula (*Tagetes erecta* y *Tagetes patula*) (Ausich et al., 1997), que poseen alrededor de un 0,3% de luteína. Muchas microalgas clorofitas, como por ejemplo *Muriellopsis*, con altos contenidos de este pigmento, han sido propuestas como fuente natural de luteína (Del Campo et al., 2007). Sin embargo, la producción de zeaxantina por la caléndula o por microalgas clorofitas es muy pobre. La zeaxantina se acumula constitutivamente en cianobacterias, las cuales son carentes de un ciclo de las xantofilas activo como el que ocurre en plantas superiores y algunos grupos de microalgas como las eustigmatofitas y las rodofitas. No obstante, todos estos grupos de microalgas, al igual que las cianobacterias, carecen de luteína. *Picochlorum* sp *HM1* con un alto contenido de ambos pigmentos, zeaxantina y luteína, podría ser una buena fuente natural de suplementos vitamínicos usados para el tratamiento y prevención de enfermedades oculares.

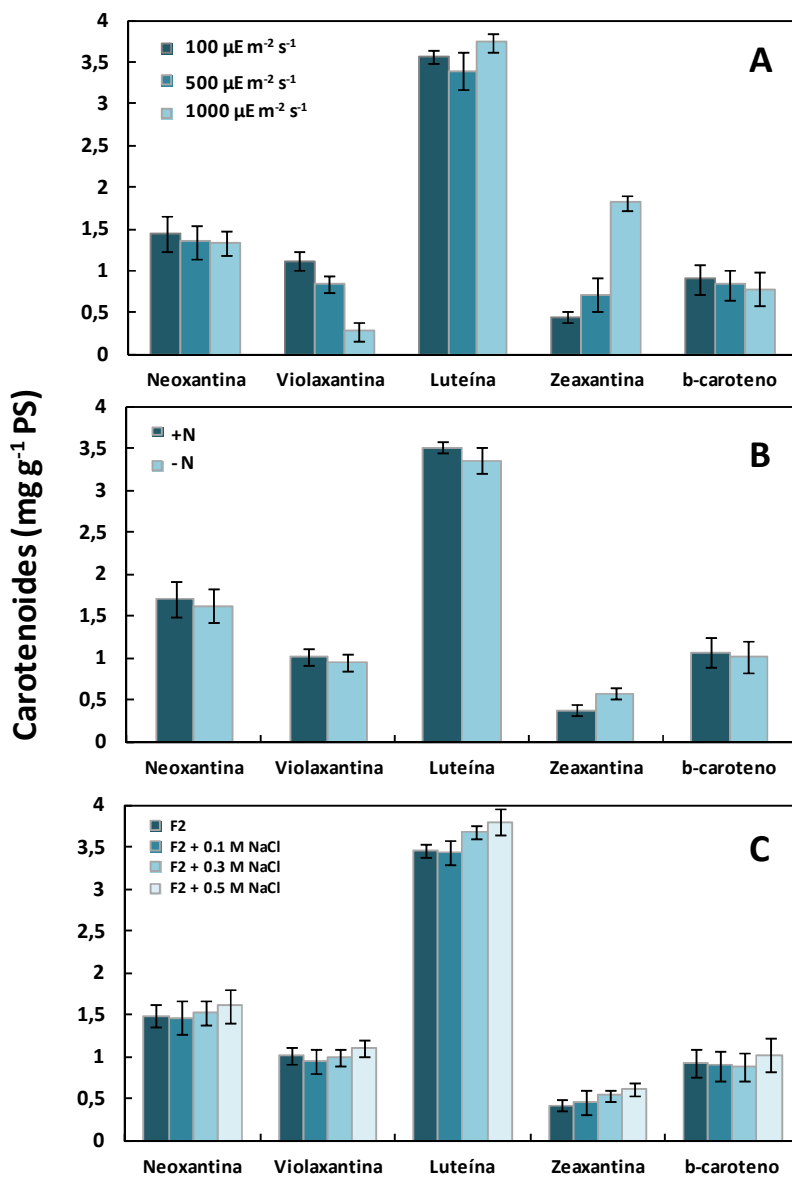


Figura 2.4. Efectos de la intensidad lumínica (A), carencia de fuente de nitrógeno (B) y salinidad (C) en el contenido de carotenoides de *Picochlorum sp HM1*. El contenido de carotenoides fue determinado cromatográficamente después de 24 horas de crecimiento en intensidades lumínicas de 100, 500 y 1000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A); a 10 mM de nitrato y en ausencia de fuente de nitrógeno (B); y en medio F2 preparado con agua marina filtrada, suplementada con 0,1, 0,3, y 0,5 M de NaCl (C). Todos los datos son la media de medidas obtenidas por duplicado y el resultado de al menos dos experimentos independientes idénticos.

2.3.4. Contenido en lípidos

El escrutinio más importante de microalgas para la producción de biodiésel se llevó a cabo por el US-DOE (Sheehan *et al.*, 1998). Estudiaron alrededor de 300 especies seleccionadas de entre 3000 estirpes aisladas. Más recientemente muchos estudios de investigación para la selección de estirpes y para la inducción de la biosíntesis de lípidos, se están desarrollando (Gouveia *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009; Sydney *et al.*, 2011; Huerlimann *et al.*, 2010).

La mayoría de las estirpes estudiadas en el escrutinio del programa referido anteriormente tienen un contenido basal de lípidos no superior al 20 o 30% del total de su peso seco bajo condiciones estándar de cultivo, pero en algunos casos un extraordinario aumento en el contenido en lípidos se observa cuando las células del alga se ven sujetas a condiciones de estrés, especialmente en situaciones de carencias nutricionales. Por ejemplo, Chisti (Chisti, 2007) describió el incremento en el contenido de aceite de hasta el 50% del peso seco en las estirpes *Phaeodactylum tricornutum* o *Isochrysis sp.*, y cerca de un 80% en *Nannochloropsis sp.* o *Cylindrotheca sp.* Desafortunadamente, en la mayoría de los casos, el incremento en el contenido de aceite no conduce a un incremento de la productividad total de aceite, porque las condiciones que inducen la acumulación de lípidos causan normalmente un descenso en el crecimiento celular.

Para determinar el contenido total de lípidos en la nueva microalga *Picochlorum sp HM1* bajo diferentes condiciones, cultivos bajo condiciones estándar se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en medio fresco y se expusieron a alta intensidad lumínica ($1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), alta temperatura (35°C) y a carencia de nitrógeno (datos no mostrados). El contenido en lípidos de un cultivo control cultivado bajo condiciones estándar ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 25°C) también se determinó. Después de 24 h bajo las condiciones descritas, 200 mL de cada muestra se recogieron por centrifugación y se determinó el contenido en lípidos por extracción soxhlet y cuantificación gravimétrica, como se describe en la sección Materiales y Métodos. El contenido en lípidos fue en todos los casos entre el 20 y el 23% de su peso seco. La alta irradiancia, la alta temperatura y la carencia de nitrógeno no tuvieron prácticamente ningún efecto sobre el contenido total en lípidos, al menos bajo estas condiciones de cultivo.

Según las condiciones de cultivo, el contenido en lípidos descrito en la literatura para la mayoría de las microalgas, es bastante variable.

Para muchas especies del género *Nannochloris*, muy relacionado con el género *Picochlorum*, se ha descrito que el contenido en lípidos varía entre el 20 y el 35% de su peso seco (Chisti, 2007; Takagi et al., 2000). Para otras algas trebouxoficeas, como los del género *Chlorella*, se han observado contenidos basales en lípidos de 19,3% (*Chlorella sorokiniana*), 18,7% (*Chlorella* sp), o 18,4% (*Chlorella vulgaris*) (Rodolfi et al., 2009), que son muy cercanos al 21% observado para *Picochlorum* sp HM1.

2.3.5. Perfil de ácidos grasos

Existe una gran cantidad de información disponible a cerca de la composición de ácidos grasos de microalgas, que se ha obtenido en su mayoría para evaluar el valor nutricional de estos organismos para la acuicultura (Zhukova et al., 1994; Renaud et al., 1999) o incluso para el uso como indicador taxonómico (Mourente et al., 1990). Sin embargo, el género *Picochlorum* no ha recibido mucha atención.

Con la finalidad de analizar la composición de ácidos grasos de la microalga *Picochlorum* sp HM1 y compararlo con el perfil de ácidos grasos de otras microalgas, se recogieron muestras en mitad de la fase exponencial de crecimiento de *Nannochloropsis gaditana*, microalga de la familia de las eustigmatoficeas, y la nueva microalga aislada *Picochlorum* sp HM1. A estas muestras se les realizó después el proceso de extracción-metilación de ácidos grasos en un solo paso. Los ácidos grasos metilados (FAMES) obtenidos se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). El contenido total de ácidos grasos de *Picochlorum* sp HM1 es de 106 mg g⁻¹ PS, que representa un 10% del total de la biomasa seca y sobre la mitad del total de lípidos. La abundancia relativa de ácidos grasos de la microalga, expresados como porcentaje del total de ácidos grasos, se muestran en la Tabla 2.3. Para comparar, se incluyeron los perfiles de ácidos grasos del aceite de girasol, de palma y de soja, normalmente usados para la producción de biodiésel (Akbar et al., 2009).

Como se puede deducir de la Tabla 2.3., para *Picochlorum* sp HM1 alrededor del 32% de los ácidos grasos son saturados y sólo un 4,8% son monoinsaturados, como por ejemplo el ácido palmitoleico (C16:1) o el ácido oleico (C18:1). Ácidos grasos con dos dobles enlaces como el ácido hexadecadienoico (C16:2) y el ácido linoléico (C18:2) están presentes en una gran proporción, alrededor de un 60% del total de los ácidos grasos. Además, la microalga posee un valor muy bajo (3,8%) de ácido linolénico (C18:3) y carece de ácidos grasos con cuatro o

más dobles enlaces, lo que es característico de la mayoría de las microalgas clorofitas. La otra microalga analizada es muy rica en ácido eicosapentanoico (C20:5) con valores de 22%. Este ácido graso fue indetectable en *Picochlorum sp HM1*. El contenido en ácido linoléico (C18:2) es bastante alto en *Picochlorum sp HM1* (42%) comparado con otras clorofitas, pero mucho más bajo que el valor descrito para los aceites de girasol (66,2%) o soja (53,2%). La ausencia de PUFAs altamente deshidrogenados sugiere que el perfil de ácidos grasos de *Picochlorum sp HM1* es más adecuado para la producción de biodiésel que para aplicaciones alimentarias, al contrario que el perfil de *Nannochloropsis gaditana*, conocida por ser una de las microalgas más usadas para la alimentación en acuicultura.

El grado de insaturación de los ácidos grasos es particularmente importante ya que determinará la estabilidad oxidativa de los aceites. La insaturación de un aceite o de un ácido graso está determinada por el Índice de Yoduro, que de acuerdo con las normativas europeas EN14214 no debería de sobrepasar un valor de 120 gr de yodo por cada 100 gr de biodiésel. Usando la ecuación empírica propuesta por Krisnangkura (*Krisnangkura, 1986*), y así como los porcentajes de los ácidos grasos determinados para los aceites obtenidos de diferentes microalgas, se ha calculado el índice de yoduro teórico del biodiésel obtenido para estas microalgas. Seguidamente, se ha comparado con el índice obtenido de las plantas oleaginosas típicas (Tabla 2.3.). El índice de yoduro obtenido para *Picochlorum sp HM1* es de 120,5. Este valor es muy cercano a lo que se estipula en la normativa europea, y es más bajo que el índice obtenido para los aceites de girasol y soja así como mucho más bajo que el estimado para otras microalgas verdes.

Tabla 2.3. Composición de ácidos grasos, expresada como porcentaje del total de ácidos grasos (%), y el índice de yoduro de las microalgas *Nannochloropsis gaditana* y *Picochlorum sp HM1*, y del aceite de las plantas superiores girasol, soja y palma, las cuales se utilizan actualmente para la producción de biodiesel.

Ácido Graso	<i>N. gaditana</i>	<i>Picochlorum sp HM1</i>	Girasol *	Soja *	Palma *
C12:0 (Ác Láurico)	0,56				0,2
C14:0 (Ác Mirístico)	6,45	0,42		0,1	1,1
C15:0 (Ác Pentadecanoico)	0,37	0,29			
C16:0 (Ác Palmítico)	33,66	32,15		11,0	44,0
C16:1 (Ác Palmitoleico)	27,45	1,29			
C16:2 (Ác Hexadecadienoico)	0,39	17,33			
C18:0 (Ác Esteárico)	0,20		4,5	4,0	4,5
C18:1 (Ác Oleico)	0,67	3,62	21,1	23,4	39,2
C18:2 (Ác Linoleico)	0,82	43,08	66,2	53,2	10,1
C18:3 (Ác Linolénico)	0,41	3,81		7,8	0,4
C20:0 (Ác Araquídico)			0,3		
C20:4 (Ác Araquidónico)	5,22				
C20:5 (Ác Eicosapentaenoico-EPA)	22,34				
C22:6 (Ác Docosahexaenoico-DHA)					
Ác Grasos Saturados	40,3	32,8	4,5	15,1	49,6
Ác Grasos Mono y Diinsaturados	29,3	62,3	87,3	76,6	49,3
Ác Grasos Triinsaturados	0,4	3,8		7,8	0,4
Ác Grasos Poliinsaturados	28,0				
Índice de Yoduro	204,5	120,5	138,9	138,7	98,6

*Datos tomados de Akbar et al.,2009

El perfil de ácidos grasos de los acilglicéridos encontrados en *Picochlorum sp HM1*, no se ve fuertemente influenciado ni por la intensidad lumínica ni por la temperatura, como se muestra en la Figura 2.5. Altas intensidades lumínicas causan un pequeño aumento en el contenido de ácido oléico y ácido linoleico, así como una ligera disminución en el contenido de ácidos grasos con dos dobles enlaces. Temperaturas lejanas a la temperatura óptima causan un ligero incremento en el contenido de ácidos diinsaturados (ácido hexadecadienoico y ácido linoleico); las altas temperaturas (40°C) causan una disminución en el contenido del ácido linolenico (C18:3), que llega a ser menos del 2% del total de ácidos grasos (Figura 2.5.).

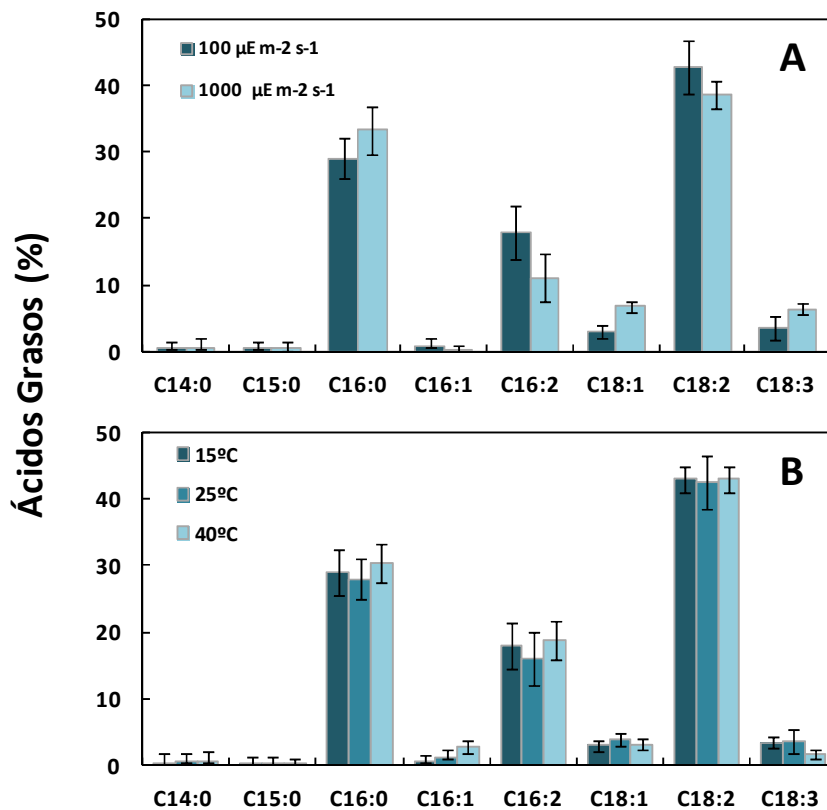


Figura 2.5. Efecto de la intensidad lumínica (A) y la temperatura (B) en el perfil de ácidos grasos de *Picochlorum sp HM1*. Todos los datos están expresados como porcentaje del total de ácidos grasos (%) y son la media de dos réplicas independientes.

La composición de ácidos grasos de los acilglicéridos usados como materia prima para la producción de biodiésel determinarán las características físicas del biodiésel obtenido. El grado de insaturación de los ácidos grasos es particularmente importante, como se ha sugerido ya. El nivel de ácido linolénico (C18:3) no debería sobrepasar el 12% de acuerdo con la normativa europea para el biodiesel. Ésta también establece un máximo de un 1% de ácidos grasos PUFAs con cuatro o más dobles enlaces, pero en la mayoría de las microalgas, este valor es mucho más alto. En *Picochlorum sp HM1*, el 3,8% del total de ácidos grasos corresponde con el ácido linolénico (C18:3) y no se han encontrado PUFAs de cuatro o más dobles enlaces. En otras microalgas como en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, este porcentaje puede alcanzar un 50% del total de ácidos grasos. Esta microalga es, de hecho, la mayor precursora en la producción de ácido eicosapentanoico natural (C20:5) (Acién Fernández *et al.*, 2003). Aunque el porcentaje de insaturaciones en el aceite de microalgas podría ser reducido por hidrogenación catalítica parcial, esto sería un coste adicional.

2.4. Conclusiones

Picochlorum sp HM1 gracias a su tasa de crecimiento y a su habilidad para sobrevivir bajo condiciones adversas, es una buena candidata para el cultivo exterior. Las características de su perfil lipídico hace de *Picochlorum sp HM1* una prometedora candidata para la producción de biodiésel, igual que su alto contenido en los carotenoides luteína y zeaxantina indican que la microalga podría incluso ser una buena fuente natural de suplementos vitamínicos oculares, que se podrían obtener como co-producto. Los ácidos grasos metil-ésteres obtenidos por la metilación del aceite de *Picochlorum sp HM1* son similares a los presentes en el girasol o la soja, y además, su cultivo, como el de otras microalgas, es mucho más productivo por área que el de plantas superiores. No obstante, para que una producción de biodiésel basada en el cultivo de esta microalga sea económicamente factible, el contenido en lípidos y la tasa de crecimiento a altas intensidades lumínicas deberán ser significativamente incrementados. Un mecanismo sencillo de inducir la floculación de estas pequeñas microalgas deberá ser también estudiado. Esta microalga puede ser una buena base para la mejora tanto por mutagénesis clásica como por manipulación genética molecular.

2.5. Conclusions

Picochlorum sp HM1 due to its growth rate and its ability to thrive under adverse conditions is a good candidate for outdoor culture. The characteristics of its lipid profile make *Picochlorum sp HM1* a promising candidate for biodiesel production, and the high content in the carotenoids lutein and zeaxanthin indicates that the microalgae could also be a good source for natural eye vitamin supplements, which could be obtained as lipids co-product. The FAMES obtained by methylation of *Picochlorum sp HM1* are similar to those present in sunflower or soybean, and the culture of *Picochlorum sp HM1*, as other microalgae, has much higher productivity per area than higher plants. Nevertheless for an economically feasible biodiesel production process based on this microalga, the lipid content and the growth rate at high light intensity should be significantly increased. An easy mechanism to induce the flocculation of this small microalga should also be desirable. This microalga can be a good basis for further improvement either by classical mutagenic or molecular genetic manipulation.

Capítulo 3

Optimización del método de
cultivo y enriquecimiento en
lípidos de la microalgas
Picochlorum sp HM1



Abstract

In recent years the interest in microalgae has grown as alternative feedstock for production of third generations fuels. In this work the biomass and lipid content of *Picochlorum sp HM1* was investigated under different growing conditions with the aim of improving both parameters. The optimization of operating mode, initial nutrients content and bioreactor diameter allowed increasing up to four times the final biomass achieved for cultures of *Picochlorum sp HM1*. On the other hand, neutral lipid biosynthesis has been induced in this microalga by nutrient starvation and mixotrophic growth. The fatty acid profile has also been enhanced, since levels of saturated and monounsaturated fatty acids are increased whereas levels of diunsaturated and PUFAs are reduced. Therefore, a two-stage culture system is proposed, a first stage of biomass accumulation and a second stage of TAGs biosynthesis induction by nutrient starvation or mixotrophic growth, which will get better quality of oil for biodiesel production and altered fatty acid profile to parameters described in European Standards.

Resumen

En los últimos años ha crecido mucho el interés en las microalgas como fuente alternativa para la producción de combustibles de tercera generación. En este trabajo se ha investigado el contenido en biomasa y lípidos en *Picochlorum sp HM1* bajo diferentes condiciones de cultivo con el objetivo de mejorar ambos parámetros. La optimización del modo de operación, del contenido inicial de nutrientes y del diámetro del bioreactor permitió incrementar hasta cuatro veces la biomasa final alcanzada en cultivos de *Picochlorum sp HM1*. Por otro lado, mediante el cultivo de la microalga en condiciones mixotróficas y carencias nutricionales, se ha inducido la síntesis de lípidos neutros. Del mismo modo, el perfil de ácidos grasos se ve mejorado ya que se observa un aumento de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados y una disminución de los disaturados y PUFAs. Por lo tanto, se propone un sistema de cultivo en dos fases, una primera de acumulación de biomasa y una segunda de inducción de la biosíntesis de TAGs mediante carencia nutricional o crecimiento mixotrófico, con el que se conseguirá mejorar la calidad del aceite destinado a la producción de biodiésel y alterar el perfil de ácidos grasos hacia los parámetros descritos en la normativa europea.

3.1. Introducción

Las microalgas son un grupo de microorganismos con gran atractivo debido a su parecido metabólico con las plantas superiores. Además, su simple estructura y carácter unicelular facilita su cultivo y manipulación genética (Chisti, 2008). Estos microorganismos están siendo objeto de muchos estudios debido a su potencial biotecnológico para la producción de compuestos de interés comercial, como por ejemplo vitaminas, nutraceúticos, vacunas y otros muchos compuestos, pero sobre todo para la producción de combustibles renovables de tercera generación, como el biodiésel, el bioetanol o el biohidrógeno. Las características deseables que deben tener las microalgas utilizadas en estos sectores incluyen una alta tasa de crecimiento, un alto contenido en producto de interés, tolerancia a diferentes condiciones ambientales, resistencia a predadores y virus, y una fácil recolección y extracción de compuestos (Griffiths and Harrison, 2009; Rodolfi et al., 2009; Radakovits et al., 2010). Aunque las microalgas son una fuente única de compuestos de alto valor añadido, sus aplicaciones comerciales están aun limitadas. El punto más crítico en el proceso es la baja productividad que tienen los cultivos tanto en términos de biomasa como de formación de producto (Hejazi and Wijffels, 2004).

El biodiésel ha sido producido hasta ahora a partir de plantas superiores con semillas ricas en aceites, como por ejemplo la soja, la colza, la palma o el girasol. Sin embargo estas plantas también se utilizan para alimentación, por lo que su uso para biocombustibles entra en competencia con la disponibilidad de alimento (Mutanda et al., 2011). El uso de las microalgas para la producción de biodiésel puede ser una alternativa al uso de estas plantas, ya que muchas especies producen elevadas cantidades de aceites (Lam and Lee, 2011). Además, estos organismos crecen a tasas más altas que las plantas y pueden alcanzar altas productividades (Chisti, 2008). Son muchas las ventajas que ofrece el cultivo de microalgas para la producción de biodiésel frente al cultivo de plantas superiores como son que el cultivo de microalgas no compite con la alimentación y se pueden utilizar zonas marginales y sistemas acuáticos para su producción, además de poder utilizar aguas salada y residuales para su cultivo (Chisti, 2008; Gouveia and Oliveira, 2009; Hannon et al., 2010). También reducen las emisiones de CO₂ a la atmosfera gracias a la fijación fotosintética de éste (Chisti, 2007; Wijffels and Barbosa, 2010; Tredici, 2010; Mata et al., 2010). Sin embargo, para que el proceso sea económicamente viable, es

necesario que ciertos aspectos sean mejorados, como son la selección y crecimiento de estirpes de microalgas con altas productividades de biomasa y lípidos (Lam and Lee, 2011; Feng et al., 2011). El máximo rendimiento de lípidos alcanzado por una microalga va a depender del organismo en cuestión, de la localización geográfica de la planta de producción y de las condiciones de cultivo (Hu et al., 2008). Está muy bien descrito que en la mayoría de especies de microalgas el estrés producido por la carencia de algunos nutrientes en el medio de cultivo induce a una acumulación de lípidos neutros, como ocurre por ejemplo con *Chlorella vulgaris* (Stephenson et al., 2010) o *Chlamydomonas reinhardtii* (Siaut et al., 2011). El nitrógeno es el nutriente más crítico para inducir el metabolismo de lípidos neutros en algas.

Cuando las microalgas son sometidas a una deficiencia de nitrógeno, entran en un estado de estrés que induce la acumulación del carbono asimilado por fotosíntesis hasta compuestos de reserva, aumentando el contenido de carbohidratos (especialmente de almidón) o de lípidos (mayoritariamente de TAGs) en las células (Harwood and Jones, 1989; Hu et al., 2008; Feng et al., 2011). Que se acumule un tipo u otro de material de reserva va a depender de la especie de microalga de la que hablemos, por ejemplo Bondioli y colaboradores estudiaron como *Nannochloropsis* sp F&M-M24 acumulaba lípidos y *Tetraselmis suecica* F&M-M33 almidón en condiciones de estrés inducido por carencia de nitrógeno (Bondioli et al., 2012). El aumento de TAGs en respuesta a la carencia de nitrógeno en el medio de cultivo, se ha observado en muchas especies de microalgas (Basova, 2005; Breuer et al., 2012; Jiang et al., 2012; Adams et al., 2013) como por ejemplo *Chlamydomonas reinhardtii* (Cakmak et al., 2012), *Dunaliella tertiolecta* (Chen et al., 2011), *Scenedesmus obliquus* (Ho et al., 2012) o *Nannochloris* sp UTEX LB1999 (Takagi et al., 2000). Estos TAGs son el mejor sustrato para la producción de biodiésel, debido a su alta proporción de ácidos grasos. Aunque la carencia de nitrógeno en el medio es una buena técnica para inducir la acumulación de lípidos neutros en la célula, este método está asociado a una disminución drástica del crecimiento, al no tener la célula una fuente de nitrógeno para la biosíntesis de proteínas.

La inducción de la síntesis de lípidos neutros en microalgas por la carencia de nitrógeno en el medio es debida en gran parte por la alteración en la proporción C:N en el interior celular. Cuando se exponen a las células a una carencia de nitrógeno en el medio, esta proporción aumenta, induciéndose la síntesis de lípidos neutros por la canalización del carbono desde las proteínas (Rodolfi et al., 2009). El

mismo efecto de alteración en la proporción C:N se puede observar cuando un cultivo de microalgas crece con una fuente externa de carbono orgánico, ya que aumenta dicha proporción y esto se vuelve a traducir en una inducción de la síntesis de lípidos neutros (Xiong et al., 2009).

Ya que las condiciones de estrés conducen generalmente a bajas tasas de crecimiento, una producción económica de biodiésel a partir de microalgas requiere una optimización del proceso en dos fases, una primera fase de producción de cantidades altas de biomasa de microalgas, seguida de una aplicación de condiciones de estrés a los cultivos para la inducción de síntesis de TAGs. Esta estrategia ha sido aplicada por varios autores (Ben-Amotz, 1995; Schenk et al., 2008; Rodolfi et al., 2009; Tang et al., 2011).

Existen muchas estirpes de microalgas prometedoras para la producción de biodiésel, como por ejemplo *Chlorella protothecoides* (Campenni et al., 2013), *Nannochloropsis oculata* (Van Vooren et al., 2012), *Scenedesmus obliquus* (El-Sheekh et al., 2012), *Chlorella vulgaris* (He et al., 2013) o *Ettlia oleoabundans* (Yang et al., 2013).

La costa andaluza, con altas irradiancias a lo largo de todo el año y temperaturas moderadas, es un lugar idóneo para el cultivo exterior de microalgas debido a que posee un promedio de 10-12 horas de luz solar al día y un rango de irradiancia de $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en invierno y $1800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en verano. Además de esto, Andalucía cuenta con grandes extensiones de tierra, muchas de ellas usadas como salinas tradicionales, las cuales se encuentran en su mayoría en situación de abandono (García-González et al., 2003).

Picochlorum sp HM1 es una microalga aislada del suroeste de España capaz de crecer en un amplio rango de intensidad lumínica, temperatura y salinidad, además de poseer un perfil de ácidos grasos bastante adecuado para la producción de biodiésel. Sin embargo, el porcentaje de lípidos totales encontrado en esta microalga no es significativamente alto, alcanzando alrededor de un 25% en condiciones estándar de crecimiento (de la Vega et al., 2011). En este trabajo se han planteado dos estrategias diferentes para aumentar el contenido lipídico en *Picochlorum sp HM1*, por un lado el aumento de la biomasa final alcanzada y por otro el aumento del contenido en lípidos neutros de la microalga.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Organismo y condiciones de cultivo estándar

El alga usada en este estudio, *Picochlorum sp HM1*, fue aislada de las marismas del Río Odiel en Huelva, al suroeste de España (*de la Vega et al., 2011*). La microalga se cultivó en líquido en matraces con medio F2 en agua marina diluida $\frac{1}{4}$ con agua destilada y burbujeadado con aire enriquecido en CO_2 (5% v/v), a 25°C y $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La composición del medio F2 es la siguiente (*Guillard and Ryther, 1962*):

1 ml L ⁻¹ Solución de Trazas		
4,16 gr L ⁻¹		Na ₂ EDTA
3,15 gr L ⁻¹		FeCl ₃ ·6H ₂ O
10 mg L ⁻¹		CuSO ₄ ·5H ₂ O
22 mg L ⁻¹		ZnSO ₄ ·7H ₂ O
10 mg L ⁻¹		CoCl ₂ ·6H ₂ O
180 mg L ⁻¹		MnCl ₂ ·4H ₂ O
6 mg L ⁻¹		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
1 ml L ⁻¹ Solución de Vitaminas		
500 µg L ⁻¹	Cianocobalamina-Vitamina B12	
0,1 gr L ⁻¹	Tiamina-Vitamina B1	
500 µg L ⁻¹	Biotina	
565 µg L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O		
500 mg L ⁻¹ KNO ₃		
En 1L de agua marina fresca filtrada diluida $\frac{1}{4}$ en agua destilada		

3.2.2. Determinación del peso seco y de la densidad óptica del cultivo

Una muestra de 10 mL de cultivo se filtró a través de filtros Whatman GF/F (Whatman International, Maidstone, Reino Unido) pesados previamente, y lavada con una solución 1 M de formiato amónico. Los filtros se secaron en una estufa a 100°C , enfriados en un desecador y pesados. El peso seco de las muestras se obtuvo mediante el cálculo de la diferencia de peso de los filtros antes y después de filtrar la muestra. Todas las medidas se hicieron por triplicado. La densidad óptica (D.O.) se midió en un espectrofotómetro con detector ultravioleta-visible Ultrospec 3100pro a 660 nm por triplicado.

3.2.3. Contenido en lípidos totales

El contenido en lípidos se determinó mediante el método de Bligh y Dyer (*Bligh and Dyer, 1959*) con pequeñas modificaciones. Se centrifugaron aproximadamente 200 mL de cultivo. Los lípidos se extrajeron del pellet obtenido mediante extracción soxhlet con cloroformo:metanol (2:1) recirculado durante 8 horas, y se cuantificaron gravimétricamente.

3.2.4. Extracción y análisis de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases-espectrometría de masas

La composición de ácidos grasos se determinó usando el método de extracción de lípidos y metilación de ácidos grasos en un solo paso descrito por Garcés y Mancha (*Garcés and Mancha, 1993*). El método consiste básicamente en recoger 50 mL de cultivo por centrifugación y adicionar a este pellet 3,3 mL de una mezcla metanol:tolueno:dimetoxipropano:H₂SO₄ (39:20:5:2) y 1,7 mL de hexano. Para la cuantificación de ácidos grasos, se añadió como estándar interno el ácido nonadecanoico (C19:0). Las mezclas se incubaron a 80°C durante 1 h. Después del calentamiento se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente. Se formaron dos fases, la superior contenía los FAMES. Esta fase fue recogida de cada muestra en tubos nuevos y el disolvente se evaporó hasta sequedad con nitrógeno gas. El extracto resultante se resuspendió en 1 mL de hexano, y fue analizado por cromatografía de gases en un cromatógrafo HO6890 con detector de espectrometría de masas equipado con una columna capilar TR-CN100 (60 metros de longitud, 0,25 mm de diámetro interno). Se usó helio como gas portador con un flujo de 1 mL min⁻¹. La temperatura del inyector fue 240°C y el programa de temperatura del horno fue: temperatura inicial 185°C (50 min), una rampa creciente de 5°C min⁻¹ hasta 200°C, y una meseta constante de 200°C durante 7 min. El tiempo total del programa fue de 60 minutos.

3.2.5. Determinación del contenido en lípidos neutros por espectrofluorimetría

La determinación del contenido en lípidos neutros del cultivo de *Picochlorum sp. HM1* se llevó a cabo mediante la tinción con Rojo Nilo. Se tiñeron 3 mL de una suspensión celular de *Picochlorum sp HM1* a una densidad celular entre 0,7-0,9 medida en el espectrofotómetro con 10 µL de un stock de Rojo Nilo a una concentración de 2,5 mg mL⁻¹ en

acetona, tras lo que se incubó en agitación durante 5 minutos. El nivel de fluorescencia se midió con un espectrofluorímetro Cary Eclipse de Varian usando una longitud de onda de excitación de 510 nm, un barrido de longitudes de onda de emisión entre 530-800 nm en pasos de 5 nm, y un fotomúltiplo de 700V.

3.3. Resultados y Discusión

3.3.1. Aumento de la biomasa final de un cultivo de *Picochlorum* sp HM1

La evolución a lo largo del tiempo de un cultivo de *Picochlorum* sp HM1 funcionando en modo semicontinuo fue evaluada y comparada con un cultivo en idénticas condiciones de iluminación y temperatura ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25°C) pero operando en modo discontinuo. *Picochlorum* sp HM1 se cultivó bajo condiciones estándar en el laboratorio y se recogió en mitad de la fase exponencial de crecimiento. Se resuspendió en medio de cultivo fresco y se subdividió en dos matraces. Uno se cultivó en modo discontinuo sin aportaciones de medio fresco, mientras que el otro se cultivó en modo semicontinuo, añadiendo la mezcla de las sales que componen el medio de cultivo cada vez que el cultivo entraba en fase estacionaria. Se mantuvo el volumen inicial de cultivo constante para evitar errores debidos a la evaporación. Se observa que el cultivo semicontinuo alcanzaba una biomasa final de más del doble que la alcanzada por el cultivo en discontinuo (Figura 3.1.A). Frente a los $410,5 \text{ mg L}^{-1}$ PS alcanzados en el cultivo discontinuo, se llegó a alcanzar un contenido en biomasa de $837,28 \text{ mg L}^{-1}$ PS en el cultivo semicontinuo.

Con el objetivo de aumentar aún más la biomasa final alcanzada en el cultivo, se investigó también el efecto de la cantidad de nutrientes en el medio inicial (Figura 3.1.B) y el diámetro del reactor (Figura 3.1.C). En el primer ensayo se probaron diferentes cantidades de la mezcla de sales minerales utilizadas como nutrientes en el medio de cultivo para ver su efecto en el crecimiento de la microalga. Los medios de cultivo se realizaron según se describe en la sección de Materiales y Métodos añadiendo 1/2, 1 (Control), 2, 3 y 4 veces las sales utilizada en el medio de cultivo F2. Estos medios de cultivos se inocularon a la misma densidad óptica inicial, se cultivaron en condiciones estándar y se midió el crecimiento hasta alcanzar la fase estacionaria (Figura

3.1.B). Como se observa en la figura 3.1.B, el medio 1/2F2 llegó antes a la fase estacionaria, indicando la limitación de algún componente del medio de cultivo. Además, aumentar los nutrientes del medio de cultivo hasta 4 veces no resultó tóxico para *Picochlorum sp HM1*, que presentaba velocidades de crecimiento iniciales incluso ligeramente superiores que las observadas en el cultivo control. Además, esto permitió prolongar el tiempo de cultivo y alcanzar densidades celulares muy superiores a las del cultivo control. En el caso del medio de cultivo con 4 veces la concentración de nutrientes básicos, se alcanzaron densidades celulares de 931 mg L⁻¹ de peso seco, casi el doble la biomasa alcanzada por el cultivo control con 543 mg L⁻¹.

En el siguiente experimento se llevó a cabo el seguimiento del crecimiento de *Picochlorum sp HM1* en reactores cilíndricos con diferentes diámetros. Un cultivo de *Picochlorm sp HM1* en fase estacionaria, se recogió por centrifugación, se resuspendió en medio fresco y se cultivó en los diferentes bioreactores cilíndricos, de 5,5, 7 y 12 cm de diámetro. Los cultivos se mantuvieron en condiciones estándar, y se siguió su crecimiento. Cada 7 días se añadió a los cultivos en crecimiento la mezcla de las sales minerales del medio de cultivo y se mantuvo el volumen inicial constante para realizar el crecimiento en semicontinuo (Figura 3.1.C).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.1.C. Los cultivos en los bioreactores de 7 y 5,5 cm de diámetro llegaron a una biomasa final mayor que el cultivo en el bioreactor de 12 cm. Esto es debido a que el apantallamiento de unas células sobre otras limita la luz efectiva que recibe el cultivo. El efecto de apantallamiento aumenta con el diámetro del reactor. Resultados similares son descritos por Park y colaboradores (Park et al., 2012). La biomasa final alcanzada por los reactores de 7 y 5,5 cm no muestra diferencia apreciable, lo que concuerda con la baja intensidad luminosa a la que se produce saturación del crecimiento en *Picochlorum sp HM1* (de la Vega et al., 2011).

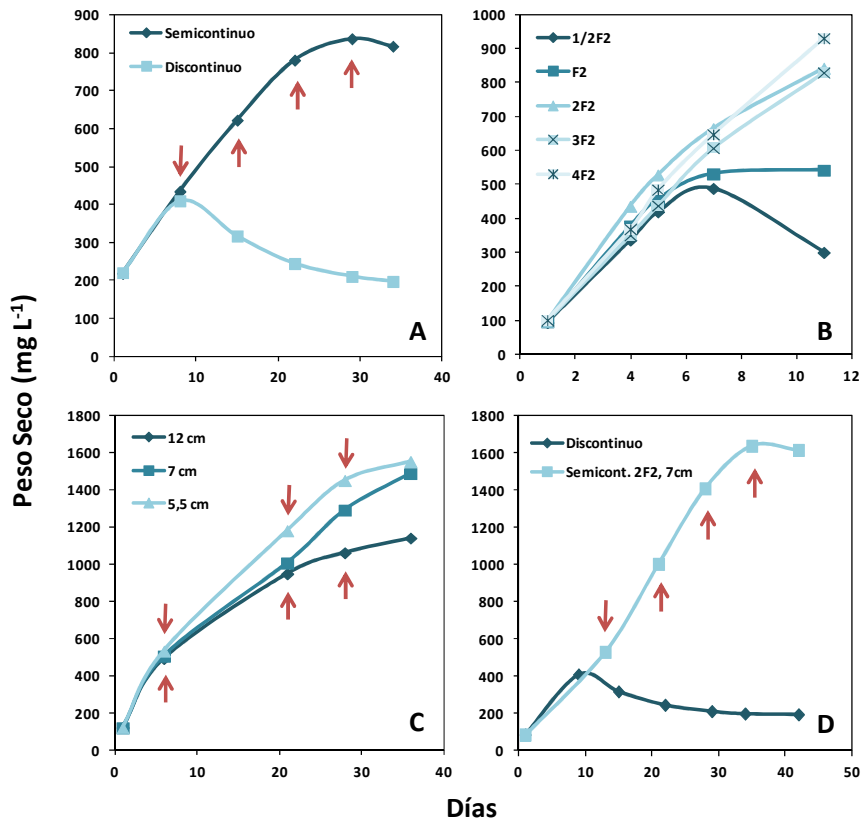


Figura 3.1. Curva de crecimiento de *Picochlorum sp HM1* en diferentes condiciones de cultivo. Comparación de la biomasa final alcanzada por la microalga *Picochlorum sp HM1* cultivada en diferentes modos de operación (A), cultivada en diferentes cantidades de nutrientes en el medio (B) y cultivada en reactores cilíndricos de diferentes diámetros (C). También se muestra una comparación del cultivo control en las condiciones optimizadas (D). Las flechas rojas indican la adición de concentrado de las sales del medio F2 a los cultivos.

Con el objetivo de ver el efecto sinérgico de varios de los parámetros optimizados, se realizó un último ensayo, en el que se comparó el crecimiento del cultivo control en modo discontinuo y medio de cultivo F2, con un cultivo mejorado en crecimiento semicontinuo, bioreactor de 7 cm de diámetro y medio de cultivo 2F2. Para ello, un cultivo en fase exponencial de crecimiento se recogió por centrifugación y se resuspendió en los medios descritos. Ambos se cultivaron en la cámara en condiciones estándar de crecimiento, manteniendo el volumen de cultivo constante. Al cultivo en crecimiento semicontinuo se cambió el medio de cultivo cada 7 días de crecimiento, tiempo que se ha comprobado necesario para que el cultivo se encuentre en fase estacionaria. El ensayo se mantiene varios ciclos

hasta que el cultivo en crecimiento semicontinuo entra en fase estacionaria, probablemente debido a que en ese momento el factor limitante de crecimiento ya es la luz o la acumulación de algún producto desecho tóxico para la célula. El resultado obtenido de este ensayo se muestra en la figura 3.1.D. donde podemos observar que la biomasa final se incrementa de 409 mg L⁻¹ PS obtenido como máximo en el cultivo control, a 1639 mg L⁻¹ PS obtenido como máximo en el cultivo mejorado. Esto supone un incremento de 4 veces más biomasa en el cultivo mejorado que en el cultivo estándar.

3.3.2. Crecimiento y acumulación de lípidos neutros en cultivos con deficiencia de nutrientes

Se ha estudiado el contenido de lípidos totales y ácidos grasos totales de la microalga *Picochlorum sp HM1* cultivada en diferentes condiciones de carencia nutricional. Los nutrientes estudiados han sido el hierro, el azufre (en forma de sulfato), el cobre, el nitrógeno (en forma de nitrato) y el fósforo (en forma de fosfato). Para ello, un cultivo de *Picochlorum sp HM1* en fase exponencial de crecimiento se recogió por centrifugación y se resuspendió en matraces con medio de cultivo F2 con deficiencias de cada nutriente por separado. Los seis cultivos se mantuvieron en la cámara de cultivo y se recogieron al séptimo día para su análisis. Los parámetros medidos fueron el peso seco, el porcentaje de lípidos totales y el porcentaje de ácidos grasos totales. Los resultados se muestran en la tabla 3.1., donde también se muestra el porcentaje de ácidos grasos del total de lípidos. Como se puede observar, el crecimiento de la microalga se ve afectado en prácticamente todos los casos, especialmente en las carencias de nitrato y fosfato, efecto que ha sido documentado por muchos autores (*Hu et al., 2008; Rodolfi et al., 2009*). Este efecto se debe a que el nitrógeno y el fosforo juegan un papel mayoritario en el metabolismo celular como parte de los procesos bioquímicos. El nitrógeno celular es usado principalmente para la biosíntesis de proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos, mientras que el fosforo es principalmente un constituyente de los ácidos nucleicos y los fosfolípidos (*Geider and LaRoche, 2002*). Por ello una deficiencia en la fuente de estos elementos lleva a una disminución en la producción de estas macromoléculas y por consiguiente a una disminución o parada del crecimiento celular. Un dato importante a tener en cuenta es que el cultivo deficiente de sulfato crece prácticamente igual que el cultivo control. Esto puede ser debido a que el azufre es requerido en muy bajas cantidades por lo que probablemente las trazas de azufre

contenidas como impurezas en las otras sales o en el agua de mar son suficientes para satisfacer los requerimientos de azufre de la microalga.

Tabla 3.1. Comparación del peso seco (mg L^{-1}), porcentaje de lípidos totales, porcentaje de ácidos grasos totales y porcentaje de ácidos grasos del total de lípidos, en la microalga *Picochlorum sp HM1* bajo diferentes carencias nutricionales. Los cultivos se recogieron tras 7 días de cultivo en las condiciones de carencia nutricional descritas.

	Peso Seco (mg L^{-1})	% Lípidos Totales	% Ácidos Grasos	% Ácidos Grasos en los LT
Control	444,09±17,67	29,93±7,39	13,17±0,91	43,79±9,62
Hierro -	391,23±67,88	34,90±10,91	11,43±0,84	36,58±13,90
Sulfato -	443,50±21,21	34,15±7,20	14,08±2,02	46,98±16,51
Cobre -	376,51±11,31	30,23±4,26	15,96±0,10	52,19±9,79
Nitrato -	219,12±5,65	25,47±5,17	17,36±0,54	69,97±2,82
Fosfato -	259,53±4,59	29,89±4,02	12,33±1,54	52,92±26,31

No se ha encontrado un aumento significativo del porcentaje de lípidos totales en la microalga bajo ninguna de las carencias nutricionales estudiadas (Tabla 3.1.). Sin embargo en el porcentaje total de ácidos grasos se observan ligeros cambios sobre todo en el cultivo de carencia de nitrato. Podemos observar también como el porcentaje de ácidos grasos del total de lípidos de la célula, aumenta significativamente en carencia de N y de P, lo que indica un aumento relativo de los lípidos con mayor porcentaje de ácidos grasos (TAGs). Estos datos se respaldan con los datos obtenidos para *Tetraselmis suecica* F&M-M33 (Bondioli et al., 2012) y *Chlamydomonas reinhardtii* (La Russa et al., 2012) donde la carencia de nitrógeno no se traduce en un aumento de los lípidos totales, sin embargo aumenta mucho el porcentaje de lípidos neutros presentes en la célula.

Siguiendo con esta misma línea se estudió la cinética de acumulación de lípidos neutros bajo condiciones estándar de cultivo y bajo carencia de nitrógeno y fosforo, tomando éstas como las carencias más significativas en esta microalga. Para ello, un cultivo de *Picochlorum sp HM1* en fase exponencial de crecimiento fue recogido por centrifugación y resuspendido en tres tipos de medio fresco, uno con todos los nutrientes, otro en deficiencia de nitrato y otro en deficiencia

de fosfato. Durante cuatro días se monitorizó su crecimiento y se midió la fluorescencia emitida por los cultivos en presencia de Rojo Nilo.

El Rojo Nilo es un colorante fluorescente soluble en lípidos que se emplea frecuentemente para evaluar el contenido de estos en células animales y microorganismos, como por ejemplo en células de mamíferos (Genicot *et al.*, 2005), bacterias (Izard and Limberger, 2003), levaduras (Kimura *et al.*, 2004), zooplankton (Kamisaka *et al.*, 1999) y microalgas (Elsey *et al.*, 2007). El colorante entra en la célula uniéndose a los lípidos. Es posible diferenciar entre los lípidos neutros y polares mediante la selección precisa de las longitudes de onda de excitación y de emisión. Previamente a este trabajo, se han evaluado diferentes parámetros para la optimización del método. Estos parámetros son las longitudes de onda de excitación y emisión, el rango lineal de la intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de cultivo, la concentración del colorante y el tiempo de incubación con este.

Los resultados obtenidos se cuantificaron como intensidad de fluorescencia relativa a la absorbancia de los cultivos, dato que nos da una medida aproximada del contenido en lípidos neutros (mayoritariamente TAGs) presentes en la célula (Chen *et al.*, 2011). Los resultados se muestran en la figura 3.2. Según se observa en el gráfico, el crecimiento celular en carencia de nitrato se frena drásticamente, sin embargo, en carencia de fosfato la microalga se comporta igual que en el control pero alcanza antes la fase estacionaria. Con respecto a los lípidos neutros, podemos observar como estos se mantienen estables y sin cambios en los tres cultivos, hasta el tercer día en el que se comienza a ver un aumento en la relación U.F./U.A. tanto en los cultivos en carencia de N como de P (Figura 3.2.). Este cambio se ve mucho más acentuado en el cuarto día de carencia, alcanzando valores de 43,80, 99,64 y 87,23 (U.F./U.A) para los cultivos control, nitrato- y fosfato-, respectivamente. Así podemos decir que al cuarto día de carencia nutricional existe una inducción en la síntesis de lípidos neutros, encontrando que el contenido en lípidos neutros es 2,27 veces mayor en el cultivo con carencia de nitrato con respecto al control, y de 2 veces en el caso del cultivo con carencia de fosfato.

Gracias a estos datos podemos decir que aunque la producción de lípidos totales en el cultivo de *Picochlorum sp HM1* no se ve inducida por ninguna carencia nutricional, si podemos inducir el contenido en lípidos neutros que son los más adecuados para la producción de biodiesel.

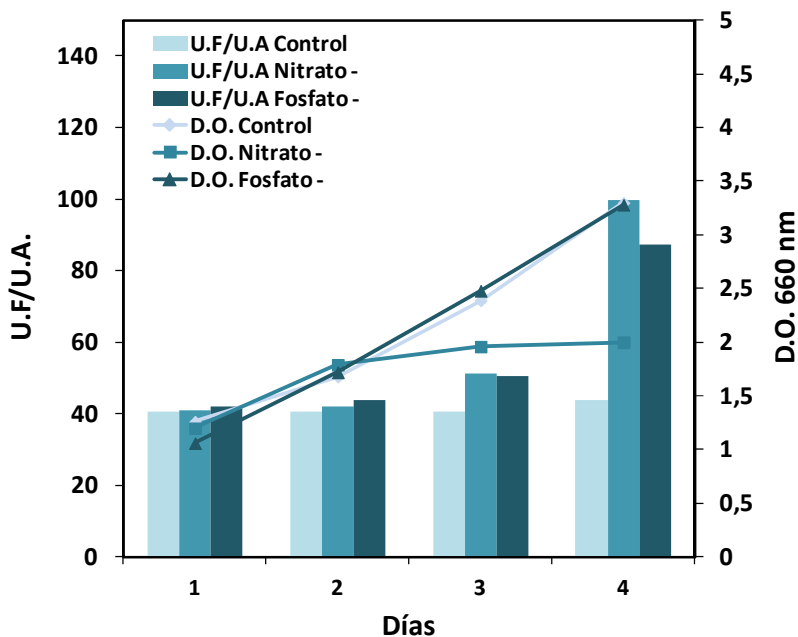


Figura 3.2. Curva de crecimiento y fluorescencia relativa a la absorbancia de *Picochlorum sp HM1* bajo diferentes condiciones de cultivo. La relación unidades de fluorescencia/unidades de absorbancia (U.F./U.A.) representa un valor aproximado de los lípidos neutros presentes en la célula.

Se ha descrito ampliamente que la carencia de algunos nutrientes en el medio de cultivo de las microalgas produce en estas una situación de estrés fisiológico que las lleva a acumular sustancias de reserva como fuente de carbono y energía. Comúnmente, estas sustancias de reserva son el polisacárido almidón o los lípidos neutros en forma de TAGs (Hu et al., 2008; Feng et al., 2011), siendo uno u otro dependiendo de la estirpe de microalga (Hu et al., 2008; Scott et al., 2010; Markou and Nerantzis, 2013). Los TAGs son los lípidos más adecuados para la producción de biodiésel, debido a que en su estructura poseen un alto contenido (% p/p) de ácidos grasos que son los que se utilizan para la transesterificación y producción del biocombustible (Liu and Zhao, 2007; Mata et al., 2010; Scott et al., 2010). Además, no poseen otros constituyentes químicos en su estructura (aparte del glicerol), como ocurre por ejemplo en el caso de los fosfolípidos y glicolípidos (Breuer et al., 2012). Algunas de las carencias nutricionales que inducen la acumulación de lípidos neutros son por ejemplo la carencia de azufre en *Chlamydomonas reinhardtii* (Cakmak et al., 2012) o la carencia de hierro o fósforo en *Dunaliella tertiolecta* (Chen et al., 2011). Sin embargo, el efecto en la carencia nutricional mejor estudiado y más efectiva para inducir la acumulación

lipídica es el debido a la carencia de nitrógeno, el cual se ha descrito para muchas microalgas, como son *Chlamydomonas reinhardtii* (James et al., 2011), *Nannochloris* (Takagi et al., 2000), *Neochloris oleoabundans* (Li et al., 2008) o *Chlorella vulgaris* (Yeh and Chang, 2011). Sin embargo, no se han observado cambios en especies como *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Navicula acceptata* o *Hymenomonas carterae* (Ben-Amotz et al., 1985; Griffiths and Harrison, 2009) bajo este tipo de carencia.

Por otro lado, la limitación de fósforo resulta en un incremento de los lípidos totales en *Pavlova lutheri*, *Nannochloropsis* sp y *Phaedactylum tricornutum*, pero hace decrecer el contenido en lípidos totales en *Nannochloris atomus* y *Tetraselmis* sp (Reitan et al., 1994; Rodolfi et al., 2009). En *Nannochloris* sp el incremento en lípidos bajo carencia de fosfato ocurrió más tarde que con carencia de nitrato (Rodolfi et al., 2009). En muchas microalgas como *Nannochloropsis oculata*, *Parietochloris incisa* o *Gymnodinium* sp, el contenido en TAGs y lípidos se vio incrementado cuando los cultivos pasaron de fase exponencial a fase estacionaria (Bigogno et al., 2002; Mansour et al., 2003; Chiu et al., 2009), lo que indica que la edad celular también puede inducir la síntesis de estos compuestos, probablemente debido a que al llegar a la fase estacionaria la célula comienza a encontrarse en limitación nutricional.

3.3.3. Cambios en el perfil de ácidos grasos en carencias de nitrógeno y fósforo

Para la producción de biodiésel es necesario que los aceites utilizados tengan unas características determinadas, descritas por la normativa europea EN 14214 (European Standard EN 14214). Unos de los parámetros más importantes que determina la estabilidad oxidativa de los aceites es el grado de insaturación de los ácidos grasos que lo componen. Este grado de insaturación viene determinado por el Índice de Yoduro, que de acuerdo con la normativa europea EN 14214 no debe sobrepasar un valor de 120 gr de yodo por cada 100 gr de biodiésel.

Con el objetivo de comprobar cómo afectaban las carencias nutricionales al perfil de ácidos grasos y, por tanto, al Índice de Yoduro, se llevó a cabo el análisis de los ácidos grasos totales de la célula en las diferentes condiciones de cultivo. Para ello, y como se describe en la sección Materiales y Métodos, al cuarto día de la experiencia se tomó una muestra en los cultivos descritos anteriormente de carencia

nutricional de nitrato y fosfato. Se realizó la extracción y metilación simultánea de los ácidos grasos y se analizaron por cromatografía de gases. Los resultados se muestran en la figura 3.3.

En la carencia nutricional de nitrato podemos observar como aumentan en general los ácidos grasos saturados y monoinsaturados y disminuyen los de 2 o más insaturaciones, comportamiento que podemos observar también en la carencia de fosfato pero menos acentuado. Los cambios más importantes en el cultivo carente de nitrato con respecto al control son el aumento del ácido palmítico (C16:0) y ácido oleico (C18:1), de 24,87 % a 31,59 % y de 5,59 % a 11,39 %, respectivamente, así como la disminución del ácido hexadecadienoico (C16:2) y del ácido linoléico (C18:2), de 13,79 % a 9,39 % y de 37,41 % a 29,34 %, respectivamente. En general vemos un cambio de ácidos grasos más insaturados a ácidos grasos menos insaturados. Estos cambios resultan muy favorables de cara a la producción de biodiésel debido a que se necesitan ácidos grasos con pocas insaturaciones en su estructura. El único punto negativo es el aumento del ácido linolénico (C18:3) de un 6,89 % a un 10,61 %. Sin embargo, la normativa europea EN 14214 delimita el porcentaje máximo de este ácido graso en menos de un 12%, valor por encima del obtenido en nuestro caso.

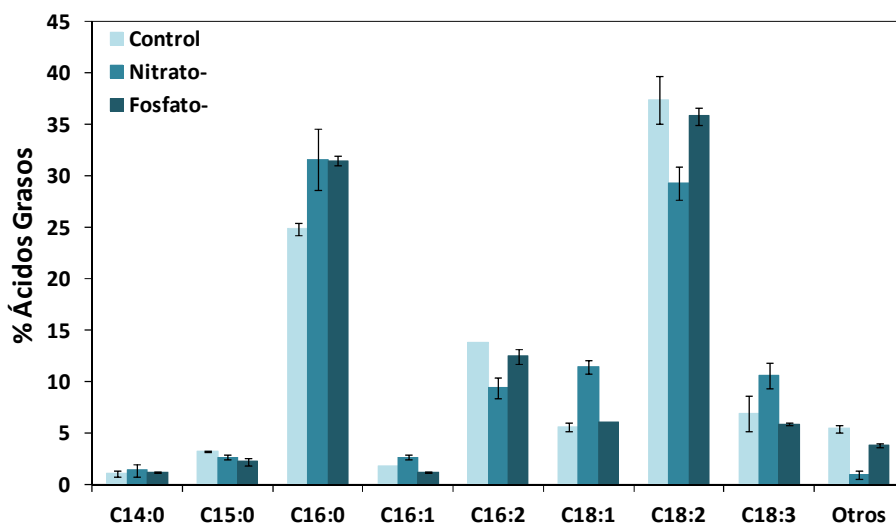


Figura 3.3. Perfil de ácidos grasos de la microalga *Picochlorum* sp *HM1* en condiciones de cultivo control y bajo carencia nutricional de nitrato y fosfato.

En el caso del cultivo carente de fosfato, las diferencias no son tan marcadas pero podemos observar, como cambios más destacados, un aumento del ácido palmítico (C16:0) de un 24,87 % a un 31,51 % y una disminución de los ácidos hexadecadienoico (C16:2) y linoléico (C18:2) de un 13,79 % a 12,48 % y de 37,41 % a 35,83 %, respectivamente. El resto de los ácidos grasos no sufren cambios importantes. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Gong y colaboradores para la microalga *Chaetoceros sp*, *Pavlova viridis*, *Nannochloropsis oculata* y *Phaeodactylum tricornutum* (Gong et al., 2013) que sugiere que la carencia de nitrógeno y fósforo en algunas microalgas inducen la síntesis de más ácidos grasos saturados y monoinsaturados mientras que reduce la formación de PUFA de tres insaturaciones. Además, postula que el aumento de lípidos neutros del total de lípidos en las microalgas oleaginosas puede deberse a que es una característica típica de este tipo de microalgas. Reitan y colaboradores (Reitan et al., 1994) describieron como una carencia de fósforo en la microalga *Gymnodinium sp* (Dinophyceae), resultó en una disminución de EPA y un aumento en el contenido de los ácidos grasos C16:0 y C18:1, sugiriendo que esta limitación nutricional redujo la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados n-3.

Usando los porcentajes de ácidos grasos determinados para estos cultivos y la ecuación empírica propuesta por Krisnangkura (Krisnangkura, 1986), se ha calculado el índice de yoduro del biodiésel que se obtendría a partir del aceite de *Picochlorum sp HM1* bajo condiciones de estrés nutricional. Los resultados obtenidos fueron 111,32 y 111,54 para las carencias de nitrato y fosfato, respectivamente. Este valor es bastante más bajo que el obtenido para el cultivo control, que es alrededor de 119. Como se describe en la normativa europea, este valor no puede exceder de 120, por lo que se concluye que la carencia nutricional del cultivo de *Picochlorum sp HM1* no solo incrementa la síntesis de lípidos neutros, sino que además mejora la calidad del aceite producido con vistas a la producción de biodiésel.

3.3.4. Aumento del contenido de triacilglicéridos en la microalga *Picochlorum sp HM1* mediante crecimiento mixotrófico

La inducción de la síntesis de lípidos neutros que se observa en cultivos con carencia nutricional de nitrato es debida mayoritariamente al aumento que se produce en la proporción C:N en el interior celular, que se traduce en una activación de la ruta de síntesis de lípidos

neutros por la canalización del carbono procedente de la fotosíntesis hasta estos compuestos de reserva celular (Rodolfi *et al.*, 2009). Este mismo efecto de inducción se puede observar cuando a un cultivo de microalgas se le añade una fuente externa de carbono orgánico, ya que también aumenta la proporción C:N y produce una inducción igual en la síntesis de lípidos neutros (Xiong *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2010; Adams *et al.*, 2013). Además de los beneficios en términos de mayor producción de biomasa, también se ha descrito la adición de una fuente de carbono orgánica para la estimulación de la acumulación de lípidos en microalgas (Heredia-Arroyo *et al.*, 2010).

Para comprobar si la adición de una fuente de carbono orgánica induce la acumulación de lípidos se probó el crecimiento de *Picochlorum* *sp* HM1 en condiciones mixotróficas y heterotróficas. Para ello primero se cultivó la microalga *Picochlorum* *sp* HM1 en placas de medio F2 suplementadas con diferentes fuentes de carbono orgánico, siendo éstas sacarosa 100 mM, glucosa 100 mM, glicerol 100 mM y acetato potásico 100 mM. Estas placas se realizaron por duplicado, manteniendo una copia en luz para el crecimiento mixotrófico, y la otra copia en oscuridad para crecimiento heterotrófico, durante dos semanas. En la figura 3.4. izquierda se muestran las placas resultantes de crecimiento mixotrófico con una intensidad lumínica de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. *Picochlorum* no pudo crecer en condiciones heterotróficas con ninguna de las fuentes de carbono orgánico ensayadas. De los cultivos mixotróficos realizados, solo el cultivo con sacarosa sobrevivió, mostrando un crecimiento similar al crecimiento del cultivo control sin fuente de carbono orgánica. El resto de los cultivos murieron, incluyendo los cultivos con glucosa, glicerol y acetato potásico. Esto puede ser debido a que la microalga necesite un proceso de adaptación al crecimiento con fuente de carbono orgánica o simplemente a que estos compuestos produzcan un efecto inhibitorio en el crecimiento como se describe por Liang y colaboradores (Liang *et al.*, 2009), que concluyen que tanto la glucosa como el glicerol pueden resultar tóxicos en algunas estirpes de microalgas. Existen especies capaces de crecer en glucosa pero solo en luz (Liang *et al.*, 2009) como ocurre por ejemplo con *Nannochloropsis salina*, la cual tiene muy buenas productividades de biomasa y lípidos en crecimiento autotrófico pero solo puede crecer en condiciones mixotróficas con glucosa (Wood *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2011).

En la bibliografía se puede encontrar el uso de diferentes fuentes de carbono orgánico para el crecimiento mixotrófico y heterotrófico de microalgas; la glucosa ha sido utilizada para el cultivo

tanto en condiciones mixotróficas como heterotróficas de muchas especies de microalgas (Santos *et al.*, 2011) alcanzando productividades altas tanto en biomasa como en lípidos (Xiong *et al.*, 2010, Wan *et al.*, 2011). Sin embargo la glucosa no se suele utilizar a escala industrial debido a que es un producto bastante caro.

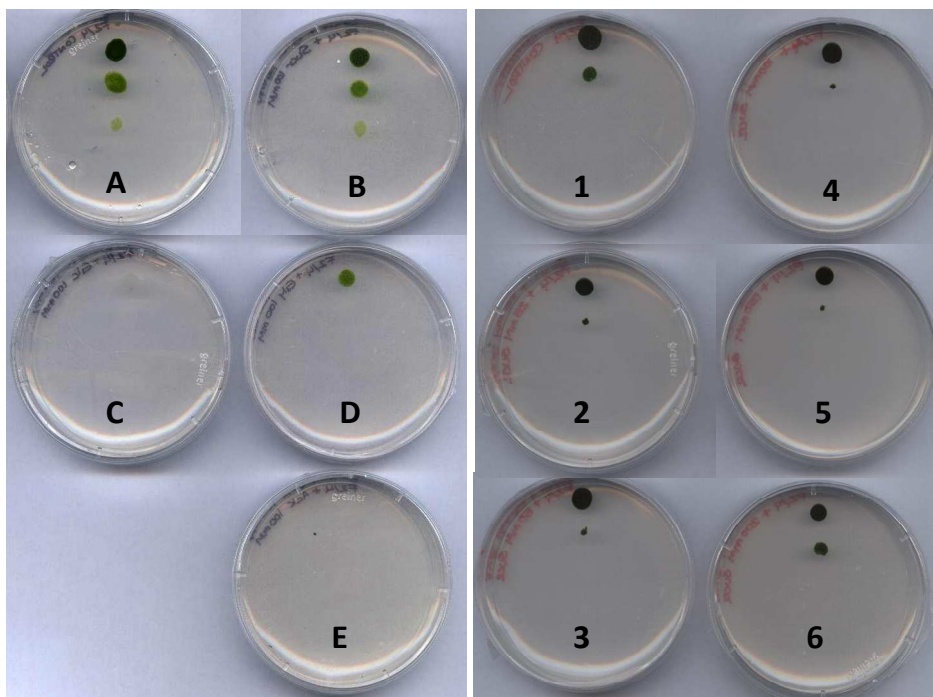


Figura 3.4. Test de gota para el crecimiento mixotrófico en placas de *Picochlorum sp HM1* con diferentes fuentes de carbono orgánico (25°C, 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En la imagen izquierda se observan placas con medio de cultivo F2 sin fuente de carbono orgánica (A), con 100 mM de sacarosa (B), con 100 mM de glucosa (C), con 100 mM de glicerol (D) y con 100 mM de acetato potásico (E). En la imagen derecha todas las placas están hechas con medio F2 pero con diferentes cantidades de sacarosa, sin sacarosa (1), 25 mM (2), 50 mM (3), 100 mM (4), 150 mM (5) y 200 mM (6).

Centrando el trabajo en la sacarosa, como única fuente de carbono orgánica a la que la microalga es capaz de sobrevivir, se estudió a qué concentración de este azúcar vivía mejor *Picochlorum sp HM1*. Se realizaron placas de medio F2 con diferentes concentraciones de sacarosa, 0 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM y 200 mM (Figura 2.3.derecha). La microalga se cultivó en dichas placas y se

mantuvieron en la cámara de cultivo durante dos semanas a las mismas condiciones descritas anteriormente de luz y temperatura. El resultado se muestra en la figura 3.4.derecha. Como se puede observar en la imagen, la microalga crece a todas las concentraciones de sacarosa, siendo en la concentración más alta (200 mM) donde el crecimiento se aprecia mejor, incluso un poco mayor que en la placa control sin sacarosa.

Al igual que el estudio realizado para las carencias de nitrato y fosfato, se midieron diferentes parámetros en un cultivo bajo condiciones mixotróficas de crecimiento con 200 mM de sacarosa. Los parámetros estudiados fueron perfil de ácidos grasos de los lípidos totales, índice de yoduro teórico, porcentaje de lípidos totales, contenido en lípidos neutros (U.F./U.A.) y peso seco, en un cultivo de *Picochlorum sp HM1* en fase exponencial de crecimiento tras 4 días de la adición de la sacarosa.

Tabla 3.2. Comparación del perfil de ácidos grasos de los lípidos totales, índice de yoduro teórico, porcentaje de lípidos totales, contenido en lípidos neutros (U.F./U.A.) y peso seco (mg L⁻¹) en la microalga *Picochlorum sp HM1* en condiciones de cultivo control y suplementado con sacarosa 200 mM, tras 4 días de cultivo.

	Control	Sacarosa 200 mM
C14:0 (%)	1,07±0,24	1,38±0,36
C15:0 (%)	3,21±0,12	1,92±0,85
C16:0 (%)	24,87±0,61	26,16±0,54
C16:1 (%)	1,74±0,02	1,85±0,05
C16:2 (%)	13,79±0,03	14,69±1,48
C18:1 (%)	5,59±0,46	6,17±0,54
C18:2 (%)	37,41±2,34	35,84±3,91
C18:3 (%)	6,89±1,75	7,28±0,45
Otros (%)	5,43±0,33	4,72±0,37
Ac Grasos Saturado (%)	29,15±0,25	29,45±1,75
Ac Grasos Mono y Disaturados (%)	58,52±1,83	58,53±1,83
Ac Grasos Trisaturados (%)	6,885±1,75	7,28±0,45
Indice de Yoduro	119,36±1,02	119,95±2,38
% Lípidos Totales	24,01±1,52	38,56±4,74
Lípidos Neutros (U.F./U.A.)	43,80±7,12	54,33±14,71
Peso Seco (mg L⁻¹)	499,25±12,37	482±56,56

Al final del ensayo, tras cuatro días de la adición de sacarosa, se observa que el peso seco no varía entre el cultivo control y el cultivo en crecimiento mixotrófico, siendo estos de 499,25 y 482 mg L⁻¹, respectivamente (Tabla 3.2.). Tampoco se aprecian diferencias importantes en el perfil de ácidos grasos ni en el índice de yoduro. Datos obtenidos para la microalga *Ettlia texensis* (Isleten-Hosoglu et al., 2013) tampoco mostraron diferencias en el perfil de ácidos grasos bajo cultivo autotrófico, heterotrófico y mixotrófico. Sin embargo, encontramos una variación apreciable en el porcentaje de lípidos totales, de 24,01% en el cultivo control a 38,56% en el cultivo mixotrófico (Tabla 3.2.). Este resultado parece prometedor. El contenido de lípidos neutros medidos mediante fluorescencia del cultivo nos da un resultado de 54,33 U.F./U.A., lo que representa 1,24 veces el contenido en lípidos neutros en el cultivo control, resultando en una mejora pequeña pero importante en el cultivo de la microalga. Existen evidencias de que el cultivo mixotrófico de microalgas puede inducir el aumento del contenido en lípidos neutros de las mismas, como se describió por ejemplo para *Chlamydomonas reinhardtii* cultivada con acetato como fuente de carbono orgánica (Fan et al., 2012), donde se describe como el carbono suministrado a la célula se moviliza hacia la biosíntesis de almidón y TAGs cuando el aporte de éste supera lo que puede ser asimilado fotosintéticamente por la microalga, acumulándose como reserva de energía. Este efecto se ve acusado cuando la microalga se ve expuesta además a una carencia de nitrógeno. Estos datos concuerdan con la hipótesis descrita anteriormente de la estimulación de la síntesis de TAGs por el aumento de la relación C:N en el interior celular.

En este trabajo se ha conseguido mejorar sustancialmente la biomasa final alcanzada en cultivos de la microalga *Picochlorum* sp HM1 modificando factores como son el método de operación de cultivo, el diámetro del reactor o la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo. Uniendo todos estos elementos se ha conseguido obtener un cultivo con 4 veces más biomasa final que la obtenida con un cultivo control de laboratorio. Además, ha sido posible mejorar el contenido final de lípidos neutros de la célula mediante carencias nutricionales y adición de fuente de carbono orgánica. A partir de estas conclusiones y teniendo en cuenta la bibliografía, se podría proponer un sistema de producción industrial en dos etapas. Este sistema ha sido descrito por muchos autores (Ben-Amotz, 1995; Schenk et al., 2008; Rodolfi et al., 2009; Tang et al., 2011; Go et al., 2011), y consiste en una primera etapa de crecimiento autotrófico en condiciones estándar para la

acumulación de biomasa, seguida de una segunda etapa de estrés celular en la que se expone al cultivo a una carencia nutricional o a una adición de fuente de carbono orgánico. Con este sistema se podría conseguir una mejora total de entre 8 y 10 veces el contenido de lípidos neutros en los cultivos sometidos a carencias nutricionales, y de hasta 5 veces en el caso de cultivos suplementados con sacarosa.

3.4. Conclusiones

Se ha optimizado el método de cultivo para la producción de biomasa en la microalga *Picochlorum sp HM1*, mediante cultivo semicontinuo, medio de cultivo con dos veces el contenido en nutrientes y un diámetro de reactor de 7 cm. Estas mejoras han permitido conseguir una biomasa 4 veces mayor que en el cultivo control. Además del incremento en el contenido en biomasa, la carencia de nitrato y fosfato en el medio de cultivo incrementó el contenido en lípidos neutros en 2,27 y 2 veces respectivamente, así como se incrementó el contenido en ácidos grasos saturados y monosaturados. *Picochlorum sp HM1* fue capaz de crecer bajo condiciones de cultivo mixotróficas con sacarosa 200 mM pero no creció con otras fuentes de carbono orgánicas como glucosa, acetato o glicerol. El crecimiento y la producción de compuestos en estas condiciones fueron similares a el cultivo control aunque se incrementó levemente la acumulación de lípidos totales y de lípidos neutros.

El contenido de biomasa de *Picochlorum sp HM1* se vio afectada bajo condiciones de carencia de nitrato y fosfato. Por esta razón es necesario un método de cultivo en dos fases, donde en la primera fase se cultivaría *Picochlorum sp HM1* en condiciones de suficiencia de nutrientes en el medio de cultivo y con las condiciones de cultivo optimizadas en este trabajo para alcanzar una densidad celular alta, seguida de una segunda fase de carencia nutricional o crecimiento mixotrófico para una acumulación lipídica eficiente. Con este método se podrían alcanzar valores de lípidos totales casi 10 veces mayores que el cultivo control. El aceite obtenido de esta manera poseería características idóneas para la producción de biodiésel dentro de las normativas europeas.

3.5. Conclusions

For biomass production, culture method for *Picochlorum sp HM1* was optimized, with feed-batch culture, 2-fold nutrient in culture media and 7 cm diameter bioreactor. These improvements allowed getting a biomass content 4-fold higher than control culture. Beside the increase in biomass content, nitrate and phosphate starvation in the culture media increased the neutral lipid content in 2.27 and 2-fold, respectively, as well as increased saturated and monounsaturated fatty acids content. *Picochlorum sp HM1* was able to growth in mixotrophic conditions with 200 mM sucrose in culture media but didn't growth in others organic carbon sources such as glucose, acetate or glycerol. The growth and compound production in these conditions were similar to control culture but the accumulation of total lipid and neutral lipid showed a slightly increase.

Picochlorum sp HM1 biomass was found to be affected under nitrate and phosphate starvation. For this reason is needed a two-stage cultivation method, where at the first stage *Picochlorum sp HM1* cell must be grown at replete culture media with optimized culture conditions to reach a high cell density, followed by a second stage with nutrient starvation or mixotrophic growth for efficient lipid accumulation. This practice could reach a value of neutral lipids almost 10-fold higher with respect to the control condition. Oil obtained in this way would have ideal characteristics for biodiesel production within the European Standards.

Capítulo 4

Optimización de la
manipulación genética de
Picochlorum sp HM1 y otras
microalgas marinas



Abstract

Transient expression of paramomycin (*APHVIII*) and zeocin (*BLE* and *BLE-int*) antibiotics resistance encoding genes under the control of the NOS, CaMV35S and Hsp70A/RbcS2 heterologous promoters, has allowed the optimization of genetic transformation in the microalgae *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* and, the recently identified, *Picochlorum* sp *HM1*. *Tetraselmis suecica* and *Picochlorum* sp *HM1* were transformed by electroporation. The optimized parameters were the voltage and the number of pulses. *Dunaliella salina* was transformed by bombardment of tungsten particles. The parameters optimized in this case were the rupture-disc pressure and the bombardment distance. No stable transformants have been achieved for either the three microalgae studied.. The higher transformation efficiency was obtained with the construction harboring the Hsp70A/RbcS2 quimeric promoter of *Chlamydomonas reinhardtii*, followed by the construction harboring the NOS promoter, widely used for genetic transformation of higher plants but less exploited in microalgae transformation.

Resumen

La expresión transitoria de los genes de resistencia a los antibióticos paramomicina (*APHVIII*) y zeocina (*BLE* y *BLE-int*) bajo el control de los promotores heterólogos NOS, CaMV35S y Hsp70A/RbcS2 ha permitido optimizar la transformación genética de las microalgas *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* y, la recientemente identificada, *Picochlorum* *sp* *HM1*. Las microalgas *Tetraselmis suecica* y *Picochlorum* *sp* *HM1* se transformaron mediante electroporación y los parámetros optimizados fueron la diferencia de potencial y el número de pulsos. *Dunaliella salina* se transformó mediante bombardeo con partículas de tungsteno. Los parámetros optimizados fueron la presión de ruptura de y la distancia de disparo. En ninguno de los tres casos se han conseguido transformantes estables. La mayor eficiencia de transformación se obtiene con la construcción que incluye el promotor híbrido de *Chlamydomonas reinhardtii* Hsp70A/RbcS2p, seguido por la construcción que contiene el promotor NOS que ha sido muy utilizado en la transformación de plantas superiores pero poco explotado en la transformación de microalgas.

4.1. Introducción

La mejora de las estirpes conocidas para obtener biomasa enriquecida en compuestos deseables con alta productividad, es el desafío más importante a superar para poder aplicar las microalgas en la producción de diferentes compuestos a granel (Norsker *et al.*, 2011). La manipulación genética de microalgas es una estrategia prometedora (León-Bañares *et al.*, 2004), aclamada por muchos como la mejor aproximación para obtener sistemas de producción en plantas industriales (Gressel, 2008), permitiendo la sobreexpresión o silenciamiento de ciertos genes. Esto ofrece varias ventajas, como son el incremento del rendimiento y diversidad de sustancias producidas por microalgas, la mejora no solo de aspectos metabólicos sino también de procesos fisiológicos, la viabilidad económica de procesos que no son económicamente viables actualmente, la producción de proteínas recombinantes, etc.

A pesar del interés biotecnológico de las microalgas, existe un gran contraste con respecto al gran número de bacterias, levaduras y plantas superiores genéticamente modificadas. Actualmente no existen métodos estables para la transformación genética de muchas estirpes de microalgas y la mayoría del trabajo realizado en este campo ha sido llevado a cabo con un par de estirpes, la clorofita *Chlamydomonas reinhardtii* y la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Merchant *et al.*, 2007; Wijffels *et al.*, 2013), pero esto no significa que sean las mejores biotecnológicamente hablando. Diversas revisiones describen de forma exhaustiva las técnicas, promotores y genes marcadores utilizados para la transformación de *Chlamydomonas* (Lumbreras *et al.*, 1998; Fuhrmann, 2001) y otras microalgas (Walker *et al.* 2005a; León and Fernández, 2007).

El problema de la transformación de microalgas viene cuando se intenta trabajar con otras estirpes de las cuales no se encuentra secuenciado el genoma, y por lo tanto es complicado encontrar promotores endógenos. Existen solo algunos casos de microalgas transformadas con promotores endógenos como son *Dunaliella* (Walker *et al.*, 2005a), *Nannochloropsis* (Kilian *et al.*, 2011; Radakovits *et al.*, 2012) u *Ostreococcus* (Corellou *et al.*, 2009). Debido a ello, para estas microalgas se están comenzando a utilizar promotores heterólogos usados normalmente para la transformación de plantas. Por ejemplo, el promotor 35S del ARN del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) ha sido utilizado para la transformación nuclear de *Chlorella ellipsoidea*

(Kim et al., 2002), *Dunaliella salina* (Tan et al., 2005; Feng et al., 2009), *Haematococcus pluvialis* (Teng et al., 2002) y *Nannochloropsis* sp (Cha et al., 2011), aunque con diferente grado de éxito. También se ha descrito otros promotores para conducir la expresión de genes exógenos en microalgas, como son el promotor de la nopalina sintasa (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens* (Hall et al., 1993; Díaz-Santos et al., 2013), el promotor de la ubiquitina de *Zea mais* (Bateman and Purton, 2000; Geng et al., 2003), el promotor SV40 del virus de simio (Teng et al., 2002) o el promotor del virus de *Chlorella*, *Paramecium bursaria* (Ruecker et al., 2008). En la mayoría de los casos la eficiencia de la transformación fue baja o la expresión inestable.

En este trabajo se evalúa la expresión de los genes de resistencia a antibióticos *APHVIII* y *BLE* bajo el control de tres promotores heterólogos diferentes en las microalgas marinas *Tetraselmis suecia*, *Dunaliella salina* y *Picochlorum* sp HM1. Los promotores utilizados son el promotor 35S del ARN del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), el promotor de la nopalina sintasa del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), y el promotor híbrido de *Chlamydomonas reinhardtii* Hsp70A/RbcS2. Los tres promotores han sido fusionados con los genes de resistencia a antibióticos *APHVIII* y *BLE*. En el primer caso se utilizaron las construcciones realizadas en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación (Díaz-Santos et al., 2013) con el gen de resistencia a la paramomicina *APHVIII* que codifica la aminoglicosido 3'-fosfotransferasa aislado de *Streptomyces rimosus*. En el segundo caso, se realizaron construcciones intercambiando el gen *APHVIII* con el gen *BLE*, que codifica para una proteína de unión a bleomicina, donado amablemente por el profesor Saul Purton (University College London). Este último gen codifica para una proteína que confiere resistencia a la bleomicina, zeocina y otros antibióticos relacionados, y ha sido aislado de *Streptoalloteichus hindustanus* (Stevens et al., 1996; Apt et al., 1996).

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Organismos y condiciones de cultivo estándar

Las microalgas usadas en este estudio fueron *Picochlorum sp HM1*, aislada de las marismas del Río Odiel en Huelva, al suroeste de España (de la Vega et al., 2011), *Tetraselmis suecica*, donada amablemente por la estación IFAPA-Aguas del Pino (Huelva) y *Dunaliella salina* (CCAP 19/18) obtenida de la Colección de Cultivo de Algas y Protozoos (Escocia, Reino Unido). El medio de cultivo utilizado para las dos primeras microalgas fue el medio F2, descrito más adelante, y para *Dunaliella salina* se utilizó el medio descrito por Johnson y colaboradores (Johnson et al., 1968). Para el medio F2 se realizaron cultivos líquidos en matraces con agua marina diluida $\frac{1}{4}$ en agua destilada en el caso de *Picochlorum sp HM1* y diluida $\frac{1}{2}$ para el caso de *Tetraselmis suecica*, y se burbujearon con aire enriquecido con CO_2 (5% v/v), a 25°C y bajo una irradiancia continua de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La composición del medio F2 es la siguiente (Guillard and Ryther, 1962):

1 ml L ⁻¹ Solución de Trazas		
	4,16 gr L ⁻¹	Na ₂ EDTA
	3,15 gr L ⁻¹	FeCl ₃ ·6H ₂ O
	10 mg L ⁻¹	CuSO ₄ ·5H ₂ O
	22 mg L ⁻¹	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
	10 mg L ⁻¹	CoCl ₂ ·6H ₂ O
	180 mg L ⁻¹	MnCl ₂ ·4H ₂ O
	6 mg L ⁻¹	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
1 ml L ⁻¹ Solución de Vitaminas		
	500 µg L ⁻¹	Cianocobalamina-Vitamina B12
	0,1 gr L ⁻¹	Tiamina-Vitamina B1
	500 µg L ⁻¹	Biotina
565 µg L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O		
500 mg L ⁻¹ KNO ₃		
En 1L de agua marina fresca filtrada diluida 1/4 o 1/2 en agua destilada		

La estirpe de *Escherichia coli* utilizada para la amplificación del ADN *in vivo* fue DH5α, cultivada en medio LB a 37°C (Sambrook and Russell, 2001).

4.2.2. Prueba de resistencia a antibióticos

La resistencia de *Picochlorum* sp HM1, *Tetraselmis suecia* y *Dunaliella salina* a tres antibióticos diferentes fue evaluada mediante su crecimiento en placas de multipocillos. Se probaron concentraciones crecientes de los antibióticos Paramomicina, Kanamicina y Zeocina. Cultivos en fase exponencial de las tres microalgas, se concentraron 100 veces mediante centrifugación y gotas de 20 μ L de estos cultivos concentrados se sembraron en placas multipocillos conteniendo medio F2 en agua marina diluida 4 veces con agua destilada para *Picochlorum* sp HM1 y diluida 2 veces para *Tetraselmis suecia*. Para *Dunaliella salina* se utilizó el medio descrito por Jonhson (*Johnson et al.*, 1968) con 0,3 M de NaCl, con la finalidad de que el NaCl no interfiera con los antibióticos probados.

4.2.3. Extracción de ADN genómico a pequeña escala

Una muestra de 2 mL de cultivo de cada transformante a analizar se recogió por centrifugación y el pellet resultante fue resuspendido en 300 μ L de tampón de Lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 0,3M NaCl, 5 mM EDTA, 2% SDS). La mezcla se agitó en el Vortex durante 15 min y el ADN genómico se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó con etanol absoluto durante toda la noche a -20°C. El pellet se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 50 μ L de tampón Tris 10 mM pH 8. La cuantificación del ADN genómico obtenido y la medida de su pureza se realizó en un espectrofotómetro NannoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

4.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación por PCR se llevó a cabo a partir de 1 μ L ADN en un volumen total de reacción de 25 μ L que contenía además, 10 pmol de cada cebador, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 U de ADN Taq Polimerasa de Biotools (B&M Labs, Madrid, España), 2,5 μ L del tampón específico 10X de la enzima (que contiene 2,5 mM $MgCl_2$), y 1% de DMSO. El programa de PCR que se siguió fue el siguiente: 0,5 min a 96°C, 0,5 min a la temperatura de hibridación, y 1,5 min a 72°C, todo ello repetido durante 30 ciclos.

4.2.5. Aislamiento de plásmidos

Los plásmidos se aislaron por el método de la lisis alcalina. Se utilizaron 2 mL de cultivo bacteriano en fase estacionaria de crecimiento, que se centrifugaron a 13.000 g durante 1 min. El precipitado se resuspendió en 100 μ L de una solución de resuspensión que contenía: 50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH8, y 10 mM de EDTA. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añaden 200 μ L de una solución de lisis que contenía: 0,1 M de NaOH y 1% de SDS (p/v). Se agitó suavemente varias veces y se incubó 5 minutos en hielo. A continuación, se añadió 150 μ L de una solución de neutralización fría de acetato potásico 5 M a pH 4,8 y se agitó suavemente varias veces. El tubo se centrifugó a 13.000 g durante 10 minutos. El precipitado, con los restos celulares, se descartó y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo donde se realizaron dos extracciones sucesivas; la primera con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1; v/v) y la segunda con cloroformo saturado con H₂O. Por último, se tomó la fase acuosa y se le añadieron 2 volúmenes de etanol al 95% (v/v) para precipitar el DNA. Tras una incubación de 15-20 minutos, se centrifuga 5 minutos a 13.000 g y el precipitado se lava con etanol al 70%. Se centrifugó de nuevo, y el ADN precipitado se secó y se resuspendió en 30 μ L de tampón Tris pH 8.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Prueba de resistencia a antibióticos

Con el objetivo de conocer con qué antibiótico y a qué concentración realizar las transformaciones de las microalgas, se realizaron pruebas de resistencia con tres antibióticos diferentes y a cinco concentraciones. Los antibióticos probados fueron paramomicina, kanamicina y zeocina. Para *Picochlorum sp HM1* se utilizaron concentraciones de paramomicina y kanamicina de 0, 50, 100, 150, 200 y 300 μ g mL⁻¹, y de zeocina de 0, 50, 60, 80, 100 y 150 μ g mL⁻¹. En el caso de *Tetraselmis suecica* las concentraciones utilizadas para los tres antibióticos fueron de 0, 50, 100, 150, 200 y 300 μ g mL⁻¹. Finalmente, para *Dunaliella salina* se utilizaron concentraciones de paramomicina de 0, 30, 50, 100, 200 y 300 μ g mL⁻¹ y de zeocina de 0, 50, 100, 200, 300 y 400 μ g mL⁻¹. Los medios de cultivo utilizados para el ensayo fueron medio F2 con agua marina diluida ¼ en agua destilada

para *Picochlorum sp HM1*, F2 con agua mariana diluida $\frac{1}{2}$ en agua destilada para *Tetraselmis suecica*, y medio de *Dunaliella* con 0,3 M de NaCl para *Dunaliella salina*. Se eligieron estos medios de cultivo debido a que anteriormente se había probado la actividad de los antibióticos con diferentes concentraciones de sal (Datos no mostrados). Con este primer ensayo se comprobó que los antibióticos no eran efectivos a altas concentraciones de sal, como ocurría con el medio F2 para *Picochlorum sp HM1* o *Tetraselmis suecica*, o para concentraciones mayores de 0,3 M de NaCl para *Dunaliella salina*. Esto puede ser debido a que la concentración de NaCl en el medio de selección afecta a la solubilidad de algunos antibióticos, pudiendo ser éstos menos efectivos bajo condiciones de alta salinidad (Falciatore et al., 1999; Zaslawskaia et al., 2000).

Como se puede comprobar en la figura 4.1. el crecimiento de *Picochlorum sp HM1* se inhibe con los antibióticos paramomicina y zeocina a concentraciones de 150 y 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, con el antibiótico kanamicina no hay inhibición del crecimiento celular y además se observa un incremento de éste a medida que aumenta la concentración del antibiótico. Se ha descrito un efecto similar en la dinoflagelada *Prorocentrum minimum*, en la que concentraciones bajas de kanamicina estimulaban el crecimiento celular (Cai et al., 2013).

En *Tetraselmis suecica* se observa un claro efecto inhibitorio del crecimiento con el antibiótico paramomicina a la concentración de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pero sin embargo, con los antibióticos kanamicina y zeocina la inhibición no es tan evidente, observándose solo un empeoramiento del crecimiento a concentraciones de 100 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, pero no una muerte total del cultivo

En el caso de *Dunaliella salina* se realizó la prueba de resistencia a los antibióticos paramomicina y zeocina, viéndose afectado el crecimiento del cultivo solamente en el caso de la zeocina y a concentraciones altas de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de dicho antibiótico. Esta misma concentración del antibiótico zeocina fue usada por Tan y colaboradores (Tan et al., 2005) para inhibir el crecimiento de *Dunaliella salina*. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna referencia en la bibliografía en la que se usara el antibiótico paramomicina como agente de selección para esta microalga.

Con los resultados obtenidos se decidió utilizar el antibiótico paramomicina como agente selectivo para la transformación de *Tetraselmis suecica* y *Picochlorum sp HM1*, y zeocina como agente

selectivo en la transformación de *Dunaliella salina* y *Picochlorum* sp HM1.

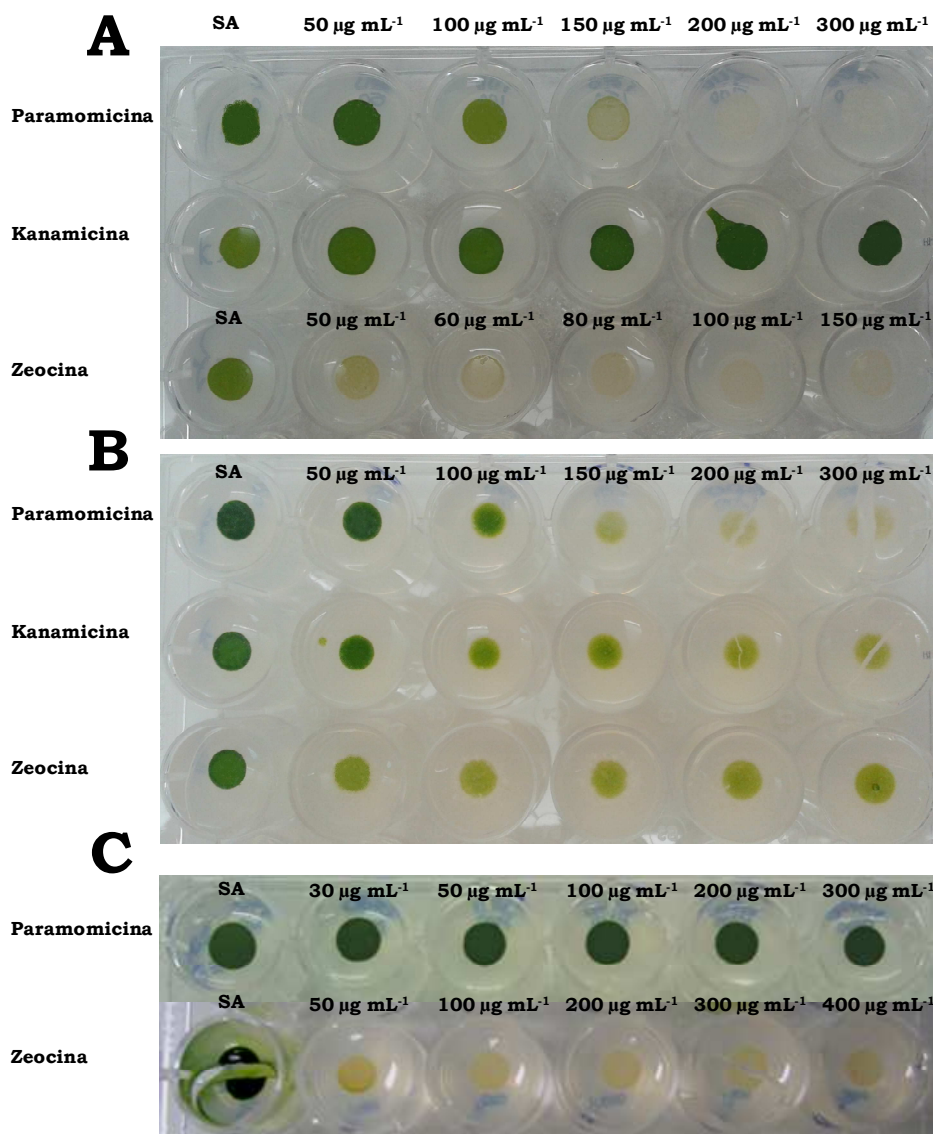


Figura 4.1. Prueba de resistencia a antibióticos de las microalgas *Picochlorum* sp HM1 (A), *Tetraselmis suecia* (B) y *Dunaliella salina* (C) con los antibióticos paramomicina, kanamicina y zeocina a diferentes concentraciones crecientes. SA: sin antibiótico.

4.3.2. Construcción de vectores de expresión para la transformación genética

La eficiencia de los promotores heterólogos NOS, CaMV35S y Hsp70A/RbcS2 para dirigir la expresión de los genes marcadores de resistencia a los antibióticos paramomicina *APHVIII* y zeocina *BLE* se evaluó en las microalgas salinas seleccionadas. Se construyeron diferentes vectores de expresión. Estos plásmidos poseían el gen que confería resistencia al antibiótico paramomicina bajo el control de tres promotores diferentes, el promotor híbrido de *Chlamydomonas reinhardtii* Hsp70A/RbcS2, el promotor de *Agrobacterium tumefaciens* NOS y el promotor del virus del mosaico de la coliflor CaMV35S (Díaz-Santos *et al.*, 2013). Se eligió el gen *APHVIII*, que codifica para una aminoglicosido 3'-fosfotransferasa, como gen marcador debido a que proporciona un fenotipo estable y tiene un uso de codones similar al del genoma de las algas verdes (Sizova *et al.*, 2001).

Tabla 4.1. Lista de cebadores utilizados en este trabajo para la construcción de plásmidos y análisis de transformantes. En la tabla se muestra la secuencia de cada cebador y su uso.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Usos
NOSHindF NOSBamR	CTGAAGCTTGGAACGACA TCCGGATCCGATTATTG	Amplificación del promotor NOS del plásmido pBI121
APH8BamF APH8SacR	CGCCCTCCCCGGATCCGAAGAA ACCCACGAGCTCCAACCCTACCC	Amplificación del gen <i>APHVIII</i> del plásmido pSI103
BLEBamF BLESacF	TTTACAAGAGGATCCACTCAACATCTT GAGCTCGTCGACGTCGGTTAGTCCTG	Amplificación del gen <i>BLE</i> del plásmido pSP108 y <i>BLEint</i> del plásmido pSP124S. Comprobación de la inserción del gen <i>BLE</i> en los transformantes
APH8F2 APH8R2	GAGGATCTGGACGAGGAGCGGAA CCCTCAGAACAACCTCGTCCAACAGC	Comprobación de la inserción del gen <i>APHVIII</i> en los transformantes

Para la construcción de los plásmidos, el fragmento CaMV35Sp-*GUS*-NoSter se escindió del plásmido pBI121 (Chen *et al.*, 2003) por digestión con HindIII y EcoRI, y se subclonó en el sitio de multiclonaje del plásmido pQE80. Después se intercambió el gen reportero *GUS* por

el gen marcador *APHVIII* de *Streptomyces rimosus*. Este gen fue obtenido previamente por PCR del plásmido pSI103 (Sizova *et al.*, 2001) con los cebadores APH8FBamHI y APH8RSacI (Tabla 4.1.). Para generar la construcción NOSp-*APHVIII*-NOSter, el promotor CaMV35S se cortó de la construcción anterior con las enzimas de restricción BamHI y HindIII y se substituyó por el promotor NOS, obtenido previamente por PCR usando como molde el plásmido pBI121. Para esta PCR se usaron cebadores que incluían sitios de restricción para las enzimas HindIII y BamHI (Díaz-Santos *et al.*, 2013).

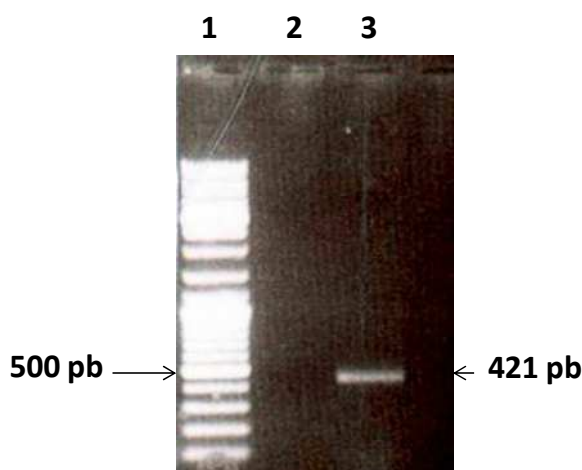


Figura 4.2. Electroforésis en gel del agarosa al 1% de la PCR del gen marcador *BLE* (421 pb) sobre el plásmido pSP108. En la primera calle se encuentra el patrón de pesos moleculares y en la segunda calle el control negativo sin ADN.

A partir de las construcciones descritas, se realizaron construcciones análogas para el gen marcador *BLE*. El gen marcador *BLE* procede de la especie de actinomicetos *Streptoalloteichus hindustanus*, y codifica una pequeña proteína de 13,7 KDa que confiere resistencia al antibiótico talisomicina y sus derivados, como la bleomicina o la zeocina. Estos antibióticos glicopeptídicos actúan mediante la rotura del ADN. La proteína codificada por el gen *BLE* previene esta acción mediante la unión al antibiótico con alta afinidad. El gen *BLE* se obtuvo mediante PCR con cebadores específicos (Tabla 4.1.) sobre el plásmido pSP108, cedido amablemente por el Dr. Saul Purton (Stevens *et al.*, 1996). Este plásmido contiene el gen marcador *BLE* flanqueado por el promotor RbcS2 de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Mediante la PCR se obtuvo una banda de 421 pb correspondiente al gen marcador *BLE* con sitios de corte BamHI y SacI introducidos con los cebadores específicos diseñados. La banda obtenida se aisló del gel de agarosa y se subclonó en el plásmido comercial pGEMT para su amplificación *in vivo*.

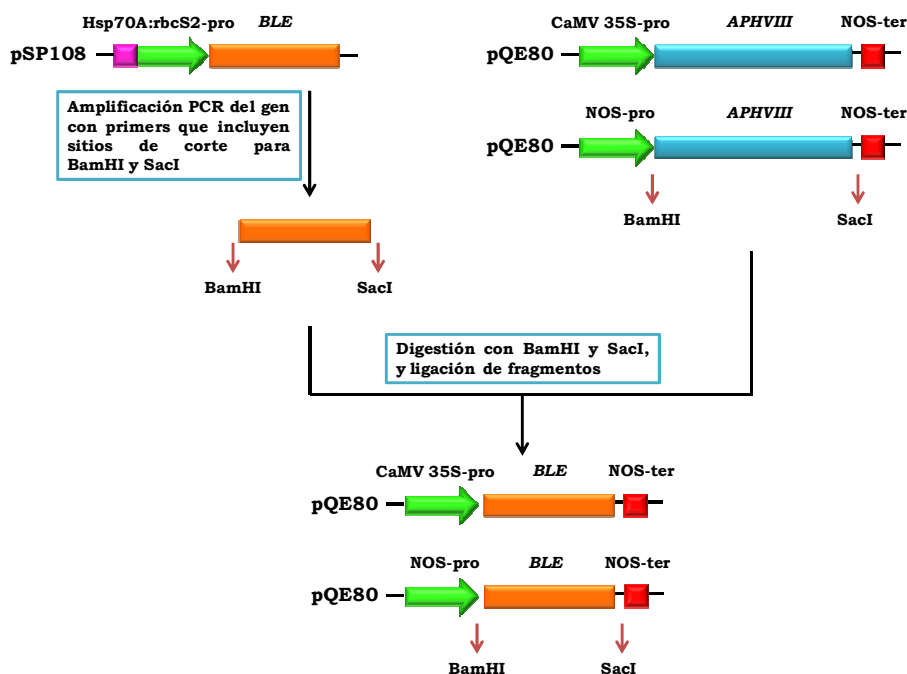


Figura 4.3. Esquema general de la construcción de los vectores de expresión que contienen el gen de resistencia a zeocina *BLE* precedido de los promotores CaMV35S y NOS.

El gen *BLE*, aislado y clonado en el plásmido pGEMT, se cortó con las enzimas de restricción BamHI y SacI. Los sitios de corte para dichas enzimas fueron insertados durante la PCR con los cebadores diseñados. Mediante corte con las mismas enzimas de restricción en los plásmidos construidos para el gen marcador *APHVIII* y ligación con el gen *BLE*, se consiguieron las nuevas construcciones CaMV35Sp-*BLE*-NOSter y NOSp-*BLE*-NOSter.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para la realización de las construcciones con el gen de resistencia a zeocina *Ble* con intrones. Según describen Lumbreras y colaboradores (Lumbreras *et al.*, 1998), la

introducción de dos copias del primer intrón del gen de la subunidad grande de la rubisco (*RBCS2*) aumenta la expresión del gen de resistencia. Por este motivo se llevó a cabo el aislamiento del gen *BLE-int* a partir del plásmido pSP124S donado por el Dr. Saul Purton. Este plásmido posee el gen de resistencia a zeocina *BLE-int* bajo el control del promotor *RbcS2* de *Chlamydomonas reinhardtii*. Como se muestra en la figura 4.4. se amplificó el gen mediante PCR con cebadores específicos (Tabla 4.1.) donde se incluyeron sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sac*I. El gen amplificado se introdujo en el vector de expresión pGEMT para su amplificación *in vivo* y posteriormente se cortó y se introdujo en los plásmidos construidos bajo la expresión de los promotores CaMV35S y NOS, intercambiándolo por el gen de resistencia a zeocina *BLE*, realizados anteriormente.

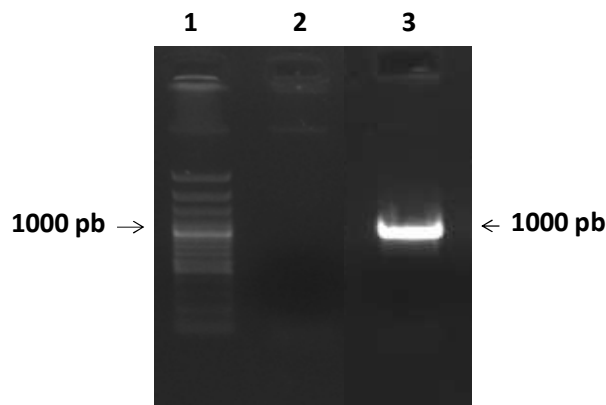


Figura 4.4. Electroforésis en gel de agarosa al 1% de la PCR del gen marcador *BLE-int* (1000 pb) sobre el plásmido pSP124S. En la primera calle se encuentra el patrón de pesos moleculares y en la segunda calle el control negativo sin ADN.

El proceso de diseño y creación de un vector que contenga todos los elementos necesarios para la expresión de un gen, es uno de los pasos críticos en la transformación genética. Este proceso incluye la selección de un gen marcador adecuado, tanto para la selección bacteriana como en el organismo hospedador (*Niu et al., 2011*).

Con las construcciones realizadas se aumenta de forma sustancial el catálogo de vectores para la posible expresión de genes exógenos en microalgas.

4.3.3. Aproximación a la manipulación genética de microalgas salinas

En este trabajo se ha puesto a punto la manipulación genética de las microalgas salinas *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* y *Picochlorum sp HM1*, mediante diferentes técnicas de transformación. Además se ha evaluado la eficiencia de los diferentes promotores heterólogos previamente descritos, para dirigir la expresión transitoria de genes exógenos en estas microalgas. A continuación se detallan la metodología y resultados obtenidos en cada caso.

Tetraselmis suecica

Se ha establecido un método para optimizar la transformación genética de la clorofita *Tetraselmis suecica* mediante la técnica de electroporación. Para ello un cultivo de esta microalga en fase exponencial de crecimiento se recogió por centrifugación, se lavó con el mismo volumen de un tampón de glicerol 50 mM, y se resuspendió a una densidad celular final de 100 veces la del cultivo inicial, incubándolo en hielo durante 30 min. Se utilizaron cubetas de electroporación de 4 mm y se añadió a cada cubeta 800 μ L de cultivo y 10 μ g del gen de resistencia a paramomicina sin promotor, amplificado por PCR, al que denominamos *APHVIII*promotorless. Esta reacción de PCR se realizó con los cebadores específicos APH8BamF y APH8SacR descritos en la Tabla 4.1. Las cubetas se mantuvieron en frío durante 5 minutos antes de la electroporación. La electroporación se llevó a cabo en un equipo MicroPulser de Bio-Rad. Las células se sometieron a diferente número de pulsos a 2500V. Tras la electroporación, se dejaron los cultivos durante 5 minutos en hielo y posteriormente se pasaron a tubos falcon de 50 mL donde se les añadieron 25 mL de medio fresco sin antibiótico. Estos tubos se mantuvieron durante toda la noche en condiciones de baja luz para su recuperación y al día siguiente se plaquearon en medio solido conteniendo el antibiótico selectivo paramomicina a una concentración de 200 μ g mL⁻¹.

Tras una semana en la cámara de cultivo a 100 μ E m⁻² s⁻¹ y 25 °C aparecieron en las placas colonias transformantes. El número de colonias obtenidas en las transformaciones con diferente número de pulsos se muestra en la figura 4.5.A. Como se observa en la figura, en todos los casos, excepto en el de 3 pulsos, se obtuvieron colonias transformantes, siendo su número creciente a medida que aumentaba el número de pulsos. Hasta los 8 pulsos, el número de colonias

transformantes obtenidas fue bastante bajo, de entorno a 7. Sin embargo, en la reacción con 10 pulsos, el número de colonias llegó a ser más del triple que en los otros casos.

Una vez optimizado el número de pulsos en la electroporación de *Tetraselmis suecica* con el gen *APHVIIIpromotorless*, se realizó un segundo ensayo de transformación pero con las construcciones para el gen de resistencia a paramomicina *APHVIII* bajo el control de los diferentes promotores heterólogos. Las construcciones ensayadas fueron NOSp-*APHVIII*-NOSter, CaMV35Sp-*APHVIII*-NOSter, Hsp70A/RbcS2p-*APHVIII* y el gen *APHVIIIpromotorless*. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.5.B. El mayor número de colonias transformantes se obtuvieron con el plásmido que contiene el gen de resistencia a paramomicina *APHVIII* bajo el control del promotor de *Chlamydomonas reinhardtii*, Hsp70A/RbcS2. La eficiencia de la transformación con esta construcción constituye casi el doble de la obtenida con las otras construcciones, siendo éstas de 422 colonias transformantes para la construcción bajo el control de NOS y de 330 colonias transformantes para la construcción bajo el control de CaMV35S. Estos resultados concuerdan con lo obtenido previamente en nuestro grupo de investigación para la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* (Díaz-Santos *et al.*, 2013).

La baja eficiencia obtenida para las transformaciones realizadas con el gen *APHVIIIpromotorless* se debe a que el gen debe insertarse en una región adyacente a un promotor genómico endógeno o en fase de lectura con un gen nativo. Esto hace que aumente la complejidad del proceso. A pesar de que el promotor NOS prácticamente no se ha utilizado para la transformación de microalgas, la buena eficiencia obtenida en la transformación tanto de *Chlamydomonas reinhardtii* como ahora de *Tetraselmis suecica*, hace de él una alternativa prometedora para la manipulación genética de especies de microalgas clorofitas.

Número de Transformantes

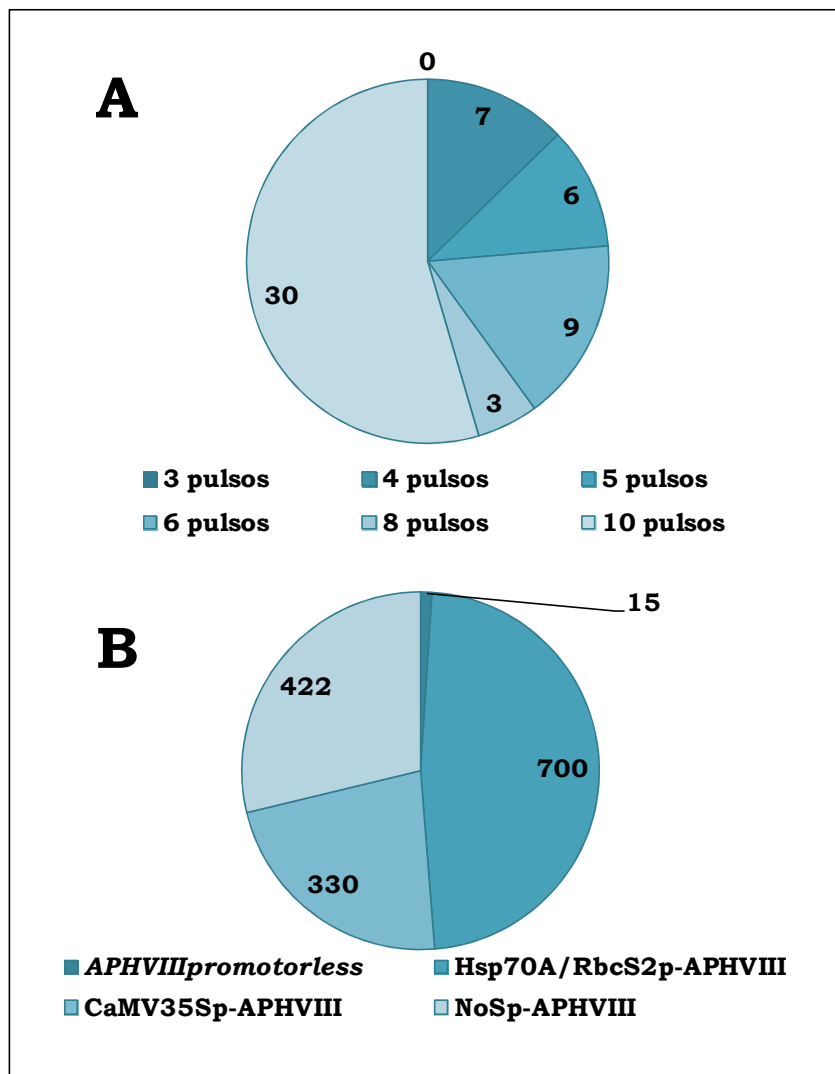


Figura 4.5. Optimización de la transformación mediante electroporación de la microalga *Tetraselmis suecica*. Número de transformantes obtenido para diferente número de pulsos en la transformación mediante electroporación de la microalga *Tetraselmis suecica* con el gen *APHVIIIpromotorless* (A). Número de transformantes obtenidos mediante 10 pulsos de electroporación con las construcciones que contenían los diferentes promotores evaluados Hsp70A/RbcS2, CaMV35S y NOS, así como con el gen sin promotor *APHVIIIpromotorless* (B). En todos los casos la reacción de electroporación se llevó a cabo a 2500 V. Se representa la media de al menos dos experimentos.

Dunaliella salina

La transformación de *Dunaliella salina* se realizó mediante la técnica de bombardeo con partículas de tungsteno. En este caso, se inocularon placas de medio específico con 0,3 M de NaCl, con 50 millones de células y se dejaron crecer durante 10 días en la cámara de cultivo. Para la transformación se utilizó aproximadamente 5 µg de las construcciones realizadas con el gen *BLE* precedido de los promotores CaMV35S y NOS. Las transformaciones se realizaron a tres presiones de ruptura y con tres distancias de disparo cada una. Una vez realizado el bombardeo, las placas se mantuvieron en la cámara de cultivo a 25°C durante 3 días. Pasado este tiempo, se recogieron las células y se pasaron a placas con el medio de cultivo selectivo con una concentración de 100 µg mL⁻¹ de zeocina. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.2.

Como se observa en la tabla 4.2. sólo se obtuvieron colonias transformantes en la reacción con 450 psi de presión y 6 cm de distancia al disparador, para ambas construcciones. Esto indica que, a medida que se aumenta la distancia de disparo, la eficiencia de transformación decae drásticamente. Resultados similares fueron obtenidos por Tan y colaboradores (*Tan et al., 2005*) donde la mayor eficiencia de transformación obtenida fue a 450 psi de presión y 6 cm de distancia, aunque también obtuvieron eficiencias más bajas a otras distancias. Como ocurrió en la transformación realizada para *Tetraselmis suecica*, la mayor eficiencia de transformación obtenida entre los dos promotores heterólogos típicos de plantas superiores fue con el promotor NOS, promotor del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.

Tabla 4.2. Número de colonias transformantes obtenidas mediante bombardeo con partículas de tungsteno de la microalga *Dunaliella salina*. Se muestran los resultados con diferentes presiones y distancias de disparo. Se presenta las medias de al menos dos experimentos.

	CaMV35Sp		NoSp	
	450 psi	650 psi	450 psi	650 psi
6 cm	56	0	85	0
9 cm	0	0	0	0
12 cm	0	0	0	0

Aunque existen muchas publicaciones sobre los métodos de transformación genética de microalgas, para *Dunaliella salina* son pocos los trabajos en los que se recoge la transformación de la microalga. Algunos de los métodos utilizados son: agitación con perlas de vidrio (Feng et al., 2009), electroporación (Sun et al., 2005; Walker et al., 2005c) y bombardeo de micropartículas (Tan et al., 2005). En la mayoría de los casos la expresión es muy pobre o los transformantes son inestables. El establecimiento de un método estable y eficiente para la transformación de *Dunaliella salina* es por el momento un reto pendiente, que limita la producción de proteínas exógenas y la expresión de transgenes en la microalga.

Picochlorum sp HM1

Debido a su pequeño tamaño, la transformación genética de *Picochlorum* sp HM1 se llevó a cabo mediante la técnica de electroporación. Un cultivo de *Picochlorum* sp HM1 en fase exponencial de crecimiento se recogió por centrifugación, se lavó con el mismo volumen de un tampón de glicerol 20 mM, y se resuspendió hasta una densidad celular final de 100 veces la del cultivo inicial, incubándolo en hielo durante 30 min. Se utilizaron cubetas de electroporación de 4 mm, a las cuales se añadió 800 μ L del cultivo y 10 μ g del *APHVIIIpromotorless* previamente amplificado por PCR. Las cubetas se mantuvieron en frío durante 5 minutos antes de la electroporación. La electroporación se llevó a cabo en un equipo MicroPulser de Bio-Rad. Las células se electroporaron a diferentes voltajes y número de pulsos. Tras la electroporación, se dejaron los cultivos durante 5 minutos en hielo y posteriormente se pasaron a tubos falcon de 50 mL donde se le añadieron 25 mL de medio fresco sin antibiótico. Estos tubos se mantuvieron durante toda la noche en condiciones de baja luz para su recuperación y al día siguiente se plaquearon en medio solido conteniendo el antibiótico selectivo paramomicina a una concentración de 200 μ g mL⁻¹. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Número de colonias transformantes obtenidas mediante electroporación de *Picochlorum sp HM1*. Se muestran los resultados para diferentes voltajes y número de pulsos.

	Número de Pulsos	
	1 pulso	2 pulsos
1800 V	0	1
2500 V	3	8
3000 V	6	>150

Aunque la variabilidad obtenida en las diferentes repeticiones de este experimento de transformación dificulta la obtención de resultados sobre las condiciones óptimas de transformación. Por este motivo se decidió realizar la transformación con las nuevas construcciones realizadas con el gen de resistencia a zeocina, *BLE* y *BLE-int*. Este trabajo se encuentra actualmente en proceso de realización.

Para las tres microalgas, las colonias transformantes obtenidas se subclonaron en placas nuevas con el medio de cultivo selectivo, para comprobar su estabilidad. En todos los casos, los transformantes obtenidos perdían la capacidad de resistencia al antibiótico seleccionado durante el siguiente subcultivo. Estos transformantes transitorios pueden ser consecuencia de una inadecuada inserción del gen marcador de la construcción en el genoma de la microalga, o de fenómenos de silenciamiento postranscripcional (León *et al.*, 2004), que ha sido atribuido a una variedad de mecanismos epigenéticos similares a los observados en plantas y otras células eucariotas, y que parece estar relacionado con el control del desarrollo y con la respuesta celular a virus, elementos transponibles y transgenes (Cerutti *et al.*, 1997; Wu-Scharf *et al.*, 2000). Otros elementos que pueden dificultar la expresión de genes exógenos en microalgas pueden ser la carencia de secuencias regulatorias adecuadas, el efecto posicional, el uso de codones, la incorrecta poliadenilación, un transporte inadecuado al núcleo o inestabilidad de los ARNm (León *et al.*, 2004).

Solo se ha descrito transformación nuclear estable en tres grupos de microalgas eucariotas: clorofitas, diatomeas y dinoflageladas (León *et al.*, 2004), entre las que caben destacar las especies *Chlamydomonas reinhardtii* y *Phaeodactylum tricornutum*.

Intentos de expresar genes fusionados a promotores heterólogos fueron infructuosos en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Apt, 1996), y en *Chlamydomonas reinhardtii* la frecuencia fue baja (Hall, 1993; Díaz-Santos *et al.*, 2013) o la expresión inestable (Tang *et al.*, 1995). Sin embargo, en muchos casos se ha conseguido la transformación genética pero la expresión ha sido transitoria, como ocurrió en *Thalassiosira weissflogii* (Falciatore *et al.*, 1999), *Chlorella* (Jarvis and Brown, 1991; Hawkins and Nakamura, 1999, Wang *et al.*, 2007), *Nannochloropsis sp* (San *et al.*, 2012), *Haematococcus pluvialis* (Teng *et al.*, 2002) o, como hemos descrito antes, en *Dunaliella salina* (Porath *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011).

La transformación estable de microalgas aún es un proceso al que le queda un largo camino por recorrer, pero además, la transformación estable de microalgas marinas lleva asociada varios problemas, como son la incompatibilidad de muchos antibióticos selectivos con las sales presentes en el medio de cultivo, o la inestabilidad de la expresión de los transgenes en la mayoría de los casos estudiados (Qin *et al.*, 2012).

4.4. Conclusiones

En este capítulo se ha ampliado la colección de plásmidos disponibles para la transformación de microalgas, mediante la construcción de nuevos vectores de expresión en los que los genes seleccionables están bajo el control de diferentes promotores heterólogos. Los promotores utilizados fueron el promotor NOS de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, el promotor CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor, y el promotor híbrido Hsp70A/RbcS2 de *Chlamydomonas reinhardtii*.

La expresión transitoria de los genes de resistencia al antibiótico paramomicina (*APHVIII*), que codifica para el aminoglicosido 3'-fosfotransferasa aislado de *Streptomyces rimosus*, y al antibiótico zeocina (*BLE* y *BLE-int*), que codifica para una proteína de unión a bleomicina aislado de *Streptoalloteichus hindustanus*, bajo el control de estos promotores, ha permitido optimizar la transformación genética de las microalgas marinas descritas anteriormente, aunque en ninguno de los tres casos se han conseguido transformantes estables.

4.5. Conclusions

In this chapter the collection of plasmids available for transformation of microalgae has been extended by the construction of new expression vectors in which the selectable genes are under the control of different heterologous promoters. The heterologous promoters used were the nopaline synthase promoter NOS of *Agrobacterium tumefaciens*, the CaMV35S promoter of the cauliflower mosaic virus and the quimeric promoter Hsp70A/RbcS2 of *Chlamydomonas reinhardtii*.

Transient expression of resistance genes against the antibiotic paromomycin (APHVIII), which encode for an aminoglycoside 3'-fosfotransferase isolated from *Streptomyces rimosus*, and the antibiotic zeocin (BLE and BLE-int), which encodes for a bleomycin-binding protein isolated from *Streptoalloteichus hindustanus*, under the control of these promoters, has allowed to optimize genetic transformation of the marine microalgae described above, although no stable transformants have been achieved in either of the three cases.

Capítulo 5

Sobreexpresión del gen *DGAT1*
de *Echium pitardi* en la
microalga modelo
Chlamydomonas reinhardtii



Abstract

Acyl-CoA-diacylglycerol acyltransferase (DGAT) plays an important role in the triacylglycerols biosynthesis. This type of lipids has a high value due to both their use in human and animal nutrition and for the production of third generation biofuel. In this work we have overexpressed the *EpDGAT1* gene of the boraginaceae *Echium pitardi* in the model microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, by transformation with a binary expression vector. Two obtained transformants were selected, M2 and C2-5, in which high gene expression was observed and an constitutive neutral lipids accumulation up 30% over that in the control culture. This is the first time it gene is overexpress in *Chlamydomonas reinhardtii* with satisfactory results, opening a promising line of study of the fatty acids biosynthesis pathway in this and other microalgae.

Resumen

La enzima Acil-CoA-diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) juega un importante papel en la biosíntesis de triacilglicéridos. Este tipo de lípidos tiene un alto valor debido tanto a su uso en nutrición animal y humana, como para la producción de biocombustibles de tercera generación. En este trabajo se ha sobreexpresado el gen *EpDGAT1* de la planta borraginácea *Echium pitardi*, en la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii*, mediante la transformación con un vector binario de expresión. De los transformantes obtenidos, se han seleccionado dos, M2 y C2-5, en los que se ha observado alta expresión del gen y una acumulación constitutiva de hasta un 30% más de lípidos neutros que en el cultivo control. Esta es la primera vez que se consigue sobreexpresar este gen en *Chlamydomonas reinhardtii* con resultados satisfactorios, abriendo una línea prometedora del estudio de la ruta de síntesis de ácidos grasos en esta y en otras microalgas.

5.1. Introducción

El metabolismo lipídico es una red en la que están involucrados cientos de proteínas y muchos compartimentos subcelulares, incluyendo a los plastidios, retículo endoplásmico y gránulos lipídicos (Li-Beisson *et al.*, 2013). En las algas, la síntesis *de novo* de los ácidos grasos tiene lugar en los cloroplastos. Los ácidos grasos producidos así, serán los precursores tanto de los lípidos de membrana como de los lípidos de reserva. Actualmente aun no se conoce bien el mecanismo por el que los ácidos grasos sintetizados van a formar parte de un tipo u otro de lípido. Para la síntesis de TAGs se han propuesto tres rutas diferentes. La más conocida es la ruta dependiente de acil-CoA o ruta de Kennedy (Kennedy, 1961), catalizada en el retículo endoplásmico por enzimas unidas a membrana, de forma similar a lo que ocurre en plantas (Hu *et al.*, 2008; Riekhof and Benning, 2009). Una ruta de síntesis de TAGs alternativa a ésta es la que ocurre tanto en plantas como en levaduras, catalizada por la fosfolípido-diacilglicerol aciltransferasa (PDAT) que usa fosfatidilcolina como donador de grupos acilos y el 1,2-diacilglicerol como aceptor de éstos. Una enzima homóloga a esta está presente en genomas de algunas microalgas secuenciadas, como por ejemplo en *Chlamydomonas reinhardtii*, donde se ha encontrado que un mutante del gen que codifica para la enzima PDAT acumula un 30% menos de aceite que el control (Yoon *et al.*, 2012). Esto sugiere la contribución de esta ruta de síntesis en el alga verde modelo. Recientemente, Fan y colaboradores (Fan *et al.*, 2011) han propuesto una tercera ruta de biosíntesis de TAGs, demostrando que una pequeña parte de esta ruta de síntesis ocurre en los plastidios de *Chlamydomonas reinhardtii* y que los gránulos lipídicos formados se secretan y reordenan en el citosol, tal como se observa mediante microscopía de transmisión (TEM). Esto ha sido confirmado por otro estudio (Goodson *et al.*, 2011). Desde este punto de vista se puede decir que en *Chlamydomonas reinhardtii* una pequeña parte de los TAGs son sintetizados en los plastidios. La mayoría de los genes de la ruta han sido asignados por homología con los correspondientes ortólogos de plantas superiores (Riekhof and Bennin, 2009; Merchant *et al.*, 2011), pero su función biológica tiene que ser validada aún.

Desde los pioneros trabajos infructuosos de Dunahay para mejorar la síntesis de TAGs mediante sobreexpresión del gen de la ACCasa (Dunahay *et al.*, 1995), muchos otros grupos de investigación han considerado el potencial de la manipulación genética de la ruta de biosíntesis de TAGs para incrementar la productividad de lípidos en

microalgas (Courchesne *et al.*, 2009; Radakovits, 2010; Blatti *et al.*, 2013), pero las limitaciones en el conocimiento de esta ruta y su regulación, han obstaculizado hasta ahora las aproximaciones de ingeniería molecular.

La ruta de síntesis de triacilglicéridos dependiente de acil-CoA o ruta de Kennedy (Kennedy, 1961) es la ruta mejor conocida, en la que las moléculas de acil-CoA son secuencialmente añadidas a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato (Kresge *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008). La enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAT) catalizan la transferencia de los dos primeros grupos acilos desde dos moléculas de acil-CoA en las posiciones 1 y 2 del glicerol-3-fosfato, respectivamente (Figura 1.7. Capítulo 1). Después, la enzima ácido fosfatídico aciltransferasa (PAP) elimina el grupo fosfato de la molécula de ácido fosfatídico para producir diacilglicerol (DAG) (Chen and Smith, 2012).

El último paso de la ruta, en la que se utiliza el diacilglicerol como aceptor de grupos acilos, es el llevado a cabo por la encima diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). Esta enzima utiliza moléculas de acil-CoA como donadoras de grupos acilos. Existen dos isoformas no homólogas, DGAT1 y DGAT2, que catalizan la misma reacción pero que, sin embargo, no presentan ningún tipo de similitud en cuanto a secuencia o estructura, aunque realizan la misma acción catalítica y ambas son proteínas de membrana. Existen evidencias de la existencia de una tercera isoenzima, la DGAT3, que parece ser una enzima citosólica que forma parte de la ruta de biosíntesis de cutina en varias plantas, según se ha descrito (Saha *et al.*, 2006; Rani *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012), aunque el papel que juega en la biosíntesis de TAGs no está aún claro. Existen evidencias de que las dos isoenzimas, DGAT1 y DGAT2, son el producto de una convergencia evolutiva, y que su coexistencia en los organismos no es excluyente, sino que cada una realiza una función determinada en la biosíntesis de TAGs. Se ha observado que mientras la isoenzima DGAT1 adiciona, preferentemente, ácidos grasos C16:0 y C18:1 en la posición 3 del diacilglicerol, la isoenzima DGAT2 parece incorporar ácidos grasos inusuales como son los ácidos grasos epoxidados e hidroxilados (Wagner *et al.*, 2010; Turchetto-Zolet *et al.*, 2011; Chen and Smith, 2012; Liu *et al.*, 2012), aunque esto puede variar entre organismos.

La sobreexpresión del gen que codifica para la enzima DGAT determinó un incremento en el contenido de aceite en las semillas de *Arabidopsis* (Jako *et al.*, 2001), pero también se ha observado en soja (Settlage *et al.*, 1998), colza (Perry *et al.*, 1999), oliva (Giannoulia *et al.*,

2000) y maíz (Zheng et al., 2008). Por todo ello se ha considerado que la enzima DGAT es un punto limitante de la ruta de biosíntesis de TAGs (Lehner and Kuksis, 1996; Perry et al., 1999; Triki et al., 2000; Jako et al., 2001; Lung and Weselake, 2006). Así, desde un punto de vista biotecnológico, se considera a la enzima DGAT como una enzima clave para aumentar el contenido en aceite en especies oleaginosas (Dyer and Mullen, 2005; Xu et al., 2008; Lardizabal et al., 2008).

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Organismos y condiciones de cultivo estándar

La estirpe 704 de *Chlamydomonas reinhardtii* deficiente en pared celular (Cw15, Arg7, mt⁺), cedida amablemente por el Dr. Roland Loppes (Loppes et al., 1999), se cultivó de forma mixotrófica en medio TAP (Tris-acetato-fosfato) (Gorman and Levine, 1965) líquido y solidificado con agar, a 25°C y bajo una intensidad luminica constante de 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La estirpe de *Escherichia coli* utilizada para la amplificación del ADN *in vivo* fue DH5 α , cultivada en medio LB a 37°C (Sambrook and Russell, 2001). La cinética de crecimiento de la microalga se llevó a cabo mediante la medida de la densidad óptica (D.O.) en un espectrofotómetro con detector de ultravioleta-visible Ultrospec 3100pro a 660 nm por triplicado.

5.2.2. Transformación nuclear de *Chlamydomonas reinhardtii*

La transformación de *Chlamydomonas reinhardtii* se llevó a cabo usando el método de agitación con perlas de vidrio descrito por Kindle (Kindle, 1990) con pequeñas modificaciones. Un cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* fue cultivado hasta una densidad óptica de 10^6 células por mililitro, se centrifugó y resuspendió en medio TAP fresco para obtener una suspensión celular 100 veces concentrada. En un tubo cónico que contenía 0,3 gr de perlas de vidrio estériles (0,4-0,6 mm de diámetro), se añadieron 0,6 mL de la suspensión celular concentrada de la microalga, 0,1 mL de una disolución de PEG al 20% (MW 8.000) y alrededor de 1 μg del ADN deseado. La mezcla se agitó en el vortex durante 8 segundo y después se resuspendió en 50 mL de medio TAP estéril. Estos tubos se incubaron en oscuridad durante toda la noche en ausencia de antibiótico y después, se centrifugaron y se

cultivaron en placas de medio TAP sólido con paramomicina ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$). Las colonias transformantes aparecieron después de 4-5 días.

5.2.3. Determinación del contenido en lípidos neutros por espectrofluorimetría

La determinación del contenido en lípidos neutros del cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* se llevó a cabo mediante tinción con Rojo Nilo. Se incubaron 3 mL de una suspensión celular de *Chlamydomonas reinhardtii* a una densidad celular entre 0,7-0,9 con $10 \mu\text{L}$ de un stock de Rojo Nilo con una concentración de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ en acetona en agitación durante 10 minutos. El nivel de fluorescencia se midió con un espectrofluorímetro Cary Eclipse de Varian usando una longitud de onda de excitación de 510 nm, un barrido de longitudes de onda de emisión entre 530-800 nm en pasos de 5 nm, y un fotomúltiplo de 700V.

5.2.4. Extracción de ADN genómico a pequeña escala

Una muestra de 2 mL de cultivo de cada transformante a analizar se recogió por centrifugación y el pellet resultante fue resuspendido en $300 \mu\text{L}$ de Tampón de Lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA, 2% SDS). La mezcla se agitó en el Vortex durante 15 min e incubado en hielo durante 2 min. El ADN genómico se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitado con etanol absoluto durante toda la noche a -20°C . El pellet se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en $50 \mu\text{L}$ de Tampón Tris 10 mM pH 8. La cuantificación del ADN genómico obtenido y la medida de su pureza se realizó en un espectrofotómetro NannoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

5.2.5. Extracción de ARN y transcripción reversa

El aislamiento del ARN total se llevó a cabo mediante el RNeasy plant MiniKit de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se determinó con un espectrofotómetro NannoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Después se sintetizaron las cadenas simples de ADNc a partir del ARN con la transcriptasa reversa manual de SuperScript II RNaseH de Invitrogen. Estas cadenas de ADNc se usaron como molde para realizar la reacción de PCR.

5.2.6. Análisis de los transformantes por PCR

La amplificación por PCR se llevó a cabo a partir de 1 µL de ADN en un volumen total de reacción de 25 µL que contenía además, 10 pmol de cada cebador, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 U de ADN Taq Polimerasa de Biotools (B&M Labs, Madrid, España), 2,5 µL del tampón específico 10X de la enzima (que contiene 2,5 mM MgCl₂), y 1% de DMSO. El programa de la PCR que se siguió fue el siguiente: 0,5 minutos a 96°C, 0,5 minutos a la temperatura de anillamiento (61°C para los cebadores del gen *APHVIII* y 60°C para los cebadores del gen *EpDGAT1*), y 1,5 minutos a 72°C, todo ello repetido durante 30 ciclos.

5.2.7. Análisis lipídico de los transformantes

La composición de los ácidos grasos de los diferentes mutantes fue analizada por cromatografía de gases de los ésteres metílico de estos ácidos grasos. Para ellos se usó el método descrito por Rodríguez-Ruíz y colaboradores (*Rodríguez-Ruíz et al., 1998*), incluyendo como patrón interno el ácido heptadecanoico o ácido margárico (C17:0).

Se extrajeron los lípidos totales de 200 mg de cada microalga transformante liofilizada tal y como fue descrito por Alonso y colaboradores (*Alonso et al., 1998*). Se puso un particular cuidado en el procedimiento para minimizar la acción de las lipasas endógenas y la subsecuente liberación de ácidos grasos. El extracto lipídico se llevó a sequedad en un rotavapor bajo corriente de argón y se resuspendió en 2 mL de cloroformo. El extracto lipídico se fraccionó en una columna de cromatografía con un cartucho de sílica gel y las diferentes fracciones se eluyeron secuencialmente con 30 mL de cloroformo (lípidos neutro, LN) y después 30 mL de metanol (lípidos polares, LP). Estas fracciones se llevaron a sequedad en un rotavapor como se ha descrito previamente y se resuspendieron en 2 mL de cloroformo.

Las diferentes clases de lípidos neutros se separaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) en una dimensión, usando placas de sílica gel (Macherey Nagel). Estas placas se activaron previamente a su uso en un horno a 120°C durante 2 h. Los solventes empleados fueron: éter de petróleo-éter dietílico-ácido acético (80:20:1) (*Kates, 1988*). Las diferentes clases de lípidos neutros se visualizaron mediante vapor de yodo y se marcaron con un lápiz. Inmediatamente se rasparon y analizaron individualmente por cromatografía de gases como se describió anteriormente. Cada clase de lípido neutro se identificó por co-cromatografía con patrones auténticos de cada uno. Siempre se

rasparon y analizaron las zonas correspondientes a los lípidos neutros en la placa de cromatografía aunque estos no fueran visibles.

El proceso completo desde la extracción de los lípidos hasta la separación de estos por TLC, se repitió por triplicado para cada transformante. Como resultado del procedimiento empleado, todos los datos de los lípidos utilizados se refieren exclusivamente a la fracción saponificable; la fracción insaponificable se excluyó de la cuantificación. Esto es especialmente relevante para los lípidos neutros ya que estos siempre contienen lípidos insaponificables (por ejemplo esteroides).

5.3. Resultados y Discusión

5.3.1. Construcción de vectores de expresión para la transformación genética

El objetivo de este trabajo ha sido la sobreexpresión del gen acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 1 (*DGAT*, EC 2.3.1.20) de la planta borraginácea *Echium pitardi* (Mañas-Fernández *et al.*, 2009) en *Chlamydomonas reinhardtii*. Se trata de un gen que posee 16 exones y que codifica para una proteína de 473 aminoácidos con alta similitud con otras enzimas *DGAT1* de plantas. La proteína posee una estructura predicha de un fragmento N-terminal altamente hidrofílico seguido de 10 dominios transmembrana. Este trabajo ha sido realizado en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Diego López Alonso de la Universidad de Almería.

El plásmido pSI103 fue cedido amablemente por el Dr. Emilio Fernández de la Universidad de Córdoba. Se caracteriza por incluir el gen marcador *APHVIII*, aislado de la bacteria *Streptomyces rimosus*, que codifica la enzima aminoglicosido 3-fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico paramomicina. Este gen se encuentra flanqueado por el promotor de la subunidad pequeña del gen de la rubisco (*RbcS2-p*) de *Chlamydomonas reinhardtii* unido a la región 5' del gen *Hsp70A* y por la región 3'UTR. Sizova y colaboradores (Sizova *et al.*, 2001) demostraron la alta eficiencia de este gen como marcador para la transformación nuclear de *Chlamydomonas reinhardtii*, y que su unión a elementos reguladores como el gen *Hsp70A* ("heat shock protein") potencia la actividad del promotor y disminuye la probabilidad de silenciamiento transcripcional (Schroda *et al.*, 2002; Schroda, 2004).

Tabla 5.1. Lista de cebadores utilizados en este trabajo para la construcción de plásmidos y análisis de transformantes. En la tabla se muestra la secuencia de cada cebador y su uso.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Usos
DGATXhoF DGATBamR	GGGAATATTAAGCTCGAGACCATGACA GTTTGCATTAACGGATCCATTCAAGACA	Aislamiento del gen <i>EpDGAT1</i> completo desde la construcción pSI105- <i>EpDGAT1</i>
APH8F2 APH8R2	GAGGATCTGGACGAGGAGCGGAA CCCTCAGAAGAACTCGTCCAACAGC	Comprobación de la expresión del gen <i>APHVIII</i> en el ADNc
DGATF2 DGATR2	GGGGTTGGGTTACACGTCATCTCA CCAACTCCTTAGGCATCCCATTC	Comprobación de la inserción del gen en el ADN genómico de los mutantes. Comprobación de la expresión de gen en el ADNc

Utilizando este plásmido se construyó un plásmido binario (pSI105) que incluye una región de resistencia a paramomicina y otra para la expresión de genes exógenos constituido por las mismas secuencias reguladoras flanqueando una región de multiclonaje. El plásmido pSI103 se cortó con la enzima de restricción NotI y se religó para eliminar sitios de corte indeseados. El gen de resistencia a paramomicina (*APHVIII*) fue sustituido por un sitio de multiclonaje (PLK) dando como resultado el plásmido intermediario pSI104-PLK (León *et al.*, 2007). Finalmente se obtuvo el plásmido pSI105 mediante la eliminación de la región NaeI/XbaI (538 pb) del pSI104-PLK y su sustitución por el fragmento RbcS2p:*APHVIII* (Couso *et al.*, 2011). Este plásmido permite la integración en la misma construcción del gen marcador *APHVIII* y de un gel funcional que puede ser insertado en el sitio de multiclonaje. En la figura 5.1. se muestra el proceso de construcción de los vectores de expresión utilizados en este trabajo.

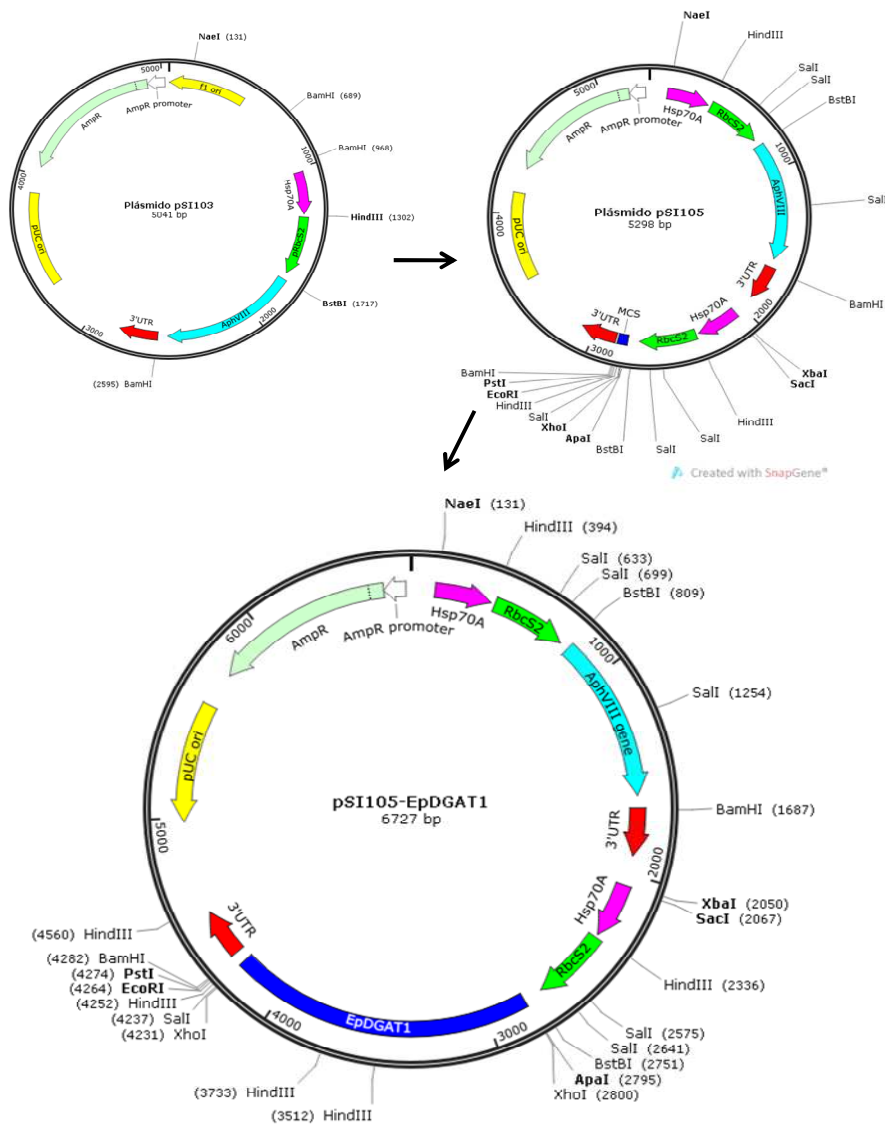


Figura 5.1. Esquema de la construcción del vector pSI105-*EpDGAT1* a partir del vector pSI103. (A) Diagrama del plásmido pSI103 donde se representan un origen de replicación para virus (f1 ori), gen de resistencia a ampicilina (*AmpR*), origen de replicación para bacterias (pUC ori), región no traducida del gen de la subunidad pequeña de la rubisco (3'UTR), gen de resistencia a paramomicina (*APHVIII*), promotor del gen de la subunidad pequeña de la rubisco (*RbcS2p*), promotor del gen correspondiente a una chaperona de la familia "heat shock proetin" (*Hsp70Ap*). (B) Diagrama del plásmido pSI105 donde se representan los mismos elementos descritos para el plásmido pSI103 pero además continen un sitio de multiclonaje (MCS). (C) Diagrama del plásmido pSI105-*EpDGAT1* donde se representan los mismos elementos descritos para el plásmido pSI105 además del gen que codifica para la enzima diacilglicérido-acil transferasa de *Echium pitardi* (*EpDGAT1*).

Finalmente el gen *EpDGAT1* aislado de *Echium pitardi* (Mañas-Fernández *et al.*, 2009) se insertó en el plásmido binario pSI105. El plásmido construido (pSI105-*EpDGAT1*) mide un total de 6727 pb de las cuales 1421 pb pertenecen al gen *EpDGAT1* que se encuentra entre las posiciones 2809 y 4230 (Figura 5.1.). El gen se ha insertado en el plásmido dentro del sitio de multiclonaje por el sitio de corte con enzima de restricción XhoI.

Una de las dificultades para expresar genes heterólogos en microalgas, es la selección de transformantes. La cotransformación con dos plásmidos diferentes, uno de los cuales contenga un gen marcador, supondría la solución, aunque la frecuencia de expresión de ambos genes suele ser reducida, en algunos casos alrededor del 10% (Stevens *et al.*, 1996; Kindle, 1998). La eficiencia de la transformación se ve incrementada notablemente cuando los dos genes se encuentran en la misma construcción, y si ésta es relativamente pequeña (Lohuis and Miller, 1998; Fuhrmann *et al.*, 1999).

5.3.2. Análisis del uso de codones del gen

La expresión de proteínas funcionales en huéspedes heterólogos es una de las técnicas centrales de la biotecnología moderna. La transferencia de un gen a un sistema de expresión adecuado no siempre es fácil de lograr, debido a varias razones: los genes de diferentes orígenes pueden contener codones que rara vez se utilizan en el huésped deseado o incluso tener codones no canónicos, o los genes pueden ocultar la expresión limitante de los elementos de regulación dentro de su la secuencia de codificación. Estos problemas también pueden ser observados en la introducción de genes extraños en genomas de microalgas como se describe en un número creciente de estudios sobre la expresión del transgén en estos organismos. Particularmente importante para el uso de algas como fábricas fotosintéticas es comprender la influencia de la composición de codones de un gen exógeno en la eficacia de su expresión (Heitzer *et al.*, 2007). Por lo tanto, se realizó una comparación *in silico* del gen *EpDGAT1* con las tablas de uso de codones de las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella vulgaris*, siendo éstas dos de las clorofitas mas utilizadas actualmente en biotecnología. En la figura 5.2. se observa el diagrama de la comparación por codones de un fragmento del gen *EpDGAT1* con las tablas de uso de codones de estas dos microalgas (A: *Chlamydomonas reinhardtii*, B: *Chlorella vulgaris*). El análisis se realizo con la herramienta <http://gcu.schoedl.de/index.html>.

El color rojo representa a codones muy poco usados por los organismos en cuestión (menos de un 10%), el color gris representa codones poco usados (menos de un 20%) y el color negro representa codones usuales. El uso de codones de *Chlorella vulgaris* se adapta mejor al gen *EpDGAT* que el de *Chlamydomonas reinhardtii*, que posee un menor número de codones usuales para la lectura de dicho gen. Pero sin embargo, como se mostrará, a pesar de esto el gen se integra en el genoma de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* y se expresa correctamente. Esto hace pensar que en *Chlorella vulgaris* y en otras microalgas relacionadas como por ejemplo *Picochlorum sp HM1* (de la Vega et al., 2011) el gen pueda expresarse sin problemas como ocurre en *Chlamydomonas reinhardtii*, abriendo nuevas líneas futuras de trabajo.

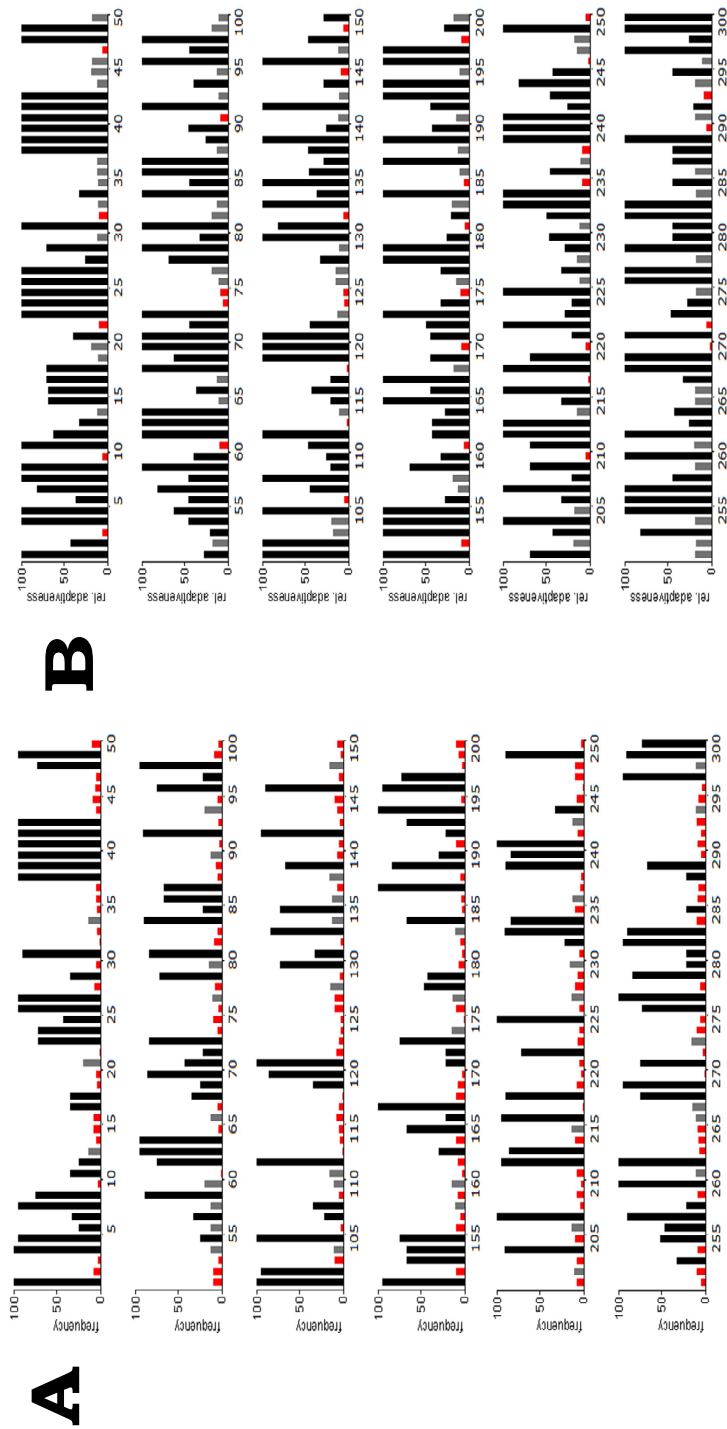


Figura 5.2. Comparación del uso de codones de *Chlamydomonas reinhardtii* (A) y *Chlorella vulgaris* (B) con relación al gen *EpDGAT1* de *Echium pitardi*. El análisis se ha llevado a cabo con la herramienta <http://gcu.schoedl.de/index.html>. El color rojo indica codones muy poco usados en los organismos en cuestión (menos de un 10%), el color gris indica codones poco usados (menos de un 20%) y el color negro indica codones usuales.

5.3.3. Transformación de *Chlamydomonas reinhardtii* y selección de transformantes

Se transformó *Chlamydomonas reinhardtii* con la construcción realizada pSI105-*EpDGAT1* tal y como se describe en la sección Materiales y Métodos. La eficiencia de dicha transformación fue bastante alta, con una media de 100 colonias transformantes por μg de plásmido y reacción. Las colonias transformantes obtenidas en dos experimentos de transformación, se subcultivaron varias veces en placas de medio TAP con paramomicina $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, concentración que ha sido probada anteriormente en el grupo de investigación como óptima para conseguir la inhibición total del crecimiento de la estirpe 704 de *Chlamydomonas reinhardtii*. Las colonias que no sobrevivieron fueron descartadas. Estos transformantes inestables podrían ser la consecuencia de una inserción inadecuada del gen marcador de la construcción en el genoma o de procesos de silenciamiento postranscripcional.

Los mutantes que sobrevivieron en estas condiciones se sometieron a un primer escrutinio estimando su contenido en lípidos neutros mediante espectrofluorimetría con Rojo Nilo. Se trata de una medida relativa del contenido de lípidos neutros presentes en la célula (Chen et al., 2011) en comparación con el valor obtenido para el cultivo control de *Chlamydomonas reinhardtii* 704. Esta técnica permite hacer una primera selección de entre los mutantes que presentan un mayor contenido en lípidos neutros. En la figura 5.3. se muestran los resultados obtenidos para estos mutantes, comparando dicho resultado con el obtenido para el control de *Chlamydomonas reinhardtii*. Así podemos ver en la figura que solo 5 mutantes poseen una relación Unidades de Fluorescencia/Unidades de Absorbancia (U.F./U.A.) mayor que el control. Sin embargo, en la figura se puede apreciar como existen algunos mutantes analizados con este método (como el M10, el M20, el M36, el C2-12 o el C2-49) que presentan un nivel bastante inferior de la relación U.F./U.A. que el cultivo control. Esto se puede deber a que el ADN introducido se haya insertado en el genoma, interrumpiendo algún gen que de algún modo influya en la ruta de síntesis de TAGs. Los mutantes C2-1, C2-5, M2, M3 Y M29, que fueron los que presentaban mayor contenido en lípidos neutros, se seleccionaron para continuar con los siguientes análisis.

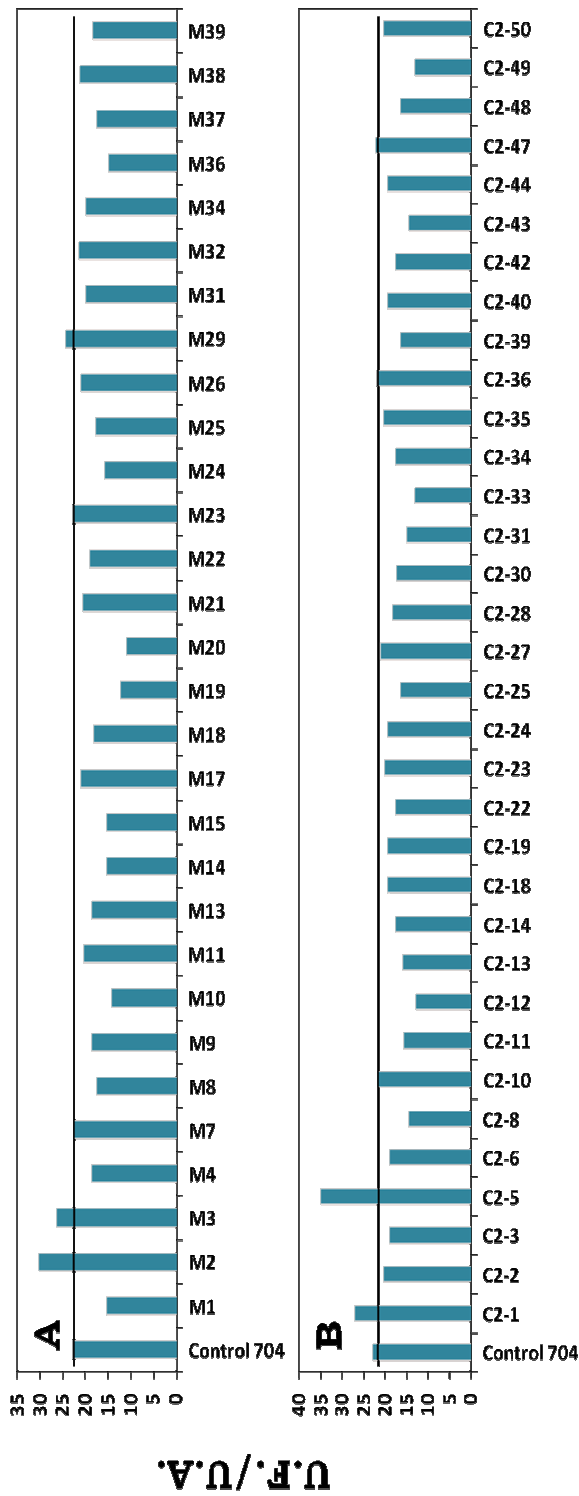


Figura 5.3. Selección de mutantes productores de TAGs mediante fluorescencia con Rojo Nilo. La relación unidades de fluorescencia/unidades de absorbancia (U.F./U.A.) representa un valor aproximado de los lípidos neutros presentes en la célula. (A) Mutantes obtenidos en la primera transformación con la construcción pSI105-*EpDGAT1* y (B) mutantes obtenidos en la segunda transformación con la construcción pSI105-*EpDGAT1*. En ambos casos se incluye un control de *Chlamydomonas reinhardtii* 704 silvestre.

5.3.4. Caracterización molecular de los transformantes seleccionados y expresión del gen

Para confirmar que los mutantes seleccionados mediante fluorimetría poseían el gen *EpDGAT1*, se realizó una PCR sobre ADN genómico con los cebadores DGATF2 y DGATR2 (Tabla 5.1.) contruidos para dicho gen. Se utilizó una temperatura de hibridación de 60°C y un tiempo de elongación de 30 segundos. El producto resultante se hizo correr en un gel de agarosa al 1%. El resultado se muestra en la figura 5.4. Como podemos observar, en todos los casos se amplificó una banda de un tamaño de 381 pb correspondiente al amplicón del gen *EpDGAT1* para el que se realizaron los cebadores.

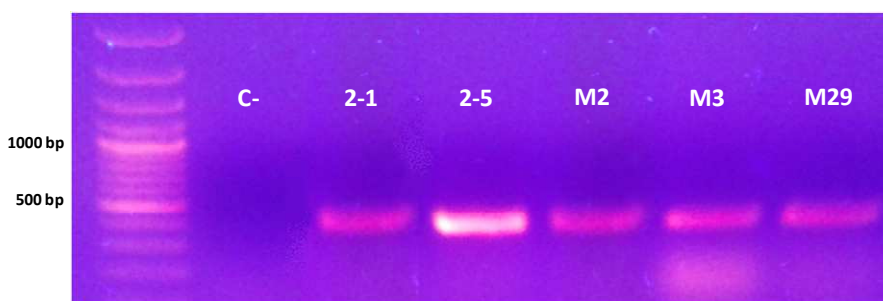


Figura 5.4. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la PCR sobre ADN genómico de los mutantes seleccionados C2-1, C2-5, M2, M3 y M29. En la primera calle aparece el patrón de pesos moleculares y en la segunda el control negativo sin ADN. La banda obtenida es de unas 381 pb.

A los mutantes seleccionados se les aisló el ARNm según se describe en la sección Materiales y Métodos, y después se realizó una transcripción reversa o retrotranscripción para la obtención del ADN complementario (ADNc). Con este ADNc se realizó una PCR con los cebadores DGATF2 y DGATR2 (Tabla 5.1.) para amplificar una región de 381 pb del gen *EpDGAT* tal como se ha descrito previamente. Como control del proceso de extracción de ARNm y de la retrotranscripción, también se realizó una PCR con los cebadores APH8F2 y APH8R2 específicos para el gen *APHVIII* (Tabla 5.1.). Esta PCR se realizó a una temperatura de hibridación de 61°C y un tiempo de elongación de 30 segundos, dando como resultado una banda en el gel de electroforesis de unas 359 pb. El resultado de estas dos reacciones de PCR se muestra en la figura 5.5.

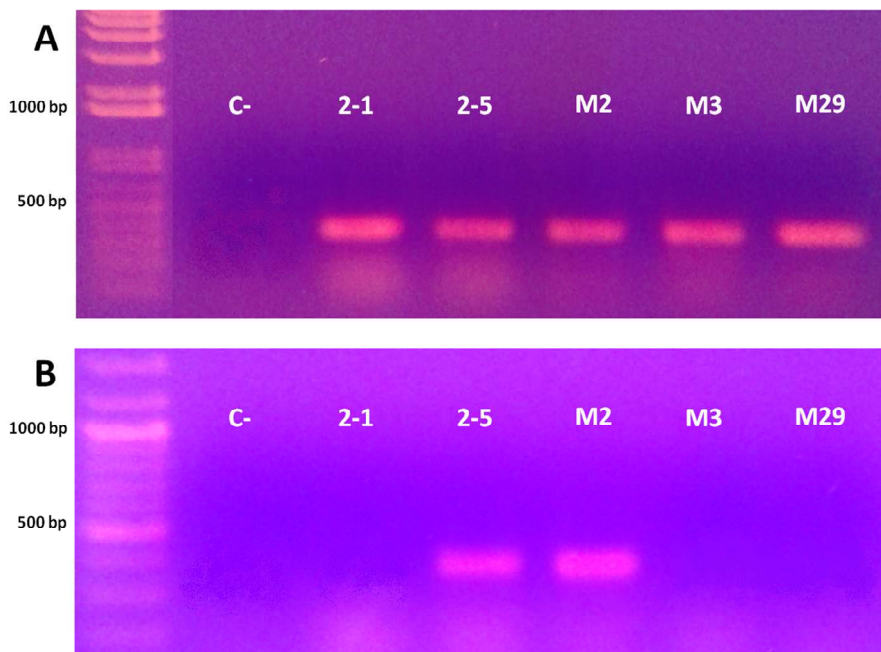


Figura 5.5. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la PCR sobre ADNc de los mutantes seleccionados C2-1, C2-5, M2, M3 y M29. En la primera calle aparece el patrón de pesos moleculares y en la segunda calle el control negativo sin ADN. (A) PCR sobre ADNc con los cebadores que amplifican un fragmento de 359 pb del gen *APHVIII*, incluido como control del proceso de extracción de ARNm y retrotranscripción. (B) PCR sobre ADNc con los cebadores para amplificar un fragmento de 381 pb del gen *EpDGAT1*.

Como se observa en la figura 5.5.A. aparece una banda de 359 pb correspondiente al fragmento del gen *APHVIII* que se ha utilizado como control del proceso de extracción y retrotranscripción de ARNm. Esta banda aparece en todos los casos, indicando que el proceso se ha llevado a cabo con éxito y que existe expresión del gen *APHVIII* en todos los casos, hecho que se corrobora con el crecimiento de los mutantes en medio selectivo con paramomicina. En la figura 5.5.B. podemos observar la reacción de PCR sobre ADNc correspondiente a estos mismos mutantes pero con los cebadores para el gen *EpDGAT1*. En este caso solo se observan bandas claras en las calles correspondientes a los mutantes 2-5 y M2, lo que significa que aunque el gen ha sido insertado en el genoma, como vimos anteriormente con la reacción de PCR sobre ADN genómico, solo hay expresión significativa del gen en estos dos mutantes. Los otros mutantes en los que no aparecen bandas, tienen insertado el gen pero su expresión es mucho más pobre o no hay expresión.

5.3.5. Análisis de la acumulación de lípidos y del perfil de ácidos grasos de los transformantes seleccionados

Tras el análisis molecular realizado a los cinco mutantes que presentaban una mayor relación U.F./U.A., se seleccionaron los dos mutantes que presentaban mayor expresión del gen *EpDGAT*, los mutantes C2-5 y M2. Se inocularon cultivos de los transformantes C2-5 y M2 y del control con una D.O. de 0,1 y se cultivaron en las condiciones estándar descritas en la sección Materiales y Métodos durante 4 días. Transcurrido este tiempo, en el que los cultivos se encontraban en la fase exponencial tardía con una D.O. de aproximadamente 1,2, parte de los cultivos se recogieron por centrifugación y se liofilizaron para el posterior análisis de ácidos grasos. La otra parte de los cultivos se recogió por centrifugación, se lavó exhaustivamente con medio TAP-N, y se resuspendió en dicho medio, cultivando los transformantes y el control en carencia de nitrógeno durante 4 días. Al cabo de los 4 días los cultivos se recogieron por centrifugación y el pellet resultante se liofilizó para el posterior análisis de ácidos grasos. En la figura 5.6. se representa la diferencia en el porcentaje del contenido en ácidos grasos totales de los transformantes seleccionados de *Chlamydomonas reinhardtii* y del cultivo control, cultivados en condiciones estándar de crecimiento en medio TAP ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 25°C) y en carencia de N.

El contenido en ácidos grasos es directamente proporcional al contenido en lípidos saponificables de la célula. Esta medida es más precisa que los métodos gravimétricos como Bligh and Dyer (*Bligh and Dyer, 1959*) y no toma en cuenta otros lípidos no saponificables como isoprenoides, carotenoides, etc que poco tienen que ver con la ruta de síntesis de los acilglicéridos.

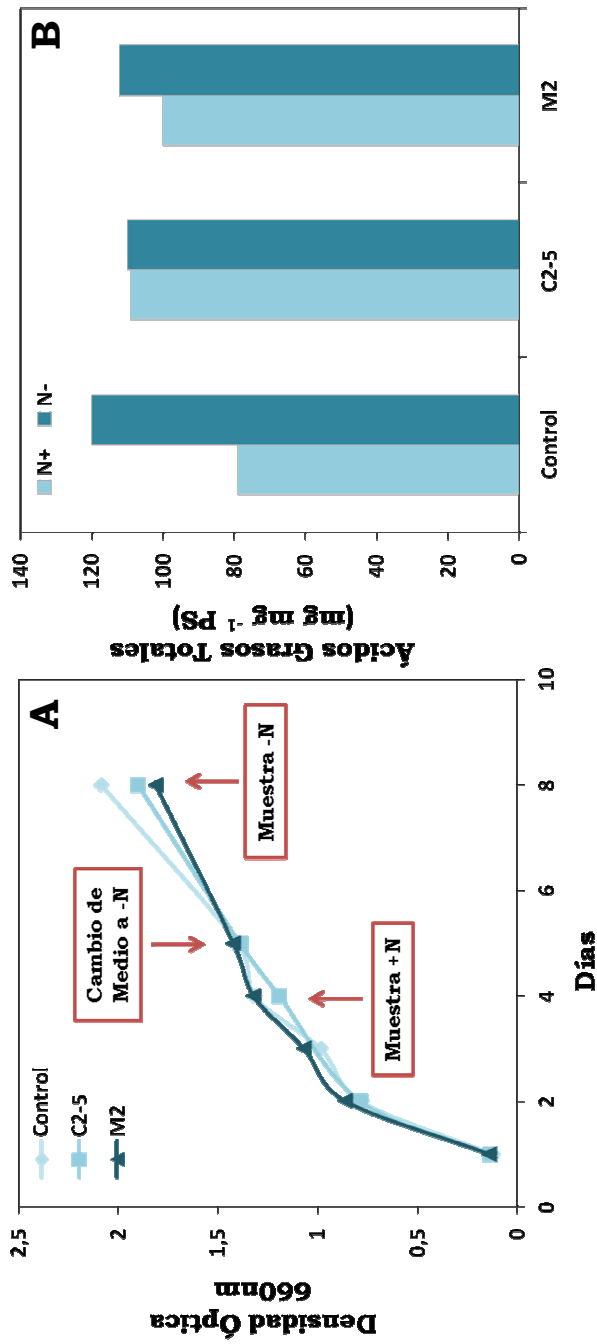


Figura 5.6. Análisis del contenido de ácidos grasos totales de *Chlamydomonas reinhardtii* 704 y los transformantes seleccionados. (A) Representación del ensayo de crecimiento realizado con *Chlamydomonas reinhardtii* 704 Control y los dos transformantes seleccionados C2-5 y M2. En el gráfico se señala los puntos importantes del ensayo en los que se tomaron las muestras estudiadas y donde se cambió el medio de cultivo de +N a -N. (B) Diagrama de barras que representa el contenido total de ácidos grasos (mg mg⁻¹ PS) en el control y los transformantes seleccionados, con y sin N.

Para el cultivo control observamos un incremento en ácidos grasos de casi un 50% tras 4 días en carencia de N. Este resultado coincide con el incremento en lípidos neutros observado por La Russa y colaboradores (*La Russa et al., 2012*), que encontraron pequeños aumentos del 15% en los lípidos totales, pero aumentos muy significativos del 50% en los lípidos neutros al someter cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* a carencia de N. Resultados similares fueron observados por Fan y colaboradores (*Fan et al., 2011*), que describen un aumento de hasta un 42% de TAGs del total de ácidos grasos de la célula de *Chlamydomonas reinhardtii* tras 48 horas de carencia de nitrógeno. Msanne y colaboradores (*Msanne et al., 2012*) también describieron un aumento de hasta un 70% de TAGs del total de ácidos grasos de la célula tras 72 horas de carencia de N en *Chlamydomonas reinhardtii*.

Al comparar el contenido en lípidos neutros del control con los transformantes M2 y C2-5 observamos que estos presentan, en condiciones normales de cultivo, contenidos en ácidos grasos mayores que el control cultivado en las mismas condiciones, con incrementos del 25 y 33%, respectivamente (Figura 5.6.). Sin embargo, no experimentan acumulación de ácidos grasos al ser sometidos a carencia de nitrógeno. Esto implica que la expresión constitutiva del gen *EpDGAT1* provoca un aumento del contenido en lípidos neutros de los transformantes incluso sin carencias nutricionales. La regulación detallada del este proceso aun se desconoce.

Este resultado es muy importante porque es la primera vez que se demuestra en *Chlamydomonas reinhardtii* que la expresión constitutiva de un gen que codifica una aciltransferasa permite incrementar el contenido lipídico de células cultivadas en condiciones estándar, sin ser sometidas a ninguna carencia nutricional o tratamiento de estrés. Estudios previos llevados a cabo por La Russa y colaboradores (*La Russa et al., 2012*) describen el aislamiento y la sobreexpresión de 3 genes *DGAT2* de *Chlamydomonas reinhardtii* en la propia microalga, y observaron que el contenido en ácidos grasos y lípidos totales de la estirpe silvestre y las líneas transgénicas que sobreexpresan el gen, son muy parecidas. Estos autores expresaron los genes *DGAT2* bajo el control del promotor PSA-D en los vectores pJR38 (*Neupert et al., 2009*) y pGenD (*Fischer and Rochaix, 2001*).

En este trabajo se ha optado por expresar el gen *DGAT1* de *Echium pitardi* bajo el control del promotor híbrido HSP70A/RbcS2 cuya alta eficiencia ha sido demostrada en *Chlamydomonas reinhardtii* (*León et al., 2004*). Como se indica en la introducción, los genes *DGAT1* y

DGAT2 son dos isoformas que no tienen ninguna homología. El papel exacto de estas isoformas y su contribución relativa a la síntesis de TAGs siguen siendo una incógnita, ya que va a depender del organismo en cuestión. En *Chlamydomonas reinhardtii* la sobreexpresión de *DGAT2* no ha incrementado su contenido en lípidos (La Russa et al., 2012), aunque esta estrategia si ha funcionado en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Niu et al., 2013) y en hojas de *Arabidopsis* (Sanjaya et al., 2013).

Prácticamente no hay cambios significativos en el perfil lipídico de los mutantes con respecto al cultivo (Figura 5.7.). Se observan ligeros incrementos en los ácidos grasos γ -linoleico (C18:3n6) y octadecatetraenoico (C18:4n3), (aunque también en el C18:1n7 y C16:1) que son abundantes en especies de boragináceas como *Echium pitardi* de donde se ha obtenido el gen, así como en otras especies de este género y también en el género *Borago*. Aunque las diferencias son muy pequeñas, se observan incrementos del 2,20% en el caso del γ -linoleico para el transformante M2 o del 0,58% para el ácido octadecatetraenoico en el mismo transformante. Este perfil podría concordar con el esperado en la sobreexpresión del gen *DGAT1* de *Echium pitardi* según describen Mañas-Fernández y colaboradores (Mañas-Fernández et al., 2009). Sin embargo, en el transformante C2-5 la sobreexpresión del mismo gen en las mismas condiciones hace que aumente ligeramente la síntesis de otros ácidos grasos como son el ácido hexadecatrienoico (C16:n4), el ácido hexadecatetraenoico (C16:4n1) y el ácido linoleico (C18:2n6). El ácido hexadecatrienoico es un ácido graso muy inusual que solo se ha descrito en algas anteriormente en la especie de microalga *Phaeodactylum tricornutum* (Desbois et al., 2008) y en macroalgas del género *Codium* (Goeke et al., 2010). Es difícil predecir las características de la enzima EpDGAT1 transgénica al ser expresada en *Chlamydomonas reinhardtii* donde puede tener distinta accesibilidad a los diferentes tipos de ácidos grasos.

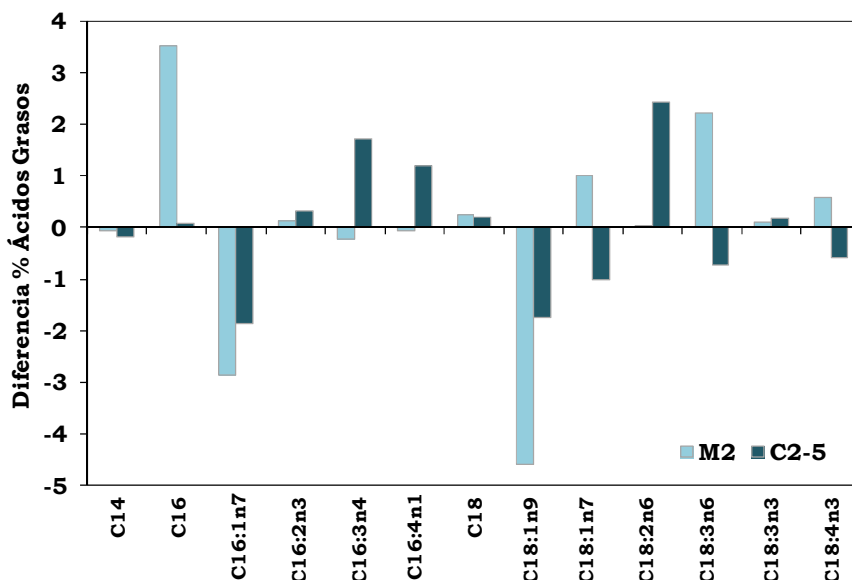


Figura 5.7. Diferencia en el porcentaje de ácidos grasos de los transformantes seleccionados con respecto al control 704 silvestre.

En plantas superiores la sobreexpresión de genes participantes en el ensamblaje de los TAGs, como por ejemplo *DGAT* o *LPAT*, resulta en un aumento significativo de la producción de lípidos en estas plantas (Radakovist et al., 2010; Sanjaya et al., 2013). Similares experimentos en *Phaeodactylum tricornutum* (Niu et al., 2013) y levaduras (Mañas-Fernández et al., 2009) también han demostrado el aumento del contenido en lípidos. Sin embargo, la sobreexpresión de tres de los cinco genes *DGAT2* de *Chlamydomonas reinhardtii* no resultaron en una acumulación de TAGs en la propia microalga, ni tampoco la alteración del perfil de ácidos grasos (La Russa et al., 2012).

Aunque *Chlamydomonas reinhardtii* no se ha considerado una microalga oleaginosa, muchos estudios de biosíntesis de lípidos y biogénesis de gránulos lipídicos se han centrado en esta microalga modelo. Recientemente, estudios comparativos de transcriptómica mediante secuenciación de alto rendimiento durante carencia de nitrógeno, mostraron como aumentaba la abundancia de transcrito del gen *DGAT* en *Chlamydomonas reinhardtii* (Lu et al., 2013; Msanne et al., 2012). Sin embargo, en estirpes “knock out” para los genes *DGAT* y *LPAT* mediante micro ARNs artificiales, causaron un descenso en el contenido de lípidos neutros (Lv et al., 2013). En una aproximación similar, Boyle

y colaboradores (*Boyle et al., 2012*) observaron una importante inducción de los genes *DGAT1*, *DGAT2-A* y *PDAT1* en *Chlamydomonas reinhardtii* bajo carencia de nitrógeno. Así *DGAT* es un buen objetivo para manipulación genética de la ruta de síntesis de TAGs.

5.4. Conclusiones

En este trabajo se ha realizado la construcción de un plásmido binario para la expresión del gen *EpDGAT1* de *Echium pitardi* bajo el control del promotor híbrido de *Chlamydomonas reinhardtii* Hsp70A/RbcS2. Este gen codifica para una Acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa, último enzima de la ruta de síntesis de TAGs. Con esta construcción se ha sobreexpresado dicho gen en la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii*, obteniendo transformantes que alcanzaron, de forma constitutiva, hasta un 30% más de TAGs. Sin embargo, en carencia de N, donde se induce la acumulación de lípidos neutros en el cultivo control de *Chlamydomonas reinhardtii*, no se han observado cambios en los niveles de TAGs de dichos transformantes.

Estos resultados indican la posibilidad de inducir la acumulación de TAGs en microalgas usando técnicas de biología molecular. Este trabajo proporciona una mayor comprensión de la importancia biológica de *DGAT* y representa una valiosa herramienta para el desarrollo de productos de alto valor añadido de microalgas.

5.5. Conclusions

In this work it was made the construction of a binary plasmid for expression of the *EpDGAT1* gene of *Echium pitardi* under the control of the hybrid promoter of *Chlamydomonas reinhardtii* Hsp70A/RbcS2. This gene encodes an acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase, the last enzyme in the TAGs biosynthesis pathway. With this construction, the gene has been overexpressed in the model microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, obtaining transformants which constitutively reached until 30% higher TAG content that the control untransformed cells. However, in N starvation, where the accumulation of neutral lipids in *Chlamydomonas reinhardtii* control culture is induces, no changes were observed in the TAGs levels of this transformants.

These results indicate the ability to induce TAGs accumulation in microalgae using molecular biology techniques. This paper provides a greater understanding of the biological significance of *DGAT* gene and represents a valuable tool for the development of high added value products in microalgae.

Conclusiones



Tras el análisis y discusión de los resultados presentados en este trabajo, podemos concluir:

1. La nueva estirpe de microalga *Picochlorum sp HM1*, aislada de las marismas del Río Odiel es, gracias a su alta tasa de crecimiento y a su habilidad para sobrevivir bajo condiciones adversas, una buena candidata para el cultivo exterior.
2. Además, su perfil lipídico y su inusualmente alto contenido en el carotenoide zeaxantina, hacen de ella una buena fuente de productos de alto valor añadido.
3. La optimización del medio de cultivo y el modo de operación para la microalga *Picochlorum sp HM1*, ha permitido conseguir cultivos con una biomasa 4 veces mayor que la del cultivo control.
4. Además, la carencia de nitrato y fosfato en el medio de cultivo permitió incrementar el contenido en lípidos neutros en 2,27 y 2 veces respectivamente, así como el contenido en ácidos grasos saturados y monoinsaturados.
5. Se ha ampliado la colección de plásmidos disponibles para la transformación de microalgas, mediante la construcción de nuevos vectores de expresión en los que los genes seleccionables están bajo el control de diferentes promotores heterólogos. Los promotores utilizados fueron el promotor NOS de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, el promotor CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor, y el promotor híbrido Hsp70A/RbcS2 de *Chlamydomonas reinhardtii*.
6. La expresión transitoria de los genes de resistencia al antibiótico paramomicina (*APHVIII*), que codifica para el aminoglicosido 3'-fosfotransferasa aislado de *Streptomyces rimosus*, y al antibiótico zeocina (*BLE y BLE-int*), que codifica para una proteína de unión a bleomicina aislado de *Streptoalloteichus hindustanus*, bajo el control de estos promotores, ha permitido optimizar la transformación genética de las microalgas marinas descritas anteriormente, aunque en ninguno de los tres casos se han conseguido transformantes estables.
7. En este trabajo se ha construido un nuevo plásmido binario para la expresión del gen *EpDGAT1*, que codifica para la enzima

diacilglicerol-acil transferasa, de la planta borraginácea *Echium pitardi* bajo el control del promotor híbrido de *Chlamydomonas reinhardtii* Hsp70A/RbcS2. Con esta construcción se ha expresado dicho gen en la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii*, obteniendo transformantes que alcanzaron hasta un 30% más de TAGs de forma constitutiva que en las correspondientes microalgas control sin transformar.

Conclusions



After completing the analysis and discussion of the results presented here, we conclude:

1. The new microalgae strain *Picochlorum* sp *HM1* isolated from the marshlands of the Odiel River is, due to its high growth rate and its ability to thrive under adverse conditions, a good candidate for outdoor cultivation.
2. Moreover, its lipid profile and its unusually high content in the carotenoid zeaxanthin, make it a good source of high added value compounds.
3. The optimization of the culture medium and the operation mode for the microalga *Picochlorum* sp *HM1* has allowed achieving a biomass content 4-fold higher than the control culture.
4. Moreover, nitrogen and phosphorus starvation allowed increasing neutral lipids content in 2.27 and 2-fold, respectively, and raising the saturated and monounsaturated fatty acids content.
5. The collection of plasmids available for transformation of microalgae has been extended by the construction of new expression vectors in which the selectable genes are under the control of different heterologous promoters. The heterologous promoters used were the nopaline synthase promoter NOS of *Agrobacterium tumefaciens*, the CaMV35S promoter of the cauliflower mosaic virus and the quimeric promoter Hsp70A/RbcS2 of *Chlamydomonas reinhardtii*.
6. Transient expression of resistance genes against the antibiotic paromomycin (*APHVIII*), which encodes for an aminoglycoside 3'-fosfotransferase isolated from *Streptomyces rimosus*, and the antibiotic zeocin (*BLE* and *BLE-int*), which encode for a bleomycin-binding protein isolated from *Streptoalloteichus hindustanus*, under the control of these promoters, has allowed to optimize genetic transformation of the marine microalgae described above, although no stable transformants have been achieved in either of the three cases.
7. In this work, a new binary plasmid for expression of the *EpDGAT1* has been constructed, diacylglycerol-acyl transferase encoding gene, from the boraginaceae crop *Echium pitardi* under the control of the hybrid promoter of *Chlamydomonas reinhardtii*

Hsp70A/RbcS2. With this construction, the gene has been expressed in the model microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, obtaining transformants which constitutively accumulate up to 30% more TAGs than the untransformed control microalgae.

Referencias



A

Acién Fernández FG, Hallb DO, Cañizares Guerreroa E, Krishna Raob K and Molina Grima E. Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor. *J Biotechnol.* 2003; 103:137–152.

Adams C, Gofrey V, Wahlen B, Seefeldt L and Bugbee B. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresour Technol.* 2013; 131:188-194.

Ahmad AL, Mat Yasin NH, Derek CJC and Lim JK. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renew Sustain Energy Rev.* 2011; 15(1):584-593.

Akbar E, Yaakob Z, Kamarudin SK, Ismail M and Salimon J. Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel feedstock. *Eur J Sci Res.* 2009; 29:396–403.

Alonso DL, Belarbi EL, Rodrigues-Ruiz J, Segura CI and Giménez A. Acyl lipids of three microalgae. *Phytochem.* 1998; 47:1473-1481.

Alves-Rodrigues A and Shao A. The science behind lutein. *Toxicol Lett.* 2004; 150:57–83.

Al-Zuhair S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels Bioprod Bioref.* 2007; 1:57-66.

Amaro HM, Barros R, Guedes AC, Sousa-Pinto I and Malcata FX. Microalgal compounds modulate carcinogenesis in the gastrointestinal tract. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(2):92-8.

Amaro HM, Guedes AC and Malcata FX. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energ.* 2011; 88:3402–3410.

Anjos M, Fernandes BD, Vicente AA, Teixeira JA and Dragone G. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol.* 2013; 139:149-154.

Apt KE and Behrens PW. Commercial developments in microalgal biotechnology. *J phycol.* 1999; 35:215-226.

Apt KE, Kroth-Pancic PG and Grossman AR. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mol Gen Genet.* 1996; 252(5):572-557.

Armstrong GA. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annu Rev Microbiol.* 1997; 51:629-659.

Arredondo BO and Vázquez-Duhalt R. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo.* 1991; 17:99-111.

Asano Y, Otsuki Y and Ugaki M. Electroporation-mediated and silicon carbide-fiber-mediated DNA delivery in *Agrosti alba L.* (Redtop). *Plant Sci.* 1991; 79:247-252.

Ausich RL and Sanders DJ. Process for the formation, isolation and purification of comestible xanthophyll crystals from plants. *US Patent.* 1997; 5:648-564.

B

Bai LL, Yin WB, Chen YH, Niu LL, Sun YR, Zhao SM, Yang FQ, Wang RR, Wu Q, Zhang XQ and Hu ZM. A new strategy to produce a defensin: stable production of mutated NP-1 in nitrate reductase-deficient *Chlorella ellipsoidea*. *PLoS One.* 2013; 8(1):e54966.

Baroli I and Niyogi KK. Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Phil Trans R Soc Lond.* 2000; 355:1385-1394.

Barrow C and Shahidi F. Marine nutraceuticals and functional foods. *CRC Press*, Taylor and Francis Group. 2008.

Basova MM. Fatty acid composition of lipids in microalgae. *Int J Algae*. 2005; 7:33-57.

Bateman JM and Purton S. Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: expression vectors and a new dominant selectable marker. *Mol Gen Genet*. 2000; 263(3):404-410.

Becker W. Microalgae in human and animal nutrition. In: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Richmond A (Ed). London: Blackwell Science. 2004:312-351.

Beer LL, Boyd ES, Peters JW and Posewitz MC. Engineering microalgae for biohydrogen and biofuel production. *Curr Opin Biotechnol*. 2009; 20:264-271.

Ben-Amontz A, Edelstein S and Avron M. Use of the beta-carotene rich algae *Dunaliella bardawill* as a source of retinol. *Br Poult Sc*. 1986; 27(4):613-619.

Ben-Amotz A and Avron M. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trens Biotechnol*. 1990; 8:121-126.

Ben-Amotz A, Tornabene TG and Thomas WH. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J Phycol*. 1985; 21:72-81.

Ben-Amotz A. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. *J Appl Phycol*. 1995; 7:65-68.

Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, Vonshak A and Cohen Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*. 2002; 60:497-503.

Blatti JL, Michaud J and Burkart MD. Engineering fatty acid biosynthesis in microalgae for sustainable biodiesel. *Curr Opin Chem Biol*. 2013; 17:496-505.

Bligh EG and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37:911-917.

Boyle NR, Page MD, Liu B, Blaby IK, Casero D, Kropat J, Cokus SJ, Hong-Hermesdorf A, Shaw J, Karpowicz SJ, Gallaher SD, Johnson S, Benning C, Pellegrini M, Grossman A and Merchant SS. Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in

nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*. *J Biol Chem*. 2012; 287(19):15811-25.

Bondioli P, Della Bella L, Rivolta G, Chini Zittelli G, Bassi N, Rodolfi L, Casini D, Prussi M, Chiaramonti D and Tredici MR. Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. *F&M-M24* and *Tetraselmis suecica* *F&M-M33*. *Bioresour Technol*. 2012; 114:567-572.

Botella-Pavía P and Rodríguez-Concepción M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiol Plant*. 2006; 126:396-381.

Borowitzka MA. Algae for aquaculture: opportunities and constraints. *J Appl Phycol*. 1997; 9:393-401.

Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otillar RP, Rayko E, Salamov A, Vandepoele K, Beszteri B, Gruber A, Heijde M, Katinka M, Mock T, Valentin K, Verret F, Berges JA, Brownlee C, Cadoret JP, Chiovitti A, Choi CJ, Coesel S, De Martino A, Detter JC, Durkin C, Falciatore A, Fournet J, Haruta M, Huysman MJ, Jenkins BD, Jiroutova K, Jorgensen RE, Joubert Y, Kaplan A, Kröger N, Kroth PG, La Roche J, Lindquist E, Lommer M, Martin-Jézéquel V, Lopez PJ, Lucas S, Mangogna M, McGinnis K, Medlin LK, Montsant A, Oudot-Le Secq MP, Napoli C, Obornik M, Parker MS, Petit JL, Porcel BM, Poulsen N, Robison M, Rychlewski L, Rynearson TA, Schmutz J, Shapiro H, Siaut M, Stanley M, Sussman MR, Taylor AR, Vardi A, von Dassow P, Vyverman W, Willis A, Wyrwicz LS, Rokhsar DS, Weissenbach J, Armbrust EV, Green BR, Van de Peer Y and Grigoriev IV. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*. 2008; 456(7219):239-244.

Brennan L and Owende P. Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sustain Energy Rev*. 2010; 14:557-577.

Breuer G, Lamers PP, Martens DE, Draaisma RB and Wijffels RH. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour Technol*. 2012; 124:217-226.

Brown AC, Knights BA and Conway E. Hydrocarbon content and its relationships to physiological state in the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*. 1969; 8:543-351.

Brown MR, Jeffrey SW, Wolkman JK and Dunstan GA. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 1997; 151(1-4):315-331.

Butnariu MV and Giuchici CV. The use of some nanoemulsions based on aqueous propolis and lycopene extract in the skin's protective mechanisms against UVA radiation. *J Nanobiotech*. 2011; 9:3.



Cai H, Liu C and Wei H. Effect of five kinds of antibiotics on the damage of *Prorocentrum minimum*. *Adv Mat Res*. 2013; 610-613:3226-3230.

Cakmak T, Angun P, Demiray YE, Ozkan AD, Elibol Z and Tekinay T. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Bioeng*. 2012; 109(8):1947-1957.

Campenni L, Nobre BP, Santos CA, Oliveira AC, Aires-Barros MR, Palavra AM and Gouveia L. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity and luminosity stress conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013; 97(3):1383-1393.

Carpentier S, Knaus M, Suh M. Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: an overview. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009; 49:313-326.

Cerutti H, Johnson AM, Gillham NW and Boynton JE. A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: integration into the nuclear genome and gene expression. *Genetics*. 1997; 145:97-110.

Cha TS, Chen CF, Yee W, Aziz A and Loh SH. Cinnamic acid, coumarin and vanillin: alternative phenolic compounds for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the unicellular green alga *Nannochloropsis* sp. *J Microbiol Methods*. 2011; 84(3):430-434.

- Cha TS**, Yee W and Aziz A. Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012; 28(4):1771-9.
- Cheirsilp B and Torpee S**. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour Technol*. 2012; 110:510-516.
- Chen JE and Smith AG**. A look at diacylglycerol acyltransferases (DGATs) in algae. *J Biotechnol*. 2012; 162(1):28-39.
- Chen M**, Tang H, Ma H, Holland TC, Simon Ng KY and Salley OS. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour Technol*. 2011; 102:1649-1655.
- Chen PY**, Wang CK, Soong SC and To KY. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning TDNA insertion from transgenic plants. *Mol Breed*. 2003; 11(4):287-293.
- Cheng R**, Ma R, Li K, Rong H, Lin X, Wang Z, Yang S and Ma Y. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Microbiol Res*. 2012; 167(3):179-86.
- Chisti Y**. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol*. 2008; 26:126-131.
- Chisti Y**. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*. 2007; 25:294-306.
- Chiu SY**, Kao CY, Tsai MT, Ong SC et al. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresour Technol*. 2009; 100:833-839.
- Cho SH**, Ji SCh, Hur SB, Bae J, Park IS and Song YCh. Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*. *Fish Sci*. 2007; 73:1050-1056.
- Choi YE**, Yun YS, Park JM and Yang JW. Determination of the time transferring cells for astaxanthin production considering two-stage process of *Haematococcus pluvialis* cultivation. *Bioresour Technol*. 2011; 102(24):11249-53.
- Corellou F**, Schwartz C, Motta JP, Djouani-Tahri el B, Sánchez F and Bouget FY. Clocks in the green lineage: comparative functional analysis

of the circadian architecture of the picoeukaryote *Ostreococcus*. *Plant Cell*. 2009; 21(11):3436-3449.

Costa JAV and de Morais MG. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresour Technol*. 2011; 102:2-9.

Courchesne NM, Parisien A, Wang B, Lan CQ. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J Biotechnol*. 2009; 141(1-2):31-41.

Couso I, Vila M, Rodríguez H, Vargas MA and León R. Overexpression of an exogenous phytoene synthase gene in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* leads to an increase in the content of carotenoids. *Biotechnol Prog*. 2011; 27(1):54-60.

Cunningham FX and Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1998; 49:557-583.

D

Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Banas A, Lee M, Sandager L, Ronne H and Stymne H. Phospholipids:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proceed Nation Acad Sci USA*. 2000; 97:6487-6492.

Das P, Aziz SS and Obbard JP. Two phase microalgae growth in the open system for enhanced lipid productivity. *Renew Energy*. 2011; 36(9):2524-2528.

De la Vega M, Díaz E, Vila M and León R. Isolation of a new strain of *Picochlorum* sp and characterization of its potential biotechnological applications. *Biotechnol Progres*. 2011; 27(6):1535-1543.

De Riso V, Raniello R, Maumus F, Rogato A, Bowler C and Falciatore A. Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(14):e96.

De Swaaf ME, de Rijk TC, Eggink G and Sijtsma L. Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivation by *Cryptocodinium cohnii*. *J Biotechnol.* 1999; 70:185-192.

Debuchy R, Purton S and Rochaix JD. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: An important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO J.* 1989; 8(10):2803-2809.

Del Campo JA, García-González M and Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 74:1163–1174.

Del Campo JA, Rodríguez H, Moreno J, Vargas MA, Rivas J and Guerrero MG. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 64:848–854.

Demirbas A. Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy.* 2007; 35:4661-4670.

Demirbas A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Convers Manag.* 2008; 49:125-130.

Demirbas A. Studies on cottonseed oil biodiesel prepared in non-catalytic SCF conditions. *Bioresour Technol.* 2008; 99:1125-1130.

Demmig-Adams B, Gilmore AM and Adams WW III. Carotenoids 3: in vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 1996; 10:403–412.

Deng R and Chow TJ. Hypolipidemic, antioxidant, and anti-inflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovasc Ther.* 2010; 28(4):33-45.

Derelle E, Ferraz C, Rombauts S, Rouzé P, Worden AZ, Robbens S, Partensky F, Degroeve S, Echeynié S, Cooke R, Saeys Y, Wuyts J, Jabbari K, Bowler C, Panaud O, Piégu B, Ball SG, Ral JP, Bouget FY, Piganeau G, De Baets B, Picard A, Delseny M, Demaille J, Van de Peer Y and Moreau H. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote

Ostreococcus tauri unveils many unique features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(31):11647-11652.

Díaz-Santos E, de la Vega M, Vila M, Vigara J and León R. Efficiency of different heterologous promoters in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Prog*. 2013; 29(2):319-318.

Dijkstra AJ. Revisiting the formation of trans isomers during partial hydrogenation of triacylglycerol oils. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2006; 108:249-264.

Dismukes GC, Carrieri D, Bennette N, Ananyev GM and Posewitz MC. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr Opin Biotechnol*. 2008; 19:235-240.

Duerr EO, Molnar A and Sato V. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *J Mar Biotechnol*. 1998; 75:65-70.

Dunahay RG, Jarvis EE, Dais SS and Roessler PG. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *App Biochem Biotechnol*. 1996; 57-58:223-231.

Dunahay TG, Adler SA and Jarvik JW. Transformation of microalgae using silicon carbide whiskers. *Methods Mol Biol*. 1997;62:503-9.

Dunahay TG, Jarvis EE and Roessler PG. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptic* and *Navicula saprophila*. *J Phycol*. 1995; 31:1004-1012.

Dunahay TG. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *Biotechniques*. 1993; 15(3):452-455,457-458.

Dyer JM and Muller RT. Development and potential of genetically engineered oilseeds. *Seed Sci Res*. 2005; 15:255-267.

E

El-Sheekh M, Abomohra AE and Hanelt D. Optimization of biomass and fatty acid production of *Scenedesmus obliquous* as a promising microalga for biodiesel production. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012; 29(5):915-922.

Emdadi D and Berland B. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. *Mar Chem.* 1989; 26(3):215-225.

Eonseon J, Polle JEW, Lee HK, Hyun SM and Chang M. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. *Microbiol Biotechnol.* 2003; 13(2):165-174.

Eskling M, Arvidsson P and Akerlund H. The xanthophylls cycle, its regulation and components. *Physiol Plant.* 1997; 100:806-816.

European Standard EN 14214. Automotive fuels-fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines-requirements and test methods. Saint-Denis: AFNOR; 2004. 1542 *Biotechnol Prog.* 2011, Vol. 27, No. 6.

F

Fakuda H, Kondo A and Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng.* 2001; 92:405-416.

Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia CH and Bowler C. Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms. *Mar Biotechnol.* 1999; 1:239-251.

- Fan J**, Andre C and Xu C. A chloroplast pathway for the novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 2011; 585(12):1985-1991.
- Fan J**, Yan Ch, Andre C, Shanklin J, Schwender J and Xu C. Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 2012; 53(8):1380-1390.
- Fassett RG and Coombes JS**. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Mar Drugs.* 2011; 9(3):447-465.
- Fawley KP and Fawley MW**. Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa. *Protist.* 2007; 158:325-336.
- Feng D**, Chen Z, Xue S and Zhang W. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresour Technol.* 2011; 102(12):6710-6716.
- Feng P**, Deng Z, Hu Z and Fan L. Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobiorreactors outdoors. *Bioresour Technol.* 2011; 102(22):10577-10584.
- Feng S**, Xie L, Liu H and Lu P. Improvement of efficiency of genetic transformation for *Dunaliella salina* by glass beads method. *Mol Biol Rep.* 2009; 36(6):1435-1439.
- Feng Y**, Li C, Zhang D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresour Technol.* 2011; 102:101-105.
- Fernández E**, Schnell R, Ranum LP, Hussey SC, Silflow CD and Lefebvre PA. Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1989; 86(17):6449-6453.
- Field CB**, Behrenfeld MJ, Randerson JT and Falkowski P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science.* 1998; 281:237-240.
- Firdous AP**, Sindhu ER, Ramnath V and Kuttan R. Anticarcinogenic activity of meso-zeaxanthin in rodents and its possible mechanism of action. *Nutr Cancer.* 2013; 65(6):850-856.

Fischer CR, Klein-Marcuschamer D and Stephanopoulos G. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab Eng.* 2008; 10:295-304.

Fischer N and Rochaix JD. The flanking regions of PsAD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genom.* 2001; 265:888-894.

Franchino M, Comino E, Bona F and Riggio VA. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere.* 2013; 92(6):738-44.

Franklin SE and Mayfield SP. Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae. *Expert Opin Biol Ther.* 2005; 5:225-235.

Fuhrmann M, Oertel W and Hegemann P. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 1999; 19(3):353-361.

Fuhrmann M. Expanding the molecular toolkit for *Chlamydomonas reinhardtii* from history to new frontiers. *Protist.* 2001; 153(4):357-364.



Garcés R and Mancha M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal Biochem.* 1993; 211:139-143.

García-González M, Moreno J, Cañavate JP, Anguis V, Prieto A, Manzano C, Florencio FJ and Guerrero MG. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern of Spain. *J Appl Phycol.* 2003; 15:177-184.

Gatenby CM, Orcutt Dm, Kreeger DA, Parker BC, Jones VA and Neves RJ. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *J Appl Phycol.* 2003, 15:1-11.

- Geng D**, Wang Y, Wang P, Li W and Sun Y. Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in *Dunaliella salina*. *J Appl Phycol*. 2003; 15:451-456.
- Ghasemi Y**, Rasoul-Amini S, Naseri AT, Montazeri-Najafabady N, Mobasher MA and Dabbagh F. Microalgae biofuel potentials. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2012; 48(2):150-68.
- Giannoulia K**, Haralampidis K, Pghosyan Z, Murphy DJ and Hatzopoulos P. Differential expression of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) genes in olive tissues. *Biochem Soc Trans*. 2000; 28:695-697.
- Go S**, Lee SJ, Jeong GT and Kim SK. Factors affecting the growth and the oil accumulation of marine microalgae, *Tetraselmis suecica*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2012; 35:145-150.
- Goksan T**, Ak I and Gokpinar S. An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *J Microbiol Biotechnol*. 2010; 20(9):1276-1282.
- Gong Y and Jiang M**. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strain to biodiesel. *Biotechnol Lett*. 2011; 33(7):1269-1284.
- Gong Y**, Guo X, Wan X, Liang Z and Jiang M. Triacylglycerol accumulation and change in fatty acid content of four marine oleaginous microalgae under nutrient limitation and at different culture age. *J Basic Microbiol*. 2013; 53:29-36.
- Gong Y**, Hu H, Gao Y, Xu X and Gao H. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011; 38:1879-1890.
- González-Fernández C**, Molinuevo-Salces B and García-González MC. Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae-bacteria consortium treating pig slurry. *Bioresour Technol*. 2011; 102(2):960-969.
- Goodson C**, Rath R, Wang ZT and Goodenough V. Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. *Eukaryotic Cell*. 2011; 10:1592-1606.

- Gorman DS and Levine RP.** Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1965; 54:1665-1669.
- Gouveia L and Oliveira AC.** Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009; 36:269–274.
- Gouveia L**, Marques AE, Silva TL and Reis A. *Neochloris oleabundans* UTEX#1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009; 36:821-826.
- Gressel J.** Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Sci*. 2008; 174:246–263.
- Griffiths MJ and Harrison STL.** Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J appl Phycol*. 2009; 21:493-507.
- Grobbelaar JU.** Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynth Res*. 2010; 106(1-2):135-144.
- Grossman RV.** Paths toward algal genomics. *Plant Physiol*. 2005; 137:410-427.
- Guerin M**, Huntley ME and Olaizola M. *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol*. 2003; 21(5):210-216.
- Guevara M**, Bastardo L, Cortez R, Arredondo-Vega B, Romero L and Gómez P. *Rhodomonas salina* (Cryptophyta) pastes as feed for *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Rev Biol Trop*. 2011; 59(4):1503-15.
- Guillard RRL and Ryther JH.** Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Denotula confervaceae* (Cleve). *Gran Can J Microbiol*. 1962; 8:229–239.
- Guo SL**, Zhao XQ, Tang Y, Wan C, Alam MA, Ho SH, Bai FW and Chang JS. Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. *J Biotechnol*. 2013; 163(1):61-8.
- Guschina IA and Harwook JL.** Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res*. 2006; 45(2):160-186.

Guzman HM, Valido AJ, Duarte LC and Presmanes KF. Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. *Aquacult Intern.* 2010; 18:189-199.



Hager A. The reversible, light-induced conversion of xanthophylls in the chloroplasts. In: Cygan FC, ed. *Pigments in Plants*. Stuttgart: Gustav Fisher, 1980. 57-59.

Hager A and Holocher K. Localization of the xanthophylls-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta.* 1994; 192(4):581-589.

Halim R, Danquah MK and Webley PA. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol Adv.* 2012; 30:709-732.

Hall LM, Taylor RB and Jones DD. Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene.* 1993; 124:75-81.

Hannon M, Gimpel J, Tran M, Rasala B and Mayfield S. Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels.* 2010; 1(5):763-784.

Harun R, Singh M, Forde GM and Danquah MK. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew Sust Energ Rev.* 2010; 14:1037-1047.

Harwood HK. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim Biophys Acta: Lipids Lipid Metab.* 1996; 1302:7-56.

Harwood JL and Jones AL. Lipid metabolism in algae. *Adv Bot Res.* 1989; 16:1-53.

Hawkins RL and Nakamura M. Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*. *Curr Microbiol.* 1999; 38(6):335-341.

He PJ, Mau B, Shen CM, Shao LM, Lee DJ and Chang JS. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production. *Bioresour Technol.* 2013; 129:177-181.

Heitzer M, Eckert A, Fuhrmann M, Griesbeck C. Influence of codon bias on the expression of foreign genes in microalgae. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 616:46-53.

Hejazi MA and Wijffels RH. Milking of microalgae. *Trends Biotechnol.* 2004; 22(4):189-194.

Henley WJ, Hironaka JL, Guillou L, Buchheim MA, Buchheim JA, Fawley MW and Fawley KP. Phylogenetic analysis of the “*Nannochloris*-like” algae and diagnoses of *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycologia.* 2004; 43:641-652.

Heredia-Arroyo T, Wei W and Hu B. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010; 162(7):1978-1995.

Ho SH, Chen CY and Chang JS. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour Technol.* 2012; 113:244-252.

Hossain ABMS, Salleh A, Boyce AN, Chowdhury P and Naquiuddin M. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *Americ J Biochem Biotechnol.* 2008; 4(3):250-254.

Hu BJ, Hu YN, Lin S, Ma WJ and Li XR. Application of lutein and zeaxanthin in nonproliferative diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol.* 2011; 4(3):303-306.

Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M and Darzins A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 2008; 54:621-639.

Huang GH, Chen F, Wei D, Zhang XW and Chen G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy.* 2010; 87:38:46.

Huerlimann R, de Nys R and Heimann K. Growth, lipid content, productivity and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnol Bioeng.* 2010; 107:245-257.



Ilioaia C, Duffi CD, Johnson MP and Ruban AV. Changes in the energy transfer pathway within photosystem II antenna induced by xanthophylls cycle activity. *J Phys Chem B*. 2013; 117(19):5841-5847.

Illman AM, Scragg AH and Shales SW. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzym Microb Technol*. 2000; 27:631-635.

Isaacson T, Ronen g, Zamir D and Hirschberg J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell*. 2002; 14:333-342.

Isleten-Hosoglu M, Ayyildiz-Tamis D, Zengin G and Elibol M. Enhanced growth and lipid accumulation by a new *Ettlia texensis* isolate under optimized photoheterotrophic condition. *Bioresour Technol*. 2013; 131:258-265.

Iwasaki I, Hu Q, Kurano N and Miyachi S. Effect of extremely high-CO₂ stress on energy distribution between photosystem I and photosystem II in a “high-CO₂” tolerant green alga. *Chlorococcum littorale* and the intolerant green alga *Stichococcus bacillaris*. *J Photochem Photobiol*. 1998; B44:184-190.



Jahns P, Latowski D and Strzalka K. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1787:3-14.

Jaime-Ceballos B, Villerreal-Colmenares H, García-Galano T, Civera-Cerecero R and Gaxiola-Cortes G. Empleo del polvo de *Spirulina platensis* en la alimentación de *Zoeas* y *Mysis* de *Litopenaeus schmitti* (Pérez Farfante y Kensley, 1997). In: Cruzo Suarez LE, Ricque Marie D, Nieto López MG, Villareal D, Scholz U y González M. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora, México. 2004.

Jako C, Kumar A, Wei Y, Zou J, Barton DL, Giblin EM, Covello PS and Taylor DC. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol.* 2001; 126(2):861-74.

James GO, Hocart CH, Hillier W, Chen H, Kordbacheh F, Dean Price G and Djordjevic MA. Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation. *Bioresour Technol.* 2011; 102:3343-3351.

Janaun J and Ellis N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. *Renew Sustain Energy Rev.* 2010; 14(4):1312-1320.

Jarvis EE and Brown LM. Transient expression of firefly luciferase in protoplasts of green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Curr Genet.* 1991; 19:317-321.

Jiang Y, Yoshida T and Quigg A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. *Plant Physiol Biochem.* 2012; 5:70-77.

Jin ES, Juergen E, Hong KL Sang M and Man C. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. *J Microbiol Biotechnol.* 2003; 13(2):165-174.

Johnson MK, Johnson EJ, MacElroy RD, Speer HL and Bruff BS. Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *J Bacteriol.* 1968; 95:1461-1468.

Juan JC, Kartika DA, Wu TY and Hin TY. Biodiesel production from jatropha oil by catalytic and non-catalytic approaches: an overview. *Bioresour Technol.* 2011; 102(2):452-460.



Kadam KL. Microalgae production from power plant flue gas; environmental implication on a life cycle basis. NREL/TP-510-29417. Colorado, USA; National Renewable Energy Laboratory. 2001.

Kadam KL. Power plant flue gas as a source of CO₂ for microalgae cultivation: economic impact of different process options. *Energy Conv Manag.* 1997; 28(Suppl):505-510.

Kaeppler HF, Gu W, Somers DA, Rines HW and Cockburn AF. Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Reports.* 1990; 9:415-418.

Kaeppler HF, Somers DA, Rines HW and Cockburn AF. Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells. *TAG Theor and Appl Genet.* 1992; 84:560-566.

Kafuku G and Mbarawa M. Biodiesel production from *Croton megalocarpus* oil and its process optimization. *Fuel.* 2010; 89:2556-2560.

Karmee SK and Chadha A. Preparation of biodiesel from crude oil of *Pongamia pinnata*. *Bioresour Technol.* 2005; 96(13):938-954.

Kates M. Definition and classification of lipids. Techniques of lipidology isolation, analysis, and identification of lipids. Amsterdam: Elsevier Science Publisher. 1986.

Kates M. Techniques of lipidology: isolation, analysis, and identification of lipids. Elsevier, Amsterdam. 1988.

Kennedy EP. Biosynthesis of complex lipids. *Feder Proceed Amer Soci Exp Biol.* 1961; 20(4):934-940.

Khozin-Goldberg I and Cohen Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry.* 2006; 67:696-701.

Kilian O, Benemann CS, Niyogi KK and Vick b. High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis sp.* *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(52):21265-21269.

Kim DH, Kim YT, Cho JJ, Bae JH, Hur SB, Hwang I and Choi TJ. Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*. *Mar Biotechnol*. 2002; 4:63-73.

Kindle KL, Schnell RA, Fernández E and Lefebvre PA. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J Cell Biol*. 1989; 109(6):2589-2601.

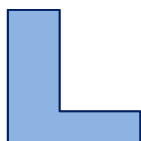
Kindle KL. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:1228-1232.

Kindle KL. Nuclear transformation: technology and applications. In *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix JD et al., eds), Kluwer Academic Publishers. 1998, pp.41-61.

Kitano M, Matsukawa R and Karube I. Enhanced eicosapentaenoic production by *Navicula saprophils*. *J Appl Phycol*. 1998; 10:101-105.

Kresge N, Simoni RD and Hill RL. The Kennedy pathway for phospholipid synthesis: the work of Eugene Kennedy. *J Biological Chem*. 2005; 280.

Krisnangkura K. A simple method for estimation of cetane index of vegetable oil methyl esters. *J Am Oil Chem Soc*. 1986; 63:552-553.



Lam Mk and Lee KT. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnol Adv*. 2012; 30(3):673-690.

Langridge P, Brown JWS, Pintor-Tor JA, Feix G, Neuhaus G, Neuhaus-Url G and Schweiger HG. Expression of zein genes in *Acetabulara mediterranea*. *Eur J Cell Bio*. 1985; 39:257-264.

- Lardizabal K**, Effertz R, Levering C, Mai J, Pedroso MC, Jury T, Aasen E, Gruys K, Bennett K. Expression of *Umbelopsis ramanniana* DGAT2A in seed increases oil in soybean. *Plant Physiol.* 2008; 148(1):89-96.
- La Russa M**, Bogen C, Uhmeyer A, Doebbe A, Filippone E, Kruse O, Mussnug JH. Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol.* 2012; 162(1):13-20.
- Lawlor D**. Accessory light-harvesting pigments. In: Photosynthesis 3rd E., BIOS Scientific Publishers Limited, Springer-Verlag New York Inc., N. York, USA. 2001, pp 43-47.
- Lee YK and Zhang DH**. Production of astaxanthin by *Haematococcus*. In: Cohen Z (Ed.). Chemicals from Microalgae. Taylor and Francis, London. 1999, pp: 173-190.
- Lehner R and Kuksis A**. Triacylglycerol synthesis by an sn-1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes. *J Biological Chem.* 1993; 268:8781-8786.
- Lehner R and Kuksis A**. Biosynthesis of triacylglycerols. *Prog Lipid Res.* 1996; 35:169-201.
- León R and Fernández E**. Nuclear transformation of eukaryotic microalgae: historical overview, achievements and problems. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 616:1-11.
- León R**, Fernández E and Couso I. Metabolic engineering of ketocarotenoids biosynthesis in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol.* 2007; 130:143-152.
- León R**, González D, Galván A and Fernández E. Transgenic microalgae as green cell factories. *Trends Biotechnol.* 2004; 22(1):45-52.
- Li D**, Han X, Zuo J, Xie L, He R, Gao J, Chang L, Yuan L and Cao M. Construction of rice site-specific chloroplast transformation vector and transient expression of *EGFP* gene in *Dunaliella salina*. *J Biomed Nanotechnol.* 2011; 7(6):801-806.
- Li J**, Zhu D, Niu J, Shen S and Wang G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluviiales*. *Biotechnol Adv.* 2011; 29(6):568-574.

Li SS and Tsai HJ. Transgenic microalgae as a non-antibiotic bactericide producer to defend against bacterial pathogen infection in the fish digestive tract. *Fish Shellfish Immunol.* 2009; 26:316-325.

Li X, Hu HY and Yang J. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in a secondary effluent. *New Biotechnol.* 2010; 27(1):59-63.

Li XF, Xu H, Wu QY. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 2007; 98(4):764-771.

Li Y, Han D, Hu G, Dauville D, Sommerfeld M, Ball S and Hu Q. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorilase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metab Eng.* 2010; 12:387-391.

Li Y, Han D, Hu G, Sommerfeld M and Hu Q. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Bioeng.* 2010; 107:258-268.

Li Y, Han D, Sommerfeld M and Hu Q. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresour Technol.* 2011; 102:123-129.

Li Y, Horsman M, Wang B, Wu N and Lan CQ. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 81:629-636.

Li Y, Horsman M, Wu N, Lan CQ and Dubois-Calero N. Biofuels from microalgae. *Biotechnol Prog.* 2008; 24:815-820.

Li ZX, Sun Y, Liu ZX, Song RT and Xu ZX. Transient expression of foreign *BLE* gene in *Dunaliella salina*. *Shi Yan Sheng Wu Sue Boo.* 2005; 38(5):411-416.

Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, DeBono A, Durrett TP, Franke RB, Graham IA, Katayama K, Kelly AA, Larson T, Markham JE, Miguel M, Molina I, Nishida I, Rowland O, Samuels L, Schmid KM, Wada H, Welti R, Xu C, Zallot R and Ohlrogge J. Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis Book.* 2013; 11:e1061.

- Liang Y**, Sarkany N and Cui Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett.* 2009; 31:1043-1049.
- Lim S and Teong LK.** Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: an overview. *Renew Sustain Energy Rev.* 2010; 14(3):938-954.
- Liu B and Zhao Z.** Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J Chem Technol Biotechnol.* 2007; 82:775-780.
- Liu K**, Li J, Qiao H, Lin A and Wang G. Immobilization of *Chlorella sorokiniana* GXNN 01 in alginate for removal of N and P from synthetic wastewater. *Bioresour Technol.* 2012; 114:26-32.
- Liu Q**, Siloto RM, Lehner R, Stone SJ and Weselake RJ. Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase. Molecular biology, biochemistry and biotechnology. *Process Lipid Res.* 2012; 51(4):350-377.
- Lohuis MR and Miller DJ.** Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs. *Plant J.* 1998; 13:427-435.
- Loppes R**, Radoux M, Ohresser MC and Matagne RF. Transcriptional regulation of the Nial gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the Nial promoter. *Plant Mol Biol.* 1999; 41:701-711.
- Lorenz RT and Cysewski GR.** Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 2000; 18:433-435.
- Lv H**, Qu G, Qi X, Lu L, Tian C, Ma Y. Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* during the process of lipid accumulation. *Genomics.* 2013; 101(4):229-37.
- Lü YM**, Jiang GZ, Niu XL, Hou GQ, Zhang GX and Xue LX. Cloning and functional analyses of two carbonic anhydrase genes from *Dunaliella salina*. *Acta Genet Sin.* 2005; 31:1157-1166.

Lumbreras V, Stevens DR and Purton S. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J.* 1998; 14:441-447.

Lung SC and Waselake RJ. Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids.* 2006; 41:1073-1088.



Ma F and Hanna MA. Biodiesel production: a review. *Bioresour Technol.* 1999; 70:1-15.

Maeda K, Owada M, KimuraN, Omata K and Karube I. CO₂ fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energ Conv Manag.* 1995; 36(6-9):717-720.

Mañas-Fernández A, Vilches-Ferrán M, Garrido-Cárdenas JA, Belarbi EH, Alonso DL and García-Maroto F. Cloning and molecular characterization of the Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1) gene from *Echium*. *Lipids.* 2009; 44:555-568.

Mansour MP, Volkman JK and Blackburn SI. The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium sp* in batch culture. *Phytochemistry.* 2003; 63:145-153.

Markou G and Nerantzis E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnol Adv.* 2013; 31(8):1532-1542.

Mata TM, Martins AA and Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sustain Energ Rev.* 2010; 14:217-232.

Melis A. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Sci.* 2009; 177:272-280.

Meng X, Yang X, Xu X, Zhang L, Nie Q and Xian M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energy*. 2009; 34:1-5.

Merchant SS, Kropat J, Liu B, Shaw J and Warakanont J. TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Curr Opin Biotechnol*. 2011; 23:352-363.

Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Maréchal-Drouard L, Marshall WF, Qu LH, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren W, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G, Chen CL, Cognat V, Croft MT, Dent R, Dutcher s, Fernández E, Fukuzawa H, González-Ballester D, González-Halphen D, Hallmann A, Hnikenne M, Hippler M, Inwood W, Jabbari K, Kalanon M, Kuras R, Lefebvre PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meier I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, NOvoselov SV, Pulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral JP, Riaño-Pachón DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen CJ, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang P, Ball S, Bowler C, Dieckmann Cl, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield s, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, LUo Y, Martínez D, Ngau Wc, Otilar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou K, Grigoriev IV, Rokhsar DS and Grossman AR. The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*. 2007; 318(5848):245-250.

Merzlyak MN, Chivkunova OB, Gorelova OA, Rashetnikova IV et al. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incise* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J Phycol*. 2007; 43:833-843.

Metzger P and Largeau C. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related other lipids. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 66:486-496.

Mišurcová L, Ambrožová J and Samek D. Seaweed lipids as nutraceuticals. *Adv Food Nutr Res*. 2011; 64:339-355.

Miyahara M, Aoi M, Inoue-Kashino N, Kashino Y and Ifuku K. Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by multi-pulse electroporation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013; 77(4):874-6.

Moeller SM, Jacques PF and Blumberg JB. The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *J Ann Coll Nutr*. 2000; 19:522S-527S.

Mourente G, Lubián LM and Odriozola JM. Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. *Hydrobiologia*. 1990; 203:147-154.

Msanne J, Xu D, Konda AR, Casas-Mollano JA, Awada T, Cahoon EB and Cerutti H. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry*. 2012; 75:50-59.

Mussnug JH, Klassen V, Schlüter A and Kruser O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J Biotechnol*. 2010; 150:51-56.

Mutanda T, Ramesh D, Karthikeyan S, Kumari S, Anandraj A and Bux F. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresour Technol*. 2011; 102:50-57.

Muto M, Fukuda Y, Nemoto M, Yoshino T, Matsunaga T and Tanaka T. Establishment of a genetic transformation system for the marine pennate diatom *Fistulifera* sp. strain JPCC DA0580--a high triglyceride producer. *Mar Biotechnol* (NY). 2013; 15(1):48-55.



Negoro M, Shioji N, Miyamoto K and Miura Y. Growth of microalgae in high CO₂ gas and effects of SOX and NOX. *Appl Biochem Biotechnol*. 1991; 28-29:877-886.

Nelson DL and Cox MM. Lipids. In: Lehninger Principles of Biochemistry 3rd ed. Worth Publishing: New York. 2000

Neupert J, Karcher D and Bock R. Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *Plant J.* 2009; 57:1140-1150.

Niu YF, Zhang MH, Xie WH, Li JN, Gao YF, Yang WD, Liu JS and Li HY. A new inducible expression system in a transformed green alga, *Chlorella vulgaris*. *Genet Mol Res.* 2011; 10(4):3427-34.

Niyogi KK, Björkman O and Grossman RA. *Chlamydomonas* xanthophylls cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Cell.* 1997; 9:1369-1380.

Nishino H, Murakoshi M, Li T, Manabu T, Masashi K, Motohiro K, Mou WY, Saeri W, Mitsuharu M, Yasuhito O, Shingo Y, Yoshiko S and Kenji J. Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* 2002; 21:257-264.

Norsker NH, Barbosa MJ, Vermuë MH and Wijffels RH. Microalgal production—a close look at the economics. *Biotechnol Adv.* 2011; 29:24-27.



Oelkers P, Tinkelenberg A, Erdeniz N, Cromley D, Billheimer JT and Sturley SL. A lecithin cholesterol acyltransferase-like gene mediates diacylglycerol esterification in yeast. *Lipids.* 2006; 41:15609-15612.

Olaizola M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol Eng.* 2003; 20:459-466.

Ota M, Kato Y, Watanabe H, Watanabe M, Sato Y and Smith R. Fatty acid production from a highly CO₂ tolerant alga, *Chlorococcum littorale*, in the presence of inorganic carbon and nitrate. *Bioresour Technol.* 2009; 100:5237-5242.

Otsuki T. A study for the biological CO₂ fixation and utilization system. *Sci Total Environ.* 2001; 277(1-3):21-25.



Park SJ, Choi YE, Kim EJ, Park WK, Kim CW and Yang JW. Serial optimization of biomass production using microalga *Nannochloris oculata* and corresponding lipid biosynthesis. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2012; 35:3-9.

Parker PL, van Baalen C and Maurer L. Fatty acids in eleven species of blue-green algae: geochemical significance. *Science.* 1967; 155:707-708.

Peeler TC, Stephenson MB, Einsphar KJ and Thomposon GA. Lipid characterization of enriched plasma membrane fraction of *Dunaliella salina* grown in media of varying salinity. *Plant Physiol.* 1989; 89:970-976.

Pérez-García O, Escalante FM, de-Bashan LE and Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.* 2011; 45(1):11-36.

Perry HJ, Bligny R, Gout e and Harwood JL. Changes in Kennedy pathway intermediates associated with increased triacylglycerol synthesis in oil-seed rape. *Phytochemistry.* 1999; 52:799-804.

Pinto AC, Guarieiro LLN, Rezende MJC, Ribeiro NM, Torres EA and Lopes WA. Biodiesel: an overview. *J Braz Chem Soc.* 2005; 16(6b):1313-1330.

Porath JB, Gokhman I, Lers A, Levy A and Zamir A. Developing a transformation system in *Dunaliella*. *Phycologia.* 1997; 36(Suppl):89.

Posbeittenmiller D, Jaworski JG and Ohlrogge JB. In vivo pools of free and acylated acyl carrier proteins in spinach – evidence for sites of regulation of fatty acid biosynthesis. *J Biol Chem.* 1991; 266:1858-1865.

Posbeittenmiller D, Jaworski JG and Ohlrogge JB. Regulation of plant fatty acid biosynthesis – analysis of acyl-coenzyme A and acyl-acyl-carrier-protein substrate in the yeast fatty acid synthase. *Plant Physiol.* 1992; 100:923-930.

Pulz O and Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 65:635-648.

Purton S. Tools and techniques for chloroplast transformation of *Chlamydomonas*. *Adv Exp Med Biol.* 2007

Q

Qin S, Lin H and Jiang P. Advances in genetic engineering of marine algae. *Biotechnol Adv.* 2012; 30(6):1602-1613.

R

Radakovits R, Jinkerson RE, Darzans A and Posewits MC. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryot Cell.* 2010; 9(4):486-501.

Radakovits R, Eduafo PM and Posewitz MC. Genetic engineering of fatty acid chain length in *Phaeodactylum tricornutum*. *Metab Eng.* 2011; 13:89-95.

Radakovits R, Jinkerson RE, Fuerstenberg SI, Tae H, Settlinge RE, Boore JL and Posewitz MC. Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nat Commun.* 2012; 3:686.

Raja R, Hemaiswarya S, Kumar NA, Sridhar S and Rengasamy R. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit Rev Microbiol*. 2008; 34(2):77-88.

Rajamani S, Siripornadulsil S, Falcao V, Torres M, Colepiccolo P and Sayre R. Phycoremediation of heavy metals using transgenic microalgae. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 616:99-109.

Rani SH, Krishna THA, Saha S, Negi AS and Rajasekharan R. Defective in cuticular ridges (CDR) or *Arabidopsis thaliana*, a gene associated with surface cuticle formation, encodes a soluble diacylglycerol acyltransferase. *J Biological Chem*. 2010; 285:38337-38347.

Rao AR, Dayananda C, Sarada R, Shamala TR and Ravishankar GA. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour Technol*. 2007; 98:560-564.

Rasala BA and Mayfield SP. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. *Bioengin Bugs*. 2011; 2:50-54.

Rashid U, Anwar F Moser BR and Knothe G. *Moringa oleifera* oil: a possible source of biodiesel. *Bioresour Technol*. 2008; 99(17):8175-8179.

Ratha SK and Prasanna R. Bioprospecting microalgae as potential sources of "green energy"--challenges and perspectives. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2012; 48(2):133-49.

Reitan KI, Rainuzzo JR and Olsen Y. Effect of nutrient limitation of fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J Phycol*. 1994; 30:972-979.

Renaud SM, Thinh LV and Parry DL. The gross composition and fatty acids composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*. 1999; 170:147-159.

Ribaya-Mercado JD and Blumberg JB. Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *J Am Coll Nutr*. 2004; 23:567-587.

Richmond A. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. *J Appl Phycol*. 2000; 12:441-451.

Richmond A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, first ed. Blackwell Science, Oxford. 2004.

- Richmond A.** Large scale microalgal culture and applications. In: Round M and Chapman S, ed. "Progress in Phycological Research". Biopress Ltd. 1990; 269-330.
- Riekhof WR and Benning C.** Glycerolipid biosynthesis. In: The Chlamydomonas Sourcebook: Organellar and Metabolic Processes, Ed 2, Vol 2 Elsevier. Dordrecht, The Netherlands,.2009, pp 41–68.
- Rise M,** Cohen E, Vishkautsan M, Cojocaru M, Gottlieb HE and Arad S. Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. *J Plant Physiol.* 1994; 144(3):287-292.
- Rittmann BE.** Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol Bioeng.* 2008; 100:203-212.
- Rocha JMS,** García JEC and Henriques MHF. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomol Eng.* 2003; 20:237–242.
- Rock CO and Jackowski S.** Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 292:1155-1166.
- Rodolfi L,** Zitteli GC, Bassi N, Podorani G, Biondi N, Bonini G and Tredici MR. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 2009; 102:100–112.
- Rodríguez-Ruiz J,** Belarbi EH, Sánchez JLG and Alonso DL. Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnol Tech.* 1998; 12:689-691.
- Rodríguez-Sainz M,** de la Fuente JL and Barredo JL. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 88:645–658.
- Roessler PG.** Changes in the activities of various lipid and carbohydrates biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. *Arch Biochem Biophys.* 1988; 267:521-528.
- Rosales-Mendoza S,** Paz-Maldonado LM and Soria-Guerra RE. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Rep.* 2012; 31(3):479-494.

Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson L and Betenbaugh MJ. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr Opin Biotechnol*. 2008; 19:430-436.

Ruecker O, Zillner K, Groebner-Ferreira R and Heitzer M. Gaussia-luciferase as a sensitive reporter gene for monitorin promoter activity in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genomics*. 2008; 280(2):153-162.



Saade A and Bowler C. Molecular tools for discovering the secret of diatoms. *BioScience*. 2009; 59:757-765.

Saha S, Enugutti B, Rajakumari S and Rajasekharan R. Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oilseeds. Molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiol*. 2006; 141:1533-1543.

Sambrook J and Russell DW. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3rd ed.; Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, New York, USA. 2001.

San CT, Yee W and Ahmad A. Assesment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of microalgae. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012; 28(4):1777-1779.

Sandmann G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur J Biochem*. 1994; 223:7-24.

Sandmann G, Römer S and Fraser PD. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metab Eng*. 2006; 8:291-302.

Santos CA, Ferreira ME, Lopes da Silva T, Gouveia L Novais JM and Reis AA. A symbiotic gas exchange between bioreactors enhances microalgal biomass and lipid productivities: taking advantage of complementary nutritional modes. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011; 38(8):909-917.

- Sanjaya**, Miller R, Durrett TP, Kosma DK, Lydic TA, Muthan B, Koo AJ, Bukhman YV, Reid GE, Howe GA, Ohlrogge J and Benning C. Altered lipid composition and enhanced nutritional value of *Arabidopsis* leaves following introduction of an algal diacylglycerol acyltransferase 2. *Plant Cell*. 2013; 25(2):677-93.
- Schenk PM**, Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussgnug JH, Posten C, Kruse O and Hankamer B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg Res*. 2008; 1:20-43.
- Schroda M**, Beck CF and Vallon O. Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant J*. 2002; 31(4):445-455.
- Schroda M**. The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. *Photosynth Res*. 2004; 82(3):221-240.
- Scott SA**, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ and Smith AG. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Op Biotechnol*. 2010; 21:1-10.
- Scragg AH**, Illman AM, Carden A and Shales SW. Growth of microalgae with increased calorific value in a tubular bioreactor. *Biomass Bioenergy*. 2002; 23:67-73.
- Semba RD and Dagnelie G**. Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health. *Med Hypotheses*. 2003; 61:465-472.
- Settlage SB**, Kwanyuen P and Wilson RF. Relation between diacylglycerol acyltransferase activity and oil concentration in soybean. *J Am Oil Chem Soc*. 1998; 75:775-781.
- Sforza E**, Bertucco A, Morosinotto T and Giacometti GM. Vegetal oil from microalgae: species selection and optimization. *Chem Eng Trans*. 2010; 2:199-204.
- Shahid EM and Jamal J**. Production of biodiesel: a technical review. *Renew Sustain Energy Rev*. 2011; 15(9):4732-4745.
- Sharma YC**, Singh B and Upadhyay SN. Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. *Fuel*. 2008; 87:2355-2373.

Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P and Weissman J. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: biodiesel from algae; Close-Out Report. NREL Report No. 1998.TP-580-24190.

Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A and Usuda H. High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics*. 1998; 148:1821-1828.

Shockey JM, Gidda SK, Chapital DC, Kuan JC, Dhanoa PK, Bland JM, Rothstein SJ, Mullen RT and Dyer JM. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell*. 2006; 18:2294-2313.

Sialve B, Bernet N and Bernard O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol Adv*. 2009; 27:409-416.

Siaut M, Cuiné S, Cagnon C, Fessler B, Nguyen M, Carrier P, Beyly A, Beisson F, Trantaphylidès C, Li-Beisson Y and Peltier G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BCN Biotechnol*. 2011; 11:7.

Siaut M, Heijde M, Mangogna M, Montsant A, Coesel S, Allen A, Manfredonia A, Falciatore A and Bowler C. Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricornutum*. *Gene*. 2007; 406(1-2):23-35.

Silitonga AS, Atabani AE, Mahlia TMI, Masjuki HH, Badruddin IA and Mekhilef S. A review on prospect of *Jatropha curcas* for biodiesel in Indonesia. *Renew Sustain Energy Rev*. 2011; 15:3733-3756.

Singh A, Nigam PS and Murphy JD. Mechanism and challenges in commercialization of algal biofuels. *Bioresour Technol*. 2011; 102:26-34.

Singh SP and Singh D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review. *Renew Sustain Energy Rev*. 2010; 14(1):200-216.

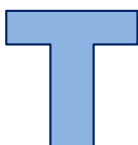
Siripornadulsil S, Dabrowski K and Sayre R. Microalgal vaccines. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 616:122-128.

- Sizova I**, Fuhrmann M and Hegemann P. A *Streptomyces rimosus* APHVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*. 2001; 277:221-229.
- Solovchenko A and Khozin-Goldberg I**. High-CO₂ tolerance in microalgae: possible mechanisms and implications for biotechnology and bioremediation. *Biotechnol Lett*. 2013. 35(11):1745-1752.
- Soontornchainboom W**, Joo SS and Kim SM. Anti-inflammatory effects of violaxanthin isolated from microalga *Chlorella ellipsoidea* in RAW 2647 macrophages. *Biol Pharm Bull*. 2012; 35(7):1137-1144.
- South GR and Whittick A**. Introduction to Phycology. Blakwell Scientific Publication, UK. 1987.
- Spolaore P**, Joannis-Cassan C, Duran E and Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioengineer*. 2006; 101(2):87-96.
- Stahl W and Sies H**. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1740(2):101-107.
- Stephenson AI**, Dennis JS, Howe CJ, Scott SA and Smith AG. Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels*. 2010; 1:47-58.
- Stevens DR**, Rochaix JD and Purton S. The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet*. 1996; 251:23-30.
- Stobart K**, Mancha M, Lenman M, Dhlqwist A and Stymne S. Triacylglycerols are synthesized and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Planta*. 1997; 203: 58-66.
- Streinbrenner J and Sandmann G**. Transformation of the green algae *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(12):7477-7484.
- Sun Y**, Gao X, Li Q, Zhang Q and Xu Z. Functional complementation of a nitrate reductase defective mutant of a green alga *Dunaliella viridis* by introducing the nitrate reductase gene. *Gene*. 2006, 377:140-149.

Sun Y, Yang Z, Gao X, Li Q, Zhang Q and Xu Z. Expression of foreign genes in *Dunaliella* by electroporation. *Mol Biol.* 2005; 30:185-192.

Sunkireddy P, Jha SN, Kanwar JR and Yadav SC. Natural antioxidant biomolecules promises future nanomedicine based therapy for cataract. *Coll Surf B Biointerface.* 2013; 112:554-562.

Sydney EB, da Silva TE, Tokarski A, Novak AC, de Carvalho JC, Woiciecohwski AL, Larroche C and Soccol CR. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Appl Energ.* 2011; 88:3291-3294.



Tabatabaei M, Tohidfar M, Jouzani GS, Safarnejad M and Pzouki M. Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Gurute of bioenergy in Iran. *Renew Sustain Energy Rev.* 2011; 15:1918-1927.

Takagi M, Watanabe K, Yamaberi K and Yoshida T. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris sp. UTEX LB1999*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000; 54:112-117.

Tan C, Quin S, Zhang Q, Jiang P and Zhao F. Establisment of a microparticle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*. *J Microbiol.* 2005; 43(4):361-365.

Tang H, Chen M, García ME, Abunasser N, Nq KY and Salley SO. Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production. *Biotechnol Bioeng.* 2011; 108(10):2280-2287.

Teng PI, Dichiarra MR, Kömüves LG, Abe K, Quertermous T and Topper JN. Inducible and selective transgene expression in murine vascular endothelium. *Physiol Genomics.* 2002; 11(2):99-107.

Torres MA, Barros MP, Campos SC, Pinto E, Rajamani S, Sayre RT and Colepicolo P. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008; 71(1):1-15.

Tredici MR. Photobiology of microalgae mass culture: understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels*. 2010; 1:143–162.

Trejo-Solis C, Pedraza-Chaverri J, Torres-Ramos M, Jiménez-Farfán D, Cruz-Salgado A, Serrano-García N, Osorio-Rico L and Solero J. Multiple molecular and cellular mechanism of action of lycopene in cancer inhibition. *Evid Based Compleme Alternat Med*. 2013; 705121.

Triki S, Ben Hamida J and Mazliak P. Diacylglycerol acyl-transferase in maturing sunflower seeds. *Biochem Soc Trans*. 2000; 28:689-692.

Turchetto-Zolet AC, Maraschin FS, de Moraes GL, Cagliari A, Andrade CMB, Margis-Pinheiro M and Margis R. Evolutionary viuw of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferasa (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. *BMC Evol Biol*. 2011; 11:263.



Van Ooijen G, Knox K, Kis K, Bouget FY and Millar AJ. Genomic transformation of the picoeukaryote *Ostreococcus tauri*. *J Vis Exp*. 2012; (65):e4074.

Van Vooren G, Le Grand F, Legrand J, Cuiné S, Pertier G and Pruvost J. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresour Technol*. 2012; 124:421-432.

Vasudevan PT and Briggs M. Biodiesel production – current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2008; 35:421-430.

Vázquez-Duhalt R and Greppin H. Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*. *Phytochem*. 1987; 26:885-889.

Vila M, Couso I and León R. Carotenoid content in mutants of the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* with low expression levels of phytoene desaturase. *Process Biochem*. 2008; 42:1147–1152.

Volkman JK, Jeffrey SW, Nichols PD, Rogers GI and Garland CD. Fatty acids and lipid classes of 10 species of microalgae used in mariculture. *J Exp Mar Biol Ecol.* 1989; 128:219–240.



Wagner M, Hoppe K, Czabany T, Heilmann M, Daun G, Feussner I and Fulda M. Identification and characterization of an acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri*. *Plant Physiol Biochem.* 2010; 48:407-416.

Walker TL, Becker DK and Collet C. Characterisation of the *Dunaliella tertiolecta* RbcS genes and their promoter activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Rep.* 2005a; 23:727-735.

Walker TL, Collet C and Purton S. Algal transgenics in the genomic era. *J Phycol.* 2005b; 41:1077-1093.

Walker TL, Purton S, Becker DK and Collet C. Microalgae as bioreactor. *Plant Cell Rep.* 2005c; 24:629-641.

Wan M, Liu P, Xia J, Rosenberg JN, Oyler GA, Betenbaugh MJ, Nie Z and Qiu G. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 91(3):835-844.

Wang B, Li Y, Wu N and Lan CQ. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 79(5):707-718.

Wang C, Wang Y, Su Q and Gao X. Transient expression of the *GUS* gene in a unicellular marine green alga, *Chlorella sp. MACC/C95*, via electroporation. *Biotechnol Bioprocess Engin.* 2007; 12:180-183.

Wang H, Hu Z, Xiao B, Cheng Q and Li F. Ammonium nitrogen removal in batch cultures treating digested piggery wastewater with microalgae *Oedogonium sp.* *Water Sci Technol.* 2013; 68(2):269-75.

Wang R, Hanna MA, Zhou WW, Bhadury PS, Chen Q, Song BA and Yang S. Production and selected fuel properties of biodiesel from

promising non-edible oils: *Euphorbia lathyris* L, *Sapium sebiferum* L, and *Jatropha curcas* L. *Bioresour Technol.* 2011; 102(2):1194-1199.

Wang ZT, Ullrich N, Joo S, Waffenschmidt S and Goodenough U. Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starch-less *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell.* 2009; 8:1856–1868.

Waters AD, Fraser TCM, Chatrattanakunchar S and Stobart AK. Membrane-bound SN-2-monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) is involved in triacylglycerol synthesis. The presence and characterization of a novel function and its role in triacylglycerol assembly in plants and fungi. *Adv Res Plant Lipids.* 2003; 151-154.

Whitehead AJ, Mares JA and Danis RP. Macular pigment: a review of current knowledge. *Arch Ophthalmol.* 2006; 124:1038–1045.

Wijffels RH and Barbosa MI. An outlook on microalgal biofuels. *Science.* 2010; 329:796-799.

Wijffels RH, Kruse O and Hellingwerf KJ. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Curr Opin Biotechnol.* 2013; 24(3):405-413.

Witt U, Koske HP, Kuhlmann D, Lenz J and Nellen W. Production of *Nannochloris spec.* (Chlorophyceae) in large scale outdoors tanks and its use as food organism in marine aquaculture. *Aquaculture.* 1981; 23:171–181.

Wood BJB, Grimson PHK, German JB and Turner M. Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. *Prog Ind Microbiol.* 1999; 35:175-183.

Work VH, Radakovits R, Jinkerson RE, Meuser JE, Elliot LG, Vinyard DJ, Laurent LM, Dismukes GC and Posewits MC. Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* sta7–10 starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains. *Eukaryot cell.* 2010; 9:1251–1261.

Wu-Scharf D, Jeong BR, Chaomei Z and Cerutti H. Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas* by a DEAH-Box RNA helicase. *Science.* 2000; 290:1159-1162.

X

Xiong W, Gao C, Yan D, Wu C and Wu Q. Double CO₂ fixation in photosynthesis-fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. *Bioresour Technol.* 2010; 101(7):2287-2293.

Xiong W, Gao C, Yan D, Wu C and Wu Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol.* 2006; 27:631-635.

Xu J, Francis T, Mietkiewska E, Giblin EM, Barton DL, Zhang Y, Zhang M and Taylor DC. Cloning and characterization of an acyl-CoA-dependent diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene from *Tropaeolum majus*, and a study of the functional motifs of the DGAT protein using site-directed mutagenesis to modify enzyme activity and oil content. *Plant Biotechnol J.* 2008; 6(8):799-818.

Y

Yang Y, Mininberg B, Tarbet A and Weathers P. At high temperature production in *Ettlia oleabundans* occurs before nitrate depletion. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97(5):2263-2273.

Ye ZW, Jiang JG and Wu GH. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. *Biotechnol Adv.* 2008; 26:352-360.

Yeh KL and Chang JS. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor desing for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: implications for biofuels. *Biotechnol J.* 2011; 6(11):1358-1366.

Yokoyama A and Miki W. Composicion and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *FEMS Microbiol Lett.* 1995; 128(2):139-144.

Yoon K, Han D, Li Y, Sommerfeld M and Hu Q. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerols in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell.* 2012; 24:3708-3724.

Young A, Orset S, Tsaudos A. Methods for carotenoid analysis. In: M. Pessarakly. *Handbook of Photosynthesis.* New York: Marcel Dekker; 1996:597-622.



Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Kroth PG, Grossman AR and Apt KE. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. *J Phycol.* 2000; 26:379-386.

Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Shih C, Ehrhardt d, Grossman AR and Apt KE. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science.* 2001, 292:2073-2075.

Zheng P, Allen WB, Roesler K, Williams ME, Zhang S, Li J, Glassman K, Ranch J, Nubel D, Solawetz W, Blatramakki D, Llaca V, Deschamps S, Zhong GY, Tarazynski MC and Shen B. A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize. *Nat Genet.* 2008; 40(3):367-372.

Zhukova NV and Aizdaicher NA. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochem.* 1994; 39:351-356.

Zmora O and Richmond A. Microalgae for aquaculture. In: Richmond (ed.). *Handbook of Microalgae culture.* Blackwell Science Ed. USA. 2004.

Anexos



Anexo I: Índice de Figuras

Figura 1.1. Variedad de microalgas más comunes	3
Figura 1.2. Diferentes usos de las microalgas	7
Figura 1.3. Ruta general de carotenogénesis en células vegetales empezando por el fitoeno como primer carotenoide	17
Figura 1.4. Esquema de las reacciones ocurridas en el Ciclo de las Xantofilas (<i>John et al., 2009</i>)	19
Figura 1.5. Esquema básico de la estructura del glicerol, un ácido graso libre y un triacilglicérido	20
Figura 1.6. Ruta de biosíntesis de ácidos grasos	22
Figura 1.7. Biosíntesis de triacilglicerol a partir de acilglicéridos	24
Figura 1.8. Posibles reacciones de biosíntesis de TAGs	26
Figura 1.9. Reacción general de transesterificación	28
Figura 2.1. Micrografías de microscopio óptico (A) y electrónico de transmisión (B) de <i>Picochlorum sp HM1</i>	43
Figura 2.2. Árbol de análisis filogenético de las secuencias de ADN 18S ribosómico de varias microalgas trebouxiphyceae	44
Figura 2.3. Cromatograma de HPLC típico de los pigmentos de <i>Picochlorum sp HM1</i> , cultivada bajo condiciones estándar ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25°C)	50
Figura 2.4. Efectos de la intensidad lumínica (A), carencia de fuente de nitrógeno (B) y salinidad (C) en el contenido de carotenoides de <i>Picochlorum sp HM1</i>	52
Figura 2.5. Efecto de la intensidad lumínica (A) y la temperatura (B) en el perfil de ácidos grasos de <i>Picochlorum sp HM1</i>	57

Figura 3.1. Curva de crecimiento de <i>Picochlorum sp HM1</i> en diferentes condiciones de cultivo	72
Figura 3.2. Curva de crecimiento y fluorescencia relativa a la absorbancia de <i>Picochlorum sp HM1</i> bajo diferentes condiciones de cultivo	76
Figura 3.3. Perfil de ácidos grasos de la microalga <i>Picochlorum sp HM1</i> en condiciones de cultivo control y bajo carencia nutricional de nitrato y fosfato	78
Figura 3.4. Test de gota para el crecimiento mixotrófico en placas de <i>Picochlorum sp HM1</i> con diferentes fuentes de carbono orgánico (25°C, 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	81
Figura 4.1. Prueba de resistencia a antibióticos de las microalgas <i>Picochlorum sp HM1</i> (A), <i>Tetraselmis suecica</i> (B) y <i>Dunaliella salina</i> (C) con los antibióticos paramomicina, kanamicina y zeocina a diferentes concentraciones crecientes	97
Figura 4.2. Electroforesis en gel del agarosa al 1% de la PCR del gen marcador <i>BLE</i> (421 pb) sobre el plásmido pSP108	99
Figura 4.3. Esquema básico de la construcción de los vectores de expresión que contienen el gen de resistencia a zeocina <i>BLE</i> precedido de los promotores CaMV35S y NOS	100
Figura 4.4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la PCR del gen marcador <i>BLE-int</i> (1000 pb) sobre el plásmido pSP124S.	101
Figura 4.5. Optimización de la transformación mediante electroporación de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i>	104
Figura 5.1. Esquema de la construcción del vector pSI105- <i>EpDGAT1</i> a partir del vector pSI103	122
Figura 5.2. Comparación del uso de codones <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (A) y <i>Chlorella vulgaris</i> (B) con relación al gen <i>EpDGAT1</i> de <i>Echium pitardi</i>	125
Figura 5.3. Selección de mutantes productores de TAGs mediante fluorescencia con Rojo Nilo	127

Figura 5.4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la PCR sobre ADN genómico de los mutantes seleccionados C2-1, C2-5, M2, M3 y M29	128
Figura 5.5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la PCR sobre ADNc de los mutantes seleccionados C2-1, C2-5, M2, M3 y M29	129
Figura 5.6. Análisis del contenido de ácidos grasos totales de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 704 y los transformantes seleccionados	131
Figura 5.7. Diferencia en el porcentaje de ácidos grasos de los transformantes seleccionados con respecto al control 704 silvestre	134

Anexo II: Índice de Tablas

Tabla 1.1. Porcentaje máximo de lípidos totales de las microalgas más importantes	30
Tabla 2.1. Tasa específica de crecimiento (μ) calculada para <i>Picochlorum sp HM1</i> y otras microalgas marinas con interés biotecnológico	46
Tabla 2.2. Efecto de las diferentes condiciones de cultivo en la tasa específica de crecimiento (μ) y en la productividad volumétrica ($\text{gr L}^{-1} \text{d}^{-1}$) calculada después de 72 h de crecimiento exponencial de <i>Picochlorum sp HM1</i>	47
Tabla 2.3. Composición de ácidos grasos expresada como porcentaje del total de ácidos grasos (%), y el índice de yoduro de las microalgas <i>Nannochloropsis gaditana</i> y <i>Picochlorum sp HM1</i> , y del aceite de las plantas superiores girasol, soja y palma, las cuales se utilizan actualmente para la producción de biodiesel	56
Tabla 3.1. Comparación del peso seco (mg L^{-1}), porcentaje de lípidos totales, porcentaje de ácidos grasos totales y porcentaje de ácidos grasos del total de lípidos, en la microalga <i>Picochlorum sp HM1</i> bajo diferentes carencias nutricionales	74
Tabla 3.2. Comparación del perfil de ácidos grasos, índice de yoduro teórico, porcentaje de lípidos totales, contenido en lípidos neutros (U.F./U.A.) y peso seco (mg L^{-1}) en la microalga <i>Picochlorum sp HM1</i> en condiciones de cultivo control y suplementado con sacarosa 200 mM	82
Tabla 4.1. Lista de cebadores utilizados en este trabajo para la construcción de plásmidos y análisis de transformantes	98
Tabla 4.2. Número de colonias transformantes obtenidas mediante bombardeo con partículas de tungsteno de la microalga <i>Dunaliella salina</i>	105
Tabla 4.4. Número de colonias transformantes obtenidas mediante electroporación de <i>Picochlorum sp HM1</i>	107

Tabla 5.1. Lista de cebadores utilizados en este trabajo para la construcción de plásmidos y análisis de transformantes	121
--	-----

Anexo III: Abreviaturas

AA	Ácido Araquidónico
ACCasa	Acil-Coa Carboxilasa
ACP	Proteína Transportadora de Grupos Acilos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
AMD	Degeneración Macular Asociada a la Edad
AmpR	Gen de Resistencia a Ampicilina
APHVIII	Gen de resistencia al antibiótico paramomicina
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNi	Ácido Ribonucleico de Interferencia
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
ARNr/rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal/Ribosomal ribonucleic acid
ARNt	Ácido Ribonucleico Transferente
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BKT	β -caroteno C4 oxigenasa
BLAST	Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos Locales
BLE	Gen de resistencia al antibiótico bleomicina
CaMV	Virus del Mosaico de la Coliflor
CB	Tampón Cocodilato
CE	Comisión Europea
CoA	Coenzima A
CRTISO	Caroteno isomerasa
d	Días
D.O.	Densidad Óptica
DAG	Diacilglicerol
DAGs	Diacilglicéridos
DGAT	Diacilglicerol Aciltransferasa
DGTA	Diacilglicerol Transacilasa
DH	Deshidratasa
DHA	Ácido Docosahesanoico
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Nucleótidos Trifosfato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
ER	Enoil reductasa
FAMEs	Ácidos Grasos Metilados
FAS	Ácido Graso Sintasa
FCP	Proteína de Unión a Fucoxantina y Clorofila
G3P	Glicerol 3-Fosfato

GC-MS	Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas
GEI	Gases de Efecto Invernadero
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GGPP	Geranil-geranil pirofosfato
GPAT	Glicerol 3-fosfato Aciltransferasa
h	Horas
HD	Hidroxiacil dishidratasa
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
Hsp70A	Proteína de Choque Térmico
IPP	Isopentenil pirofosfato
IPPi	Isopentenil pirofosfato isomerasa
KDa	Kilo Daltons
KR	Cetoreductasa
KS	Cetosintetasa
LB	Medio de Cultivo Luria Broth
LCY β	Licopeno ciclasa β
LCY ϵ	Licopeno ciclasa ϵ
LN	Lípidos Nuetros
LP	Lípidos Polares
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPAT	Ácido Fosfatídico Aciltransferasa
LUC	Luciferasa
MAGs	Monoacilglicéridos
min	Minutos
MT	Malonil transacilasa
NADPH	Nicotinamina Adenina Dinucleótido Fosfato
nm	Nanómetros
NOS	Nopalina Sintasa
PA	Ácido Fosfatídico
PAP	Ácido Fosfatídico Fosfatasa
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDAT	Fosfolípido:diacilglicerol Aciltransferasa
PDS	Fitoeno desaturasa
PEG	Polietilenglicol
Pi	Fosfato inorgánico
PLK	Sitio de multiclonaje
PS/DW	Peso Seco/Dry Weight
PSY	Fitoeno sintasa
pUC ori	Origen de Replicación
PUFAs	Ácidos Grasos Poliinsaturados
RbcS2p	Promotor del gen de la subunidad pequeña de la Rubisco
s	Segundos

SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SV40	Virus de Simio
TAGs	Triacilglicéridos
TAP	Medio de Cultivo Tris-Acetato-Fosfato
TE	Tioesterasa
TEM	Microscopía de Transmisión Electrónica
TLC	Cromatografía en Capa Fina
U	Unidades de actividad enzimática
U.F./U.A.	Unidades de Fluorescencia/Unidades de Absorbancia
UTR	Region no Traducida
VDE	Violaxantina deepoxidasa
ZDS	z-caroteno desaturasa
ZEP	Zeaxantina epoxidasa

Anexo IV: Aportaciones Científicas

PUBLICACIONES:

Díaz-Santos E, Vila M, **de la Vega M**, León R, Vigara J. Induction of bioflocculation in microalgae. *J Appl Phycol*. 2014. IN PRESS.

Vila M, Díaz-Santos E, **de la Vega M**, Couso I, León R. Isolation and characterization of pigment deficient insertional mutants in the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genomics Discovery*. 2013; DOI: 10.7243/2052-7993-1-2.

Díaz-Santos E, **de la Vega M**, Vila M, Vigara J, León R. Efficiency of different heterologous promoters in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology Progress*. 2013; 29(2): 219-328.

Vila M, Díaz-Santos E, **de la Vega M**, Rodríguez H, Vargas A, León R. Promoter trapping in microalgae using the antibiotic paromomycin as selective agent. *Marine Drugs*. 2012; 10: 2749-2765.

de la Vega M, Díaz E, Vila M, León R. Isolation of a new strain of *Picochlorum* sp and characterization of its potencial biotechnological applications. *Biotechnology Progress*. 2011; 27(6): 1535-1543.

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

de la Vega M, Díaz E, Vila M, Vigara J, León R. Optimización del método de cultivo y enriquecimiento en lípidos de la microalga *Picochlorum* sp HM1. Póster. VII Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico. Cartaya, Huelva. 2014

Vila M, Díaz-Santos E, **de la Vega M**, Vigara J, León R. Obtención de nuevas cepas de fitoplancton transgénico con componentes antimicrobianos para reforzar el sistema inmune innato de especies acuícolas. Póster. VII Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico. Cartaya, Huelva. 2014

Díaz-Santos E, Vila M, **de la Vega M**, Rengel R, Azogil R, Vigara J, León R. Inducción de la biofloculación en microalgas para la mejora del proceso de recolección de biomasa a escala industrial. Póster. VII Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico. Cartaya, Huelva. 2014

de la Vega M, Díaz E, Vila M, Vigara J, León R. Different approaches for the isolation of efficient promoters to direct the expression of transgenes in microalgae. Comunicación Oral. 22nd IUBMB and 37th FEBS Congress. Sevilla. 2012

Díaz E, **de la Vega M**, Vila M, León R. Characterization of a new oleaginous microalgal strain isolated from the marshlands of the Odiel River in the Southwest Spain and optimization of its genetic manipulation. Poster. XX International Symposium of Plants Lipids. Sevilla. 2012

Montes P, Romero MC, **de la Vega M**, Vega JM, Vigara J. Estudios sobre la actividad glutatión reductasa de *Coccomyxa acidophila*. Comunicación Oral. XI Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Cáceres. 2012

Díaz E, Vila M, **de la Vega M**, Vigara J, Rodríguez H, León R. Efficiency of heterologous promoters in *Chlamydomonas reinhardtii* and evaluation of methods for the isolation of a new strong endogenous promoters in microalgae. Poster. 15th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*. Postdam, Alemania. 2012

Vila M, Díaz E, **de la Vega M**, Vigara J, Rodríguez H, León R. Transgenic microalgae achievements and challenges. Comunicación Oral. International Meeting on Marine Resources. Peniche, Portugal. 2012

de la Vega M, Díaz E, Vila M, Azogil A, Gómez JA, Rodríguez G, Romero C, Vigara J, León R. Aislamiento de una nueva estirpe de *Picochlorum* de las marismas de Huelva y caracterización de su potencial biotecnológico. Poster. VI Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico. Cartaya. 2012

Vila M, Díaz E, **de la Vega M**, Vigara J, León R. Mejora de las características nutricionales de las microalgas mediante manipulación genética de la ruta de síntesis de carotenoides. Poster. III Feria

Agroganadera y Comercial de la Comarca de Doñana. Rociana del Condado. 2012

Vila M, Díaz E, **de la Vega M**, León R. Aislamiento de mutantes de la microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* sensibles a alta luz mediante mutagénesis insercional. Poster. XXXIII Congreso SEBBM. Córdoba. 2010

Vila M, Díaz E, **de la Vega M**, Simaite A, León R. Production of lipids in different operational conditions by several marine and freshwater microalgae. Poster. III Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. Lisboa, Portugal. 2009

PATENTES:

León R, Vila M, **de la Vega M**, Díaz E y Albarracín-González J. Nueva microalga del género *Nannochloris* sp y sus aplicaciones biotecnológicas. P201030941