



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**GENERACIÓN DE MUTANTES DE LA MICROALGA
VERDE *Chlorella saccharophila* CON MAYOR
CONTENIDO DE LÍPIDOS DE INTERÉS COMERCIAL**

Tesis que presenta

JALSEN IVÁN TECO BRAVO

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

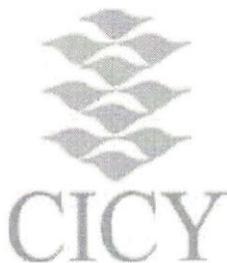
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2019

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Jalsen Iván Teco Bravo**, titulado “**Generación de mutantes de la microalga verde *Chlorella saccharophila* con mayor contenido de lípidos de interés comercial**”, fue realizado en el Laboratorio de Microalgas y Cultivos Tropicales de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Santy Peraza Echeverría, dentro de la opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

Dra. Clelia De la Peña Seaman

Directora de Docencia

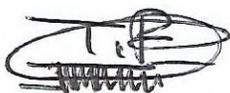
Mérida, Yucatán, México, a 8 de agosto de 2019.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Mérida, Yucatán, México.

15 de julio de 2019.



Jalsen Iván Tecó Bravo

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto “Estudio de genes involucrados en la síntesis de triacilglicéridos (TAGs) en la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* y en la microalga oleaginosa *Chlorella saccharophila*: oportunidades para incrementar la acumulación de TAGs en microalgas para la producción de biodiesel”, SEP-CONACYT número 169217, bajo la dirección del Dr. Santy Peraza Echeverría.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., por darme el privilegio de obtener un doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca de posgrado número 404430 y por el financiamiento del proyecto número 169217 dentro del cual se desarrolló la presente tesis.

Al Dr. Santy Peraza Echeverría, por haber confiado en mí, por haberme acompañado y guiado siempre durante el trayecto del doctorado, en ese camino desconocido, emocionante y lleno de retos. Por ayudarme a encontrar la salida en esos momentos de ofuscación, por su inagotable paciencia y su incuantificable ayuda.

A la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, por sus valiosas aportaciones durante todo el desarrollo de la tesis las cuales enriquecieron, robustecieron y maduraron el proyecto.

Al comité tutorial integrado por la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y el Dr. Carlos Francisco Reyes Sosa, por sus valiosas observaciones durante todos los exámenes tutoriales y fuera de ellos, las cuales contribuyeron al desarrollo de la tesis.

Al comité de revisión de tesis integrado por los Dres. Virginia Aurora Herrera Valencia, Jorge Santamaría Fernández, Luis Felipe Barahona Pérez, Luis Sáenz Carbonell, Carlos Francisco Reyes Sosa y Gabriel Lizama Uc, por su valioso tiempo y sus valiosas observaciones.

Al Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez, por sus meticulosas revisiones a la tesis y por sus valiosas observaciones para mejorarla.

Al laboratorio de Biocombustibles de la Unidad de Energía Renovable del CICY, por las instalaciones y el equipamiento prestados para el análisis lipídico.

Al laboratorio de Microscopía Confocal de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del CICY, por las instalaciones y el equipamiento prestados para el análisis de microscopía confocal.

Al Dr. Felipe Barahona Pérez, por la asesoría para el análisis de la composición de lípidos mediante cromatografía de gases.

A la M en C. Ángela Francisca Ku González, por el apoyo técnico en el análisis de microscopía confocal.

A la Q.B.A. Ileana Cecilia Borges Argáez y a la Q.I. Tanit Toledano Thompson, por el apoyo técnico prestado durante el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Patricia Yolanda Contreras Pool, por la inducción al laboratorio en el inicio del doctorado.

Al Dr. Fray Martín Baas Espínola, por sus valiosos comentarios para enriquecer el proyecto, así como por la revisión del artículo de investigación.

A todos mis compañeros estudiantes de posgrado con los que tuve la oportunidad de convivir durante el doctorado Paty, Melisa, Maru, Any, Daniela, Ángeles, Miguel, Shirley, Carolina, Yoli, Jimena, Katya, Alejandra, Fray, Dulce, Ricardo, Sergio, Raúl, Jhonatan y Dayana, por su amistad, su cariño, su ayuda, sus comentarios y observaciones, lo cual ayudó a alcanzar el objetivo de concluir esta tesis y a hacer más agradable mi estancia en los laboratorios del CICY.

DEDICATORIAS

A mi esposa, María de los Ángeles López Arroyo, por su invaluable compañía, por reconfortarme en los momentos difíciles y por hacer más fácil lo difícil. Por haberme apoyado en esta emocionante y desafiante aventura. Siempre fue bueno saber que no estaba solo.

A mi madre, Aridai Bravo Roblero, por su ejemplo de visión y tenacidad, por enseñarme a nunca rendirse y de que todo es posible a pesar de las adversidades. Sin su apoyo nunca habría alcanzado este objetivo.

Al Dr. Miguel Salvador Figueroa y a la Dra. María de Lourdes Adriano Anaya, por haberme enseñado el camino de la investigación científica y el de la biotecnología, así como por haberme impulsado más allá de lo académico.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES	3
1.1 Microalgas como fuente de lípidos.....	3
1.1.1 Lípidos de microalgas para la producción de biocombustibles	5
1.1.2 Lípidos bioactivos de microalgas con alto valor agregado	7
1.2 El género <i>Chlorella</i>	12
1.3 Estrategias para el mejoramiento de la producción de lípidos en microalgas	14
1.3.1 Bioprospección.....	14
1.3.2 Manipulación de las condiciones de cultivo	14
1.3.3 Ingeniería genética.....	15
1.3.4 Mutagénesis	16
1.4 Mutaciones.....	17
1.4.1 Mutaciones espontáneas	18
1.4.2 Mutaciones inducidas	20
1.5 Mutágenos físicos.....	20
1.5.1 Radiaciones ionizantes.....	20
1.5.2 Radiación ultravioleta (UV)	21
1.6 Mutágenos químicos	23
1.6.1 Análogos de bases nitrogenadas.....	23
1.6.2 Agentes desaminantes	24
1.6.3 Agentes intercalantes	24
1.6.4 Agentes alquilantes	24
1.6.5 Metanosulfonato de etilo (EMS)	25
1.7 Mecanismos de reparación de mutaciones	25
1.7.1 Fotorreparación.....	26
1.7.2 Metiltransferasas	27
1.7.3 Escisión y sustitución de bases.....	27

1.7.4 Escisión y sustitución de nucleótidos	29
1.8 Estrategias de selección de mutantes potencialmente sobreproductores de TAGs. 30	
1.8.1 Presión selectiva.....	31
1.8.2 Presión selectiva con pH ácido	31
1.8.4 Selección de mutantes por el método de gradiente en caja Petri	32
JUSTIFICACIÓN.....	33
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL.....	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	36
CAPÍTULO II	38
PRODUCCIÓN MEJORADA DE TRIACILGLICÉRIDOS Y DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN NUEVAS MUTANTES TOLERANTES A LA ACIDEZ DE LA MICROALGA VERDE <i>Chlorella saccharophila</i>	38
RESUMEN.....	38
2.1 INTRODUCCIÓN	39
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
2.2.1 Cepa de microalga y condiciones de cultivo	41
2.2.2 Mutagénesis UV.....	41
2.2.3 Selección de mutantes	42
2.2.4 Validación de la tolerancia y comparación de la sensibilidad a la acidez de las mutantes	42
2.2.5 Evaluación del crecimiento celular.....	43
2.2.6 Contenido de lípidos totales y TAGs	43
2.2.7 Fluorescencia intracelular de lípidos neutros.....	43
2.2.8 Análisis de la composición de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES)	43
2.2.9 Análisis de datos.....	44
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
2.3.1 Mutagénesis UV.....	45
2.3.2 Selección de mutantes	46
2.3.3 Crecimiento de la cepa silvestre y de las mutantes.....	49

2.3.4 Contenido de lípidos totales y triacilglicéridos de la cepa silvestre y mutantes de <i>C. saccharophila</i>	51
2.3.5 Análisis de microscopía confocal de la cepa silvestre y de las mutantes de <i>C. saccharophila</i>	57
2.3.6 Composición de los ésteres metílicos de ácidos grasos de la cepa silvestre y de las mutantes de <i>C. saccharophila</i>	58
2.4 CONCLUSIÓN	61
CAPÍTULO III	63
CONTENIDO DIFERENCIAL DE HIDROCARBUROS Y DE LÍPIDOS BIOACTIVOS DE ALTO VALOR AGREGADO DE LA MICROALGA VERDE <i>Chlorella saccharophila</i> Y DE DOS MUTANTES TOLERANTES A LA ACIDEZ DETECTADO MEDIANTE UN ANÁLISIS LIPIDÓMICO	63
3.1 INTRODUCCIÓN.....	63
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
3.2.1 Cepa de microalga y condiciones de cultivo.....	64
3.2.2 Extracción y partición de lípidos totales.....	65
3.2.3 Análisis de la composición de lípidos.....	65
3.2.4 Análisis de datos.....	65
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
3.3.1 Clases de lípidos detectados en <i>C. saccharophila</i>	66
3.3.2 Lípidos para la producción de biocombustibles.....	67
3.3.3 Lípidos bioactivos detectados en <i>C. saccharophila</i>	69
3.4 CONCLUSIÓN	75
CAPÍTULO IV.....	77
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	77
CONCLUSIONES.....	77
PERSPECTIVAS	77
BIBLIOGRAFÍA.....	80



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Representación esquemática de la biosíntesis de lípidos en microalgas.....4

Figura 1.2 Transesterificación de triacilglicéridos para producir biodiesel.....6

Figura 1.3 Propiedades de los compuestos bioactivos de microalgas.....9

Figura 1.4 Ácidos grasos poliinsaturados de alto valor farmacéutico y nutricional.....11

Figura 1.5 Ultraestructura esquemática de *C. vulgaris* representando diferentes organelos.....13

Figura 1.6 Esquema de las diferentes fases de la reproducción en *Chlorella vulgaris*.....13

Figura 1.7 Efecto del tautomerismo en el apareamiento de bases nitrogenadas del DNA.....19

Figura 1.8 Productos de dimerización de pirimidinas por radiación UV.....22

Figura 1.9 Mutágenos químicos análogos de bases nitrogenadas de ADN.....23

Figura 1.10 Fórmula estructural del Metanosulfonato de etilo.....25

Figura 1.11 Alquilación del DNA por el metanosulfonato de etilo.....25

Figura 1.12 Mecanismo de fotoreparación de mutaciones.....26

Figura 1.13 Mecanismo de reparación de mutaciones de la O6-metilguanina metiltransferasa.....27

Figura 1.14 Reparación de mutaciones por escisión de bases.....29

Figura 1.15 Reparación de mutaciones por escisión de nucleótidos.....30

Figura 2.1 Curva de mortalidad de *C. saccharophila* con diferentes tiempos de exposición (segundos) a radiación UV.....50

Figura 2.2 Selección de mutantes de *C. saccharophila* en gradiente de pH.....52

Figura 2.3 Comparación de la tolerancia a la acidez entre la cepa silvestre y mutantes en gradiente de pH.....53

Figura 2.4 Patrones de crecimiento de las cepa silvestre y mutantes de *C. saccharophila* en gradiente de pH.....54

Figura 2.5 Crecimiento de la cepa silvestre y de las cinco mutantes de <i>C. saccharophila</i> a pH 6 y 7.....	55
Figura 2.6 Contenido lipídico de la cepa silvestre y mutantes de <i>C. saccharophila</i> a pH 6 y 7.....	56
Figura 2.7 Acumulación de triacilglicéridos (TAG) de la cepa silvestre y mutantes de <i>C. saccharophila</i> a pH 6 y 7.....	58
Figura 2.8 Productividad de TAG de la cepa silvestre y mutantes de <i>C. saccharophila</i> cultivadas a pH 6 y 7.....	62
Figura 2.9 Imágenes confocales de células teñidas con Rojo Nilo de la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de <i>C. saccharophila</i>	63
Figura 2.10 Composición de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de las cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de <i>C. saccharophila</i>	64
Figura 3.1 Clases de lípidos identificadas en la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de <i>C. saccharophila</i> y su abundancia relativa.....	72
Figura 3.2 Compuestos terpenoides identificados en la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de <i>C. saccharophila</i> y su abundancia relativa.....	75
Figura 3.3 Compuestos esteroides identificados en la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de <i>C. saccharophila</i> y su abundancia relativa.....	76
Figura 3.4 Alcoholes grasos identificados en la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de <i>C. saccharophila</i> y su abundancia relativa.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1 Composición de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de *C. saccharophila*.....64

Cuadro 3.1 Compuestos hidrocarburos identificados en las cepa silvestre y mutantes (WT, M1 y M5) de *C. saccharophila* y su abundancia relativa.....74

RESUMEN

Las microalgas son una fuente promisoría de lípidos para la producción de biocombustibles, y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) para la nutrición humana, sin embargo, la producción comercial aún no es económicamente viable. El incremento en la producción de triacilgliceroles (TAGs) y el aprovechamiento comercial de lípidos bioactivos de alto valor agregado puede contribuir a la viabilidad económica. *Chlorella saccharophila* es una microalga que acumula TAGs con un perfil idóneo para producir biodiesel. La mutagénesis física genera diversidad genética y variantes de un organismo mientras que las estrategias de selección permiten el aislamiento de mutantes con fenotipo mejorado. El presente trabajo tiene como objetivo mejorar genéticamente a *C. saccharophila*, para incrementar la producción de TAGs y de PUFAs, mediante mutagénesis con radiación ultravioleta (UV) acoplada al uso de pH ácido como estrategia de selección de mutantes y analizar el lipidoma de las mutantes para identificar lípidos bioactivos de alto valor agregado. Se generaron dos mutantes mejoradas, M1 y M5, las cuales acumularon 27.2% y 27.4% más TAGs que la silvestre (WT), respectivamente, mostrando una intensidad de fluorescencia más fuerte. En la mutante M1, el 50.5% de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) fueron saturados (C16:0 y C18:0) y el 25.27% monoinsaturados (C18:1), ambos adecuados para la producción de biocombustibles. En la mutante M5, el 65.19% de los FAMEs fueron PUFA nutricionales (C16:2, C18:2 y C18:3) los cuales no se detectaron en la WT. En el análisis lipidómico, se detectó 42.09% y 26.19% más hidrocarburos en la WT que en las mutantes M1 y M5, respectivamente. Las mutantes M1 y M5 tuvieron 23.10% y 23.88% mayor contenido de ésteres alquílicos de ácidos grasos (FAAEs) y 13.90% y 27.71% mayor contenido de lípidos bioactivos que la WT, respectivamente, entre los que destacan por su alta demanda y valor comercial el neofitadieno, el escualeno, el campesterol y el alcohol behénico. Estos resultados demostraron que la mutagénesis UV acoplada a una estrategia de selección con pH ácido es una plataforma valiosa y rápida para generar mutantes de *C. saccharophila* con contenidos mejorados de TAGs, PUFAs y lípidos bioactivos de alto valor agregado para biocombustibles y nutracéuticos, respectivamente.

ABSTRACT

Microalgae are a promising source of lipids for biofuel production and polyunsaturated fatty acids (PUFA) for human nutrition; however, the production process of these biomolecules is not yet commercially viable. The increase in the production of TAGs and the commercial use of bioactive lipids of high added value of the biomass can contribute to the economic viability of this process. *Chlorella saccharophila* is a microalga that accumulates TAGs with suitable profile for biodiesel production. Physical mutagenesis generates genetic diversity and variants of an organism while selection strategies allow the isolation of mutants with improved phenotype. The objective of this work is to genetically improve *C. saccharophila* to increase the production of TAGs and PUFAs by ultraviolet (UV) mutagenesis coupled with the use of acidic pH as a strategy for mutant screening and to analyze the lipidome of the mutants for the identification of bioactive lipids with high added value. Two improved mutant strains (M1 and M5) were generated. M1 and M5 accumulated 27.2% and 27.4% more TAGs, respectively, and showed stronger fluorescence intensity than the WT strain when the cells of these mutants were stained with the lipophilic Nile Red stain. In the M1 mutant, 50.5% of the fatty acid methyl esters (FAMES) were saturated (C16:0 and C18:0) and 25.27% were monounsaturated (C18:1) fatty acids which are suitable for biofuels production. In the M5 mutant, 65.19% of the total FAMES were nutritional PUFA (C16:2, C18:2 and C18:3), while these FAMES were not detected in the WT. In the lipidomic analysis, 42.09% and 26.19% more hydrocarbons were detected in WT compared to the mutants M1 and M5, respectively, while the latter had 23.10% and 23.88% higher content of fatty acid alkyl esters (FAAEs) than the WT strain, respectively. In mutant strains M1 and M5, 13.90% and 27.71% higher content of bioactive lipids than WT was detected, respectively, among which the neofitadiene, squalene, campesterol and behenic alcohol stand out due to their high demand and commercial value. The results of this study demonstrated that UV mutagenesis coupled with a selection strategy with acidic pH is a valuable and fast platform to generate mutants of *C. saccharophila* with improved contents of TAGs, PUFAs and bioactive high added value lipids for biofuels and nutraceuticals, respectively

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son una fuente promisoría de lípidos para la producción de biocombustibles y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) para la nutrición humana debido a su capacidad de acumular triacilglicéridos (TAGs), la materia prima para producir biocombustibles y de donde se obtienen los PUFAs (Sarayloo *et al.*, 2018). Sin embargo, el proceso de producción de biocombustibles a partir de microalgas aún no es comercialmente viable. Además de TAGs, la biomasa de las microalgas contiene lípidos bioactivos de alto valor agregado con aplicaciones en la industria farmacéutica como antioxidantes, antiinflamatorios, antibacterianos, antivirales, anticancerígenos, antihipercolesterolémicos y para el tratamiento de problemas cardíacos. También presenta otros lípidos, con usos como aditivos en la industria de los alimentos, como surfactantes, fragancias, tintes y biomoléculas antienvjecimiento en la industria de los cosméticos (Budzianowski, 2017; Safi *et al.*, 2014). Los lípidos bioactivos se encuentran en baja proporción en la biomasa pero tienen un alto valor comercial a diferencia de los lípidos para producir biocombustibles los cuales se necesitan en grandes volúmenes pero su precio es bajo (Plaza *et al.*, 2010).

El incremento en la producción de TAGs y el aprovechamiento comercial de lípidos bioactivos de alto valor agregado puede contribuir a la viabilidad económica de la producción de biocombustibles a partir de microalgas (Klok *et al.*, 2014).

Se han probado varias estrategias para aumentar el contenido de TAGs en microalgas, como el pH alcalino, la temperatura, la salinidad y la deficiencia de nutrientes (Paliwal *et al.*, 2017). La deficiencia de nitrógeno ha sido considerada la manera más eficiente de mejorar la acumulación de lípidos neutros intracelulares en microalgas; sin embargo, esta es una estrategia de dos etapas lo cual consume tiempo y disminuye la productividad total de los lípidos (Jagadevan *et al.*, 2018). La mutagénesis ha demostrado ser un método efectivo para el mejoramiento genético y para incrementar la producción de numerosos metabolitos en diversos organismos (Steensels *et al.*, 2014). La radiación UV se considera como una forma segura, eficaz y simple de mutagenizar un organismo y se ha utilizado en diversas microalgas para incrementar el contenido de lípidos y/o modificar la composición de ácidos grasos (Mehtani *et al.*, 2017). Por ejemplo, mutantes de *Scenedesmus obliquus*

deficientes en la biosíntesis de almidón con mayor contenido de ácidos grasos totales y de TAGs (de Jaeger *et al.*, 2014), mayor contenido de lípidos neutros y de PUFAs en *Tetraselmis suecica* (Lim *et al.*, 2015) y contenido de lípidos totales, esterios metílicos de ácidos grasos (FAME) y PUFAs en *Chlorella vulgaris* (Sarayloo *et al.*, 2017).

El desarrollo de métodos específicos y eficientes de selección de mutantes es el desafío principal para obtener cepas mejoradas mediante mutagénesis y la presión selectiva se aplica comúnmente para identificar células mejoradas fenotípicamente entre todos los mutantes generados (Steensels *et al.*, 2014).

Se ha reportado previamente que la acidez induce la acumulación de TAGs en microalgas acidofílicas. En la microalga acidofílica *Chlamydomonas* sp. se evaluó el contenido de TAGs a diferentes niveles de pH (1, 3 y 6 y 7) y se reportó que el contenido de TAGs incrementó a medida que el pH disminuyó (Tatsuzawa *et al.*, 1996). Mayor rendimiento de FAME, una medida indirecta de la acumulación de TAGs, fue reportado en *Chlamydomonas* sp. cuando se cultivó a pH 2.7 comparado con pH neutro (Poerschmann *et al.*, 2004). De la misma manera, un mayor rendimiento de FAMEs y de lípidos totales fue reportado en *Scenedesmus* spp. a pH 3 comparado con pH 7 (Eibl *et al.*, 2014). A partir de estos estudios, se propuso que el pH ácido podría usarse como método de selección de mutantes en experimentos de mutagénesis de microalgas para seleccionar nuevas cepas con alto contenido de TAGs.

Previamente nuestro grupo de investigación reportó que la composición de ácidos grasos de los TAGs de *C. saccharophila* es adecuada para la producción de biodiesel (Herrera-Valencia *et al.*, 2011), sin embargo, se desconoce la composición de las otras fracciones lipídicas de esta microalga, por lo que en este estudio se sometió a mutagénesis UV a *C. saccharophila*, acoplada a un método de selección basado en la tolerancia a la acidez, para obtener nuevos mutantes con mayor contenido de TAGs y PUFAs que la cepa silvestre y se analizó el lipidoma de las mutantes para identificar lípidos bioactivos de alto valor agregado.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Microalgas como fuente de lípidos

Las microalgas son reconocidas como una de las formas más antiguas de vida, han residido en la base de la cadena alimenticia y han sido una parte indispensable del ecosistema de la tierra por alrededor de dos billones de años. Han sido usadas como fuente de vitaminas y proteínas desde tiempos ancestrales, las primeras civilizaciones, incluida la de los aztecas, las empleaban como parte importante de su dieta. Cuando las microalgas evolucionaron, la atmósfera de la tierra contenía sólo 0.1% de oxígeno, la reproducción de las microalgas fotosintéticas durante millones de años, antes de la emergencia de las plantas superiores, son responsables del 20% de oxígeno de la atmósfera (Safi *et al.*, 2014).

Son consideradas plantas primitivas (talofitas), es decir, que carecen de raíces, tallos y hojas. Tienen clorofila A como pigmento fotosintético primario, su estructura es principalmente para la conversión de energía, su desarrollo simple les permite adaptarse a las condiciones ambientales prevalecientes y prosperar durante un largo plazo (Richmond, 2004). Las microalgas incluyen a un grupo amplio de organismos unicelulares y multicelulares simples, tanto procariotas como el caso de las cianobacterias y eucariotas como las algas verdes y rojas además de las diatomeas (Brennan and Owende, 2010).

Las microalgas producen glicerolípidos, los cuales se caracterizan por un esqueleto de glicerol con uno, dos, o tres ácidos grasos unidos y se pueden dividir en dos grandes subclases con base en su función específica, los lípidos de almacenamiento y los de membrana. Los lípidos de membrana contienen dos ácidos grasos y generalmente tienen grupo polar lateral en la posición 3 de su esqueleto de glicerol, estos lípidos son los bloques de construcción esenciales para las membranas celulares y de los organelos (Klok *et al.*, 2014).

Los lípidos de almacenamiento tienen tres ácidos grasos unidos al esqueleto de glicerol y son conocidos como triacilgliceroles (TAGs). Hasta hace poco, el conocimiento de la

biosíntesis de lípidos en microalgas se basaba en gran medida en el supuesto de que es similar al de las plantas. Sin embargo, recientemente se han observado algunas diferencias tales como grupos de ácidos grasos distintos y diferencias en la organización subcelular del metabolismo de glicerolípidos (Radakovits *et al.*, 2010). En las microalgas, los ácidos grasos libres se sintetizan en el cloroplasto, mientras que los TAGs son ensamblados en el retículo endoplasmático (Figura 1.1). Los TAGs son producidos básicamente bajo condiciones adversas de crecimiento y se acumulan en orgánulos especializados denominados cuerpos lipídicos (Klok *et al.*, 2014).

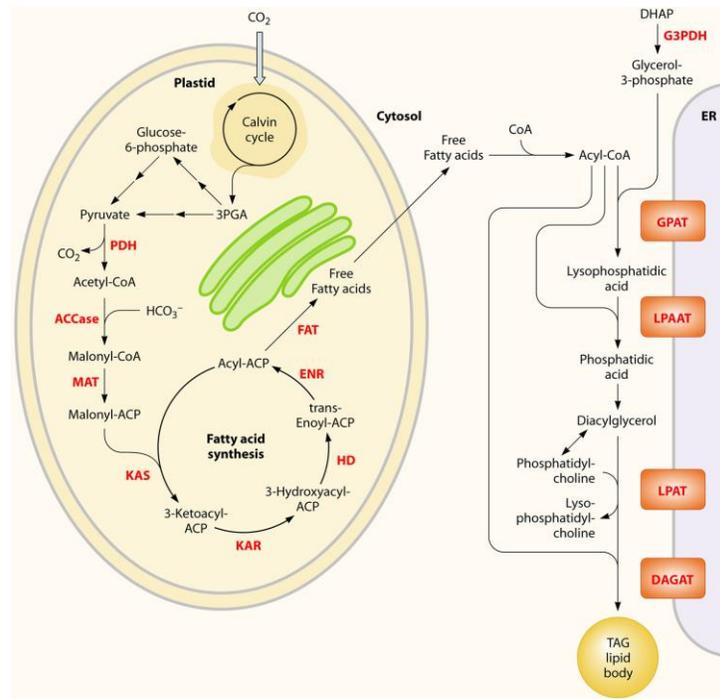


Figura 1.1 Representación esquemática de la biosíntesis de lípidos en microalgas (Radakovits *et al.*, 2010). Los metabolitos y las vías representativas se muestran en negro y las enzimas en rojo. ACCasa: acetil-CoA carboxilasa; ACP: proteína portadora de acilo; CoA: coenzima A; DAGAT: diacilglicerol aciltransferasa; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; ENR: enoil-ACP reductasa; FAT: acil graso-ACP tioesterasa; G3PDH: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferasa; HD; 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa; KAR: 3-cetoacil-ACP reductasa; KAS: 3 cetoacil-ACP sintasa; LPAAT, ácido liso-fosfatídico aciltransferasa; LPAT: liso-fosfatidilcolina aciltransferasa; MAT, malonil-CoA: ACP transacilasa; PDH, complejo piruvato deshidrogenasa.

1.1.1 Lípidos de microalgas para la producción de biocombustibles

El calentamiento global es una de los problemas ambientales más importantes en la actualidad, el cual se ha agudizado por el incremento en la atmósfera de los denominados gases de efecto invernadero principalmente por el uso de combustibles fósiles (Amin, 2009). El consumo mundial anual promedio de energía primaria es alrededor de 11,295 millones de toneladas equivalentes de petróleo, 88% de esa energía es obtenida de los combustibles fósiles, de ese porcentaje, el petróleo provee el 35%, el carbón el 29% y el gas natural el 24% (Brennan and Owende, 2010). El uso a gran escala de los combustibles fósiles principalmente para el transporte, la electricidad y la generación de energía térmica ha contribuido en gran medida en las emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera, lo cual está provocando el calentamiento global y el cambio climático (Brennan and Owende, 2010).

La reducción de las emisiones y de la concentración atmosférica de CO₂ es una estrategia importante para la mitigación de esta problemática. El uso de biomasa para producir energía puede contribuir en la mitigación del cambio climático ya que la producción de biocombustibles a partir de organismos fotosintéticos es un proceso renovable que utiliza la energía solar y CO₂ (Amin, 2009).

Entre las fuentes potenciales de biomasa para la producción de biocombustibles, las microalgas tienen ciertas ventajas, entre ellas la eficiencia biológica en la cosecha de energía solar para la producción de compuestos orgánicos. Por otra parte, pueden ser cultivadas en agua salobre y en suelos marginales, minimizando impactos ambientales por el cambio de uso de suelos y evitando competir con la producción agrícola de alimentos, son de rápido crecimiento y pueden duplicar su biomasa en periodos tan cortos como 3.5 h (Chisti, 2008).

Además de su capacidad para fijar CO₂, acumula lípidos como productos de almacenamiento y fuente de energía y tienen mayor productividad de lípidos comparado con cultivos energéticos vegetales ya que pueden producir todo el año y pueden producir hasta 100,000 L de aceite ha⁻¹ año⁻¹ mientras que la palma aceitera, el coco, el ricino y el girasol pueden producir hasta 5,950, 2,689, 1,413 y 952 L ha⁻¹ año⁻¹, respectivamente (Schenk *et al.*, 2008).

La fracción de TAGs de las microalgas puede alcanzar de 20-60% respecto a la biomasa seca después de exposiciones prolongadas a condiciones adversas, por tal motivo se ha propuesto aprovecharlo para la producción sustentable de biocombustibles, principalmente de biodiesel (Klok *et al.*, 2014).

La producción de biodiesel se lleva a cabo mediante la reacción de los triacilglicéridos con metanol en una reacción conocida como transesterificación. La transesterificación produce ésteres metílicos de ácidos grasos, que son el biodiesel, además de glicerol (Figura 1.2). La reacción se produce paso a paso: los triacilglicéridos son primero convertidos en diacilglicéridos, luego en monoacilglicéridos y finalmente en glicerol (Chisti, 2007).

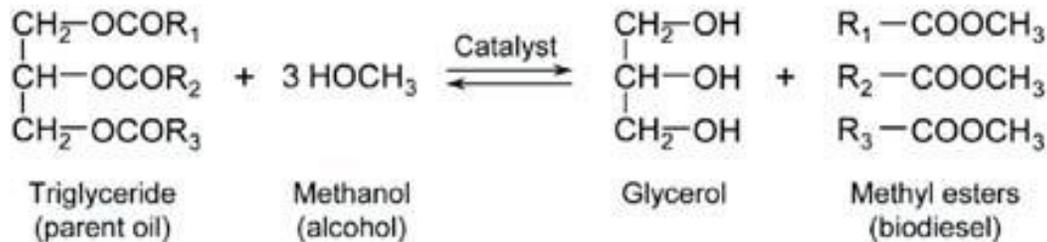


Figura 1.2 Transesterificación de triacilglicéridos para producir biodiesel (Chisti, 2007).

La transesterificación requiere 3 moles de alcohol para cada mol de triacilglicérido para producir 1 mol de glicerol y 3 moles de ésteres metílicos. Sin embargo, los procesos industriales utilizan 6 moles de metanol por cada mol de triacilglicérido para asegurar que la reacción sea conducido en la dirección de los ésteres metílicos, es decir, hacia el biodiesel (Fukuda *et al.*, 2001).

La transesterificación puede ser catalizada por ácidos, álcalis y enzimas lipasas. La transesterificación catalizada por álcalis es aproximadamente 4,000 veces más rápida que catalizada por ácidos por lo que los álcalis como el hidróxido de sodio y potasio se usan comúnmente como catalizadores comerciales a una concentración de aproximadamente 1% en peso de aceite (Meher *et al.*, 2006). Los alcóxidos, como el metóxido de sodio, son aún mejores catalizadores que el hidróxido de sodio y están siendo cada vez más utilizados, aunque el uso de lipasas ofrece importantes ventajas actualmente no es factible debido al relativo alto costo del catalizador (Sharma *et al.*, 2001).

La transesterificación catalizada por álcalis se lleva a cabo en aproximadamente 60 °C bajo presión atmosférica ya que la temperatura de ebullición del metanol es de 65 °C a presión atmosférica durante 90 minutos, aunque se puede usar una temperatura más alta en combinación con mayor presión, pero esto encarece el proceso (Meher *et al.*, 2006). El metanol y los TAGs no se mezclan, por lo tanto la mezcla de reacción contiene dos fases líquidas, se pueden usar otros alcoholes, pero el metanol es el menos costoso (Fukuda *et al.*, 2001). Para evitar la pérdida de rendimiento debido a las reacciones de saponificación, es decir, la formación de jabón, el aceite y el alcohol deben estar secos y el aceite debe tener un mínimo de ácidos grasos libres. El biodiesel se recupera mediante lavado repetido con agua para eliminar el glicerol y el metanol (Chisti, 2007).

Las principales microalgas utilizadas en estudios para la producción de biocombustibles son las pertenecientes a los generos de *Nannochloropsis*, *Nannochloris*, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Botryococcus*, *Tetraselminas*, *Neochlorys*, *Isochrysis*, *Chlorococcum*, *Phaeodactylum*, *Thalassiosira*, *Pavlova* y *Prochlorococcus* (Larkum *et al.*, 2012).

1.1.2 Lípidos bioactivos de microalgas con alto valor agregado

Además de TAGs, la biomasa de las microalgas contiene una diversidad de bioproductos cuyo aprovechamiento comercial puede contribuir a la viabilidad económica de los sistemas de producción de biocombustibles (Mehta *et al.*, 2018). Las microalgas contienen una amplia gama de bioproductos tales como carbohidratos, proteínas, minerales, aceites, grasas, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), polifenoles, tocoferoles, aminoácidos, vitaminas, carotenoides, polifenoles, fibra dietética, reguladores del crecimiento de las plantas, como auxinas, giberelinas y citoquininas y pigmentos, tales como como carotenoides, clorofilas, con aplicaciones amplias en las industrias farmacéutica, de alimentos y de productos químicos (Budzianowski, 2017).

Los bioproductos se encuentran en baja proporción en la biomasa, sin embargo, tienen un alto valor comercial, por lo que se denominan bioproductos de bajo-volumen y de alto-valor que a diferencia de los lípidos para la producción de biocombustibles los cuales se necesitan en grandes volúmenes pero que son de bajo precio (Chen *et al.*, 2013). Los bioproductos que pueden obtenerse a partir de biomasa de las microalgas se agrupan

principalmente en biofarmacéuticos, biocosméticos, bionutrientes, bioquímicos, biofertilizantes y biomateriales con diversas aplicaciones tales como surfactantes, fragancias, tintes, colágeno y biomoléculas antienvjecimiento en la industria de los cosméticos (Michalak and Chojnacka, 2015).

Entre los bioproductos de las microalgas se encuentran compuestos bioactivos con actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, anticancerígena, antihipercolesterolemica y para el tratamiento de problemas cardiacos, con aplicaciones en la industria farmacéutica (Figura 1.3) (Budzianowski, 2017).

Entre los compuestos bioactivos existen lípidos bioactivos reconocidos por promover la salud humana más allá de ser una simple fuente de energía. Numerosos estudios han encontrado una asociación entre el consumo de ciertos lípidos bioactivos y la mejora de la salud humana, por ejemplo, la prevención, el retraso o el tratamiento de enfermedades crónicas y agudas, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, la osteoporosis y los trastornos inmunes (Kröger and Müller-Langer, 2012).

Los principales lípidos bioactivos son los ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, fitoesteroles y vitaminas liposolubles. Los lípidos bioactivos pueden incorporarse a los productos alimenticios en una variedad de formas. Pueden estar presentes de forma natural en los ingredientes alimenticios como aceites, huevos, leche, verduras, etc., o pueden agregarse como ingredientes funcionales específicos, como los fitoesteroles y las vitaminas (Chen *et al.*, 2013).

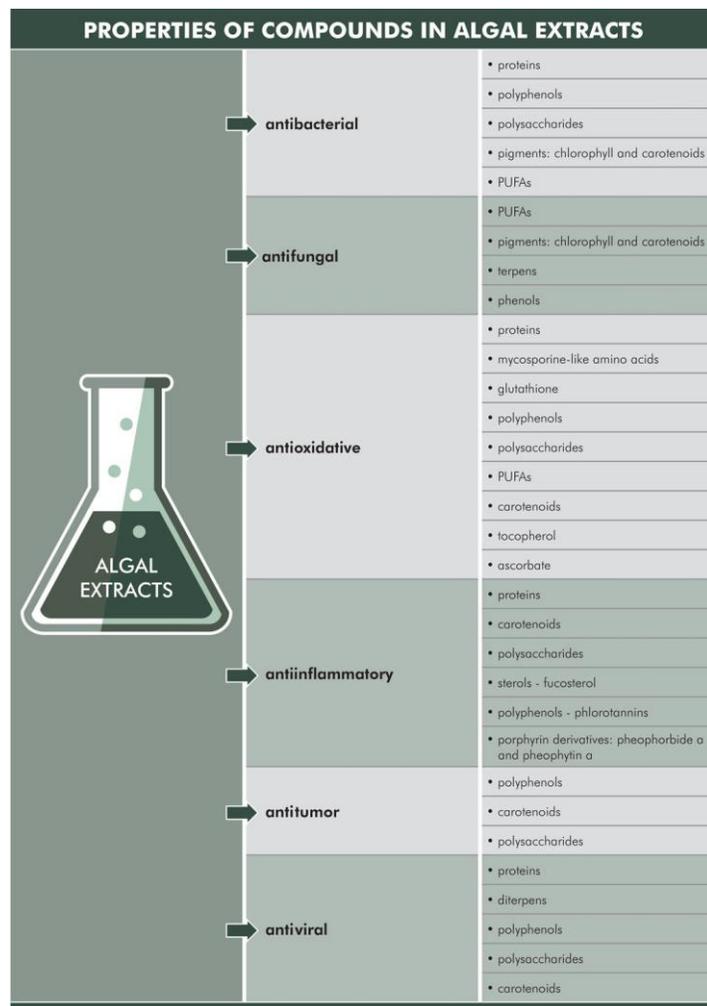


Figura 1.3 Propiedades de los compuestos bioactivos de microalgas (Michalak and Chojnacka, 2015).

Los lípidos bioactivos más eficaces que se ha introducido ampliamente en los productos alimenticios son los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFAs) de alto valor farmacéutico y nutricional: ácido gama-linoleico (GLA), ácido araquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (Figura 1.4) (Pulz and Gross, 2004). En los humanos, la biosíntesis de PUFAs de cadena larga (EPA, AA y DHA) depende de la ingesta alimentaria de ácido linoleico (18:2) y ácido α -linolénico (18:3) ya que los animales superiores han perdido la capacidad de sintetizar estos dos ácidos grasos, de ahí su designación como ácidos grasos esenciales (Napier and Sayanova, 2017).

El EPA y el DHA son importantes en el desarrollo de la de la retina y de los lípidos cerebrales en los bebés mientras que en adultos previene enfermedades cardiovasculares, reducen la presión arterial, inhiben el crecimiento de tumores cancerosos y mejora el rendimiento físico en los ancianos. También previenen la artritis reumatoide, la colitis ulcerosa, la dermatitis atópica y la psoriasis, y son esenciales para la composición normal de espermatozoides (Xue *et al.*, 2018).

Los PUFA tienen un gran mercado en la industria de los alimentos ya que se agregan a las fórmulas lácteas infantiles para promover el desarrollo de los infantes. Actualmente, el aceite de pescado es la fuente principal para la producción comercial de PUFA, sin embargo, los diversos potenciales terapéuticos y de salud del EPA y DHA en humanos han incrementado la explotación de los aceites de pescado marinos para satisfacer la demanda de la población humana cada vez mayor, que se espera que alcance los nueve mil millones para el año 2050 (Khozin-Goldberg and Iskandarov, 2011).

La sobreexplotación de los recursos marinos ha causado gran preocupación en los temas de seguridad alimentaria, biodiversidad y protección de los ecosistemas. Por otra parte, la calidad del aceite de pescado depende de varios factores tales como las especies de peces, el clima, la ubicación geográfica de los sitios de captura, la calidad del alimento consumido por los peces y el riesgo de contaminación por metales pesados y otros desechos industriales (Napier and Sayanova, 2017). La aplicación de PUFAs de aceite de pescado en alimentos, como en fórmulas infantiles o para usos farmacéuticos, puede tener algunas deficiencias debido al riesgo de contaminación mencionada anteriormente, así como el olor a pescado y el sabor desagradable que conlleva. Además, la purificación de PUFAs del aceite de pescado crudo es cara y relativamente difícil debido a la compleja mezcla de ácidos grasos con diferentes longitudes y grados de insaturación (Huang *et al.*, 2016).

Algunas microalgas también producen PUFAs por lo que el uso de éstas para producirlos es prometedor debido a su rápido crecimiento, la facilidad de producción y la abundancia de materias primas de bajo costo para el crecimiento como la luz solar, el agua, el dióxido de carbono y los nutrientes (Norashikin *et al.*, 2018).

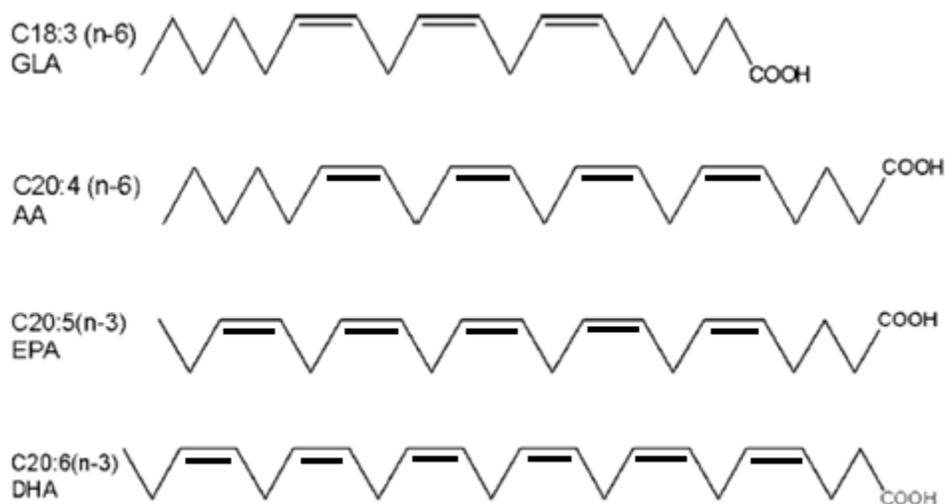


Figura 1.4 Ácidos grasos poliinsaturados de alto valor farmacéutico y nutricional. GLA: ácido gama-linoleico, AA: ácido araquidónico, EPA: ácido eicosapentanoico, DHA: ácido docosahexaenoico.

Los esteroides son otro grupo atractivo de lípidos bioactivos que se pueden extraer de la biomasa de las microalgas con aplicaciones en varios campos: productos farmacéuticos (producción de esteroides terapéuticos), nutracéuticos (antihipercolesterolémicos, aditivos en alimentos funcionales, anticancerígeno) y cosméticos (Michalak and Chojnacka, 2015).

Las fuentes comunes de fitoesteroides son los vegetales. La producción de alimentos enriquecidos con fitosterol se ha vuelto popular debido a la capacidad de los fitoesteroides para disminuir el colesterol total en humanos ya que inhiben la absorción del colesterol en la sangre. La ingesta de 1.6 g de fitoesteroides por día reduce de aproximadamente el 10% en el colesterol en la sangre (Chen *et al.*, 2013).

En años recientes se ha reconocido el enorme potencial de las microalgas como una fuente de compuestos bioactivos, aunque han sido poco exploradas en este aspecto, pueden convertirse en una fuente ilimitada de bioproductos gracias a su rápido crecimiento y a la posibilidad de cultivarlas continuamente (Plaza *et al.*, 2010).

1.2 El género *Chlorella*

Las especies del género *Chlorella* pueden encontrarse en una amplia variedad de ambientes acuáticos, exhiben una ocurrencia cosmopolita ya que han sido aisladas de cuerpos de agua dulce y salada con amplias diferencias entre sí (Richmond, 2004).

Las algas verdes unicelulares del género *Chlorella* pertenecen a los protistas fotosintéticos más populares. Estos organismos son un modelo experimental que representan perfectamente las propiedades bioquímicas y fisiológicas de macro y micrófitos verdes. Los trabajos pioneros para entender los procesos fundamentales de la fisiología de las plantas, tales como la fotosíntesis y la reducción de nitrato han sido estudiados en *Chlorella* (Becker, 2007). Debido a que el cultivo de las especies de este género es de fácil manejo y el crecimiento es predecible, estas han sido ampliamente en laboratorios de fisiología de plantas. Su versatilidad en sistemas de cultivo masivo ha colocado a *Chlorella* como un candidato prominente para diversas aplicaciones biotecnológicas (Krienitz *et al.*, 2015).

El nombre de *Chlorella* deriva del latín “*chlor*” que significa verde y “*ella*” que significa pequeño. La primera especie de este género, *Chlorella vulgaris*, fue descubierta en 1890 por el microbiólogo holandés Martinus Willem Beijerinck. Este género pertenece al grupo de las microalgas verdes el cual incluye más de 70000 especies que crecen en una variedad de hábitats. Las células de *Chlorella* son de forma redonda y miden entre 2-10 μm de diámetro (Safi *et al.*, 2014). Este grupo de microalgas posee dos tipos de clorofila con las que capturan la energía lumínica para sintetizar azúcares, tienen el contenido más alto de este pigmento entre todas las plantas conocidas lo cual les confiere su característico color verde profundo, las microalgas de este género no tienen motilidad (Richmond, 2004). En la Figura 1.5 se puede apreciar la estructura celular de *Chlorella vulgaris*, una de las especies mejor estudiadas del género *Chlorella*.

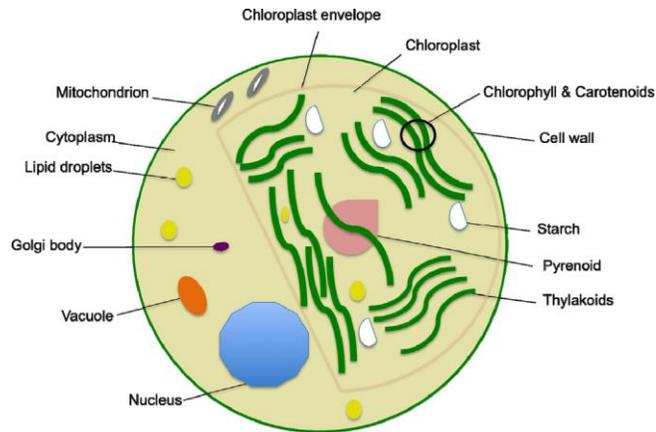


Figura 1.5 Ultraestructura esquemática de *C. vulgaris* representando diferentes organelos.

Las microalgas del género *Chlorella* se reproducen asexualmente mediante autoesporulación, la cual es la forma más común de reproducción asexual en microalgas (Figura 1.6). De esta manera, cuatro células hijas, las cuales poseen su propia pared celular se forman dentro de la pared celular de la microalga madre (Yamamoto *et al.*, 2004). Después de la maduración de las células recién formadas, la pared celular de la célula madre se rompe permitiendo la liberación de las células hijas y los residuos de las células madres serán consumidos como fuente de nutrientes por las células hijas (Figura 1.6) (Safi *et al.*, 2014).

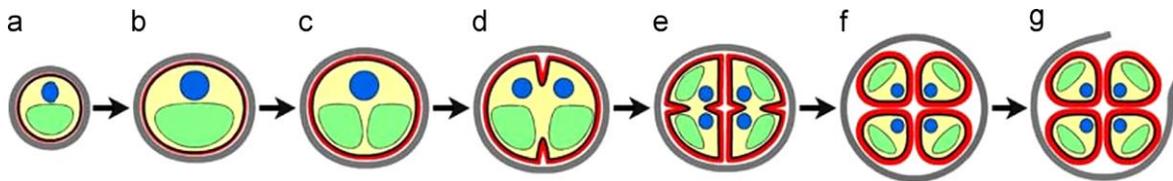


Figura 1.6 Esquema de las diferentes fases de la reproducción en *Chlorella vulgaris*: (a) fase temprana de crecimiento celular, (b) fase tardía de crecimiento celular, (c) fase de división del cloroplasto; (d) fase temprana de división del protoplasto; (e) fase tardía de división del protoplasto, (f) fase de maduración de las células hijas, y (g) fase de eclosión.

Chlorella saccharophila (UADY-PRIORI-014-FMVZ-04) es una microalga verde con potencial como fuente de lípidos para la producción de biodiesel debido a su alta producción de biomasa y lípidos así como por la composición de los ácidos grasos adecuados para la producción de biodiesel (Herrera-Valencia *et al.*, 2011).

Aunque las microalgas tienen potencial como fuente de lípidos para la producción de biocombustibles, principalmente biodiesel, el costo de producción de los lípidos para biocombustibles es todavía muy alto. Por lo tanto, es necesario reducir el costo de producción de TAGs en microalgas considerablemente para ser una fuente económicamente viable, para esto es preciso el incremento en la productividad y el contenido de estos metabolitos (Klok *et al.*, 2014). Para alcanzar este objetivo se han seguido varias estrategias como la bioprospección de especies sobreproductoras de TAGs, la manipulación de las condiciones de cultivo y el mejoramiento genético de las microalgas.

1.3 Estrategias para el mejoramiento de la producción de lípidos en microalgas

1.3.1 Bioprospección

Muchas de las especies de microalgas disponibles en la naturaleza no han sido exploradas hasta ahora, por lo tanto, la bioprospección de cepas prometedoras es una buena opción. Las diferencias interespecíficas en la producción de TAGs puede explicarse por la preferencia para acumular otros compuestos que compiten por carbono y energía, tal como el almidón (Steensels *et al.*, 2014).

Otro factor importante es el grado en el cual las diferentes especies de microalgas pueden mantener la tasa fotosintética bajo condiciones desfavorables de crecimiento. El grado en el cual disminuye la actividad fotosintética bajo limitación de nutrientes es específico de la especie y puede influir en gran medida en la cantidad de energía disponible para la síntesis de TAGs (Li *et al.*, 2010).

1.3.2 Manipulación de las condiciones de cultivo

Las tasas de síntesis de TAGs pueden incrementar a través de varias estrategias de cultivo, entre las cuales, el déficit de nitrógeno ha sido la más efectiva, ya sea limitándolo o eliminándolo de los cultivos (Hu *et al.*, 2008). En el cultivo con limitación de nitrógeno éste es suplementado al cultivo de tal manera que la tasa de producción de biomasa es limitada por la tasa a la cual el nitrógeno puede ser consumido, se suministra energía lumínica en exceso, provocando un desbalance de energía, por lo que los TAGs se

acumulan mientras continúa la proliferación y división celular, por lo tanto, esta estrategia se aplica generalmente en sistemas de cultivo continuo (Rodolfi *et al.*, 2009).

Por otra parte, el cultivo con eliminación de nitrógeno se caracteriza por una fase de producción de biomasa seguida por otra en la cual el nitrógeno no es suplementado en el medio de cultivo, en esta última fase, la producción de biomasa se detiene e inicia la acumulación de TAGs, esta estrategia se aplica en sistemas de cultivo por lote y es la que produce mejores resultados en términos de tasas de producción y contenido final de TAGs (Breuer *et al.*, 2013).

1.3.3 Ingeniería genética

Además de la exploración de las variantes de microalgas existentes en la naturaleza, existen técnicas que permiten incrementar la diversidad de microalgas mediante la generación de variantes artificiales (Klok *et al.*, 2014).

La ingeniería genética ha sido aplicada exitosamente en especies de plantas donde se ha logrado el incremento del contenido de lípidos en semillas y se ha inducido la síntesis de lípidos en tejidos donde normalmente no ocurre. Sin embargo, en microalgas, las técnicas para la alteración de vías metabólicas son escasas, existen limitados ejemplos de sobreexpresión dirigida y expresión heteróloga de genes y los resultados obtenidos han sido mixtos. Tampoco existe disponibilidad de sistemas confiables de transformación nuclear de microalgas como los que se usan en las plantas y esta técnica ha sido eficaz solo en un limitado número de especies, entre ellas la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii*, la diatomea oleaginosa *Phaeodactylum tricornutum* y el género *Nanochloropsis* (Stephens *et al.*, 2015).

Por otra parte, la transformación genética de las diferentes especies de microalgas requiere de herramientas moleculares particulares. Por lo tanto, se necesita investigación adicional para desarrollar las técnicas adecuadas de transformación para cada especie promisoría de microalga (Remmers *et al.*, 2018). Otra problemática derivada del uso de ingeniería genética en microalgas es que la utilización de organismos genéticamente modificados en sistemas de producción al aire libre resulta complejo puesto que es

necesario cumplir con las regulaciones que demanda el uso de estos organismos (Hlavova *et al.*, 2015).

1.3.4 Mutagénesis

Existen otras técnicas de mejoramiento genético que no se basan en las tecnologías del DNA recombinante para crear diversidad artificial en la cual los organismos generados son considerados no modificados genéticamente. Entre estas técnicas se encuentran la mutagénesis la cual genera mutaciones genéticas y acopla procedimientos estrictos de selección para el aislamiento de las variantes fenotípicas deseables (Steensels *et al.*, 2014).

La inducción *in vivo* de mutaciones por medio de mutágenos físicos o químicos y la selección subsecuente de células con fenotipo mejorado es una estrategia ampliamente utilizada para generar organismos con características mejoradas respecto al organismo parental. La mutagénesis ha demostrado ser un método efectivo para el mejoramiento genético y para incrementar la producción de numerosos metabolitos en diversos organismos (Steensels *et al.*, 2014).

A diferencia de la ingeniería genética, la mutagénesis física y química no requiere información sustancial bioquímica y genética del organismo y los mutantes pueden utilizarse en sistemas de producción abiertos ya que no están sujetos a procesos regulatorios como los organismos genéticamente modificados (Larkum *et al.*, 2012).

El mejoramiento de cepas mediante mutagénesis consiste de dos etapas claves: la mutagénesis y la selección de mutantes. En un experimento de mutagénesis tanto el tipo de mutágeno como la dosis de éste deben ser cuidadosamente seleccionados o determinados ya que diferentes mutágenos inducen diferentes tipos de mutaciones. Sin embargo, es generalmente difícil predecir qué tipo de alteración genética se requiere para mejorar cierto fenotipo y por lo tanto, que mutágeno debe ser utilizado, por ello, se recomienda cambiar el tipo de mutágeno en un programa de mutagénesis para probar tantos cambios genéticos como sean posibles (Steensels *et al.*, 2014).

En general, dosis muy bajas de mutágenos generaran una baja proporción de mutantes lo que hace difícil la identificación de mutantes con características mejoradas. Por otra parte,

muchos mutantes pueden contener solo una o pocas mutaciones lo cual reduce la posibilidad de encontrar mejoras y por lo tanto es necesaria la combinación de diferentes mutaciones. Las dosis altas de mutágenos generan mutantes que contienen múltiples mutaciones, de las cuales muchas pueden ser perjudiciales provocando una proporción grande de células disfuncionales e inviables, por lo tanto, la dosis óptima es aquella con la que se obtiene la mayor proporción de mutantes beneficiosos de aquellas células que logran sobrevivir lo cual depende muchas veces del organismo en estudio (Patnaik, 2008).

Los fenotipos simples que dependen de una o pocas mutaciones, como la auxotrofia, muestran una curva monótona dosis-respuesta lo cual indica que la fracción de mutantes deseables por células sobrevivientes incrementa junto con la dosis del mutágeno y alcanza un punto de saturación después del cual el número de mutantes con características deseables puede disminuir debido al incremento de la proporción de individuos con mutaciones perjudiciales (Rowlands, 1984).

Aunque altas dosis de mutágenos a menudo aceleran el mejoramiento de fenotipos, se recomienda utilizar bajas dosis para evitar la acumulación de mutaciones perjudiciales e incrementar solo la tasa de mutación cuando bajas tasas de mortalidad no generan mutantes con características mejoradas (Patnaik, 2008).

1.4 Mutaciones

Una mutación es un cambio en la secuencia de nucleótidos de un genoma. Las mutaciones pueden tener graves efectos en las células en que ocurren, una mutación en un gen clave puede resultar en una proteína defectuosa lo que podría provocar la muerte celular. Otras mutaciones tienen efecto menos significativo en el fenotipo de las células mientras que algunas no tienen ningún efectos (Watson *et al.*, 2004).

La mayoría de las mutaciones son puntuales, también llamadas mutaciones simples o de un solo nucleótido, las cuales consisten en la sustitución de un nucleótido por otro, mientras que otras surgen por deleciones o inserciones de uno o pocos nucleótidos. Las mutaciones puntuales se clasifican en transiciones y transversiones. En las transiciones ocurren sustituciones purina-purina (A→G, G→A) o pirimidina-pirimidina (C→T, T→C)

mientras que en las transiciones los cambios pueden ser purina-pirimidina (A→C, A→T, G→C, G→T) o pirimidina-purina (C→A, C→G, T→A, T→G) (Brown, 2007).

Las inserciones y deleciones son adiciones o pérdidas de pares de nucleótidos en un gen. Estas mutaciones tienen un efecto desastroso sobre la proteína resultante más a menudo de lo que lo hacen las sustituciones. Como el mRNA se lee con una serie de tripletes de nucleótidos durante la traducción, la inserción o la deleción de nucleótidos puede alterar el marco de lectura (el agrupamiento de tripletes) del mensaje genético. Una mutación de este tipo, denominada mutación del marco de lectura, se producirá siempre que el número de nucleótidos insertado o delecionado no sea múltiplo de tres (Brown, 2007).

Todos los nucleótidos que se encuentran en la dirección 3' de la deleción o de la inserción se agruparán de forma incorrecta en codones y el resultado será un sentido erróneo extenso que probablemente finalizará más tarde o más temprano en una terminación prematura y sin sentido. A menos que la mutación del marco de lectura se encuentre muy cerca del final del gen, la proteína producida casi con certeza no será funcional (Campbell and Reece, 2007).

1.4.1 Mutaciones espontáneas

Las mutaciones espontáneas pueden originarse de varias maneras, entre ellos, los errores durante la replicación, reparación o recombinación del DNA y pueden dar lugar a sustituciones, inserciones o deleciones de pares de bases y también a mutaciones que afectan a segmentos más largos de DNA. Las mutaciones espontáneas son a menudo generadas por apareamiento erróneo debido a que se encuentran en posiciones donde el nucleótido que es insertado en la cadena hija de polinucleótidos no es el complementario al que se encuentra en la cadena de DNA template. Si el error de apareamiento no es corregido en la cadena hija de DNA, después una de las moléculas nietas producidas en la siguiente ronda de replicación del DNA llevará una versión permanente de la mutación en ambas cadenas (Voet *et al.*, 2012, Weaver, 2012).

En *Escherichia coli* la síntesis de DNA ocurre con una tasa de error de sólo 1 por cada 10^{10} nucleótidos agregados. Sin embargo, estos errores no se encuentran uniformemente distribuidos entre las dos moléculas hijas de DNA, la cadena rezagada en la replicación es

propensa a aproximadamente 20 veces más errores que la cadena adelantada. Esta asimetría podría indicar que la DNA polimerasa I, la cual está involucrada solo en la replicación de la cadena rezagada, tiene una selección de bases y actividad de lectura de prueba menos efectiva que la DNA polimerasa III, la principal enzima de replicación (Brown, 2007). Sin embargo, no todas las mutaciones espontáneas son responsabilidad de las enzimas polimerasa. Algunas veces un error ocurre aun cuando las enzimas agregan el nucleótido correcto, aquel con la base complementaria de la cadena template. En este caso las mutaciones ocurren porque cada una de las cuatro bases nucleotídicas tiene dos tautómeros alternativos, es decir, isómeros estructurales que están en equilibrio dinámico (Figura 1.7) (Tropp, 2012).

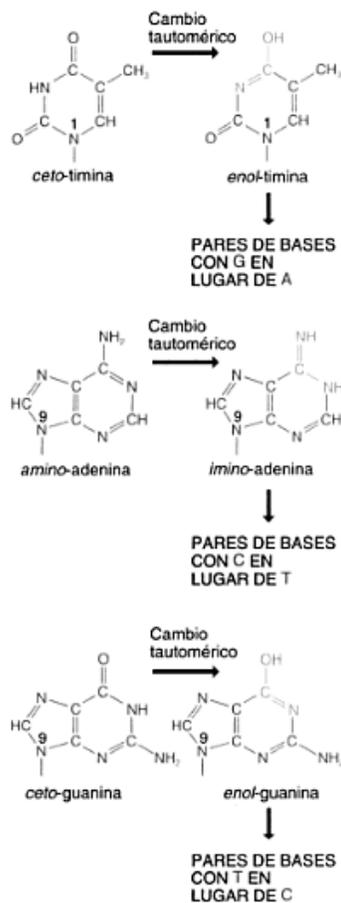


Figura 1.7. Efecto del tautomerismo en el apareamiento de bases nitrogenadas del DNA (Brown, 2007).

La timina existe como dos tautómeros, la forma *ceto* y *enol*, tales moléculas experimentan cambios de un tautómero a otro. El equilibrio está más sesgado hacia la forma *ceto*, sin embargo, esporádicamente la forma *enol* se presenta en el DNA templete en el preciso momento en que la horquilla de replicación pasa. Esto provocará un “error” debido a que la *enol*-timina se aparea con guanina en lugar de adenina (Campbell and Reece, 2007).

La adenina existe como la forma *amino* e *imino*, el tautómero *imino*-adenina se aparea preferencialmente con la citosina más que con la timina. La guanina también tiene tautómeros *enol* y *ceto*, la *ceto*-guanina se aparea con timina en lugar de adenina. La guanina tiene también tautómeros amino e imino, sin embargo, ambos se aparean con guanina. Después de la replicación, los raros tautómeros se revertirán inevitablemente a su forma más común provocando un apareamiento erróneo en la doble hélice de la molécula hija (Voet *et al.*, 2002).

1.4.2 Mutaciones inducidas

Las mutaciones inducidas son causadas por factores físicos y químicos, llamados mutágenos, tales como sustancias químicas y la radiación, los cuales reaccionan con el DNA parental causando cambios estructurales que afectan la capacidad de apareamiento de bases de los nucleótidos alterados. Usualmente esta alteración afecta solo a una de las cadenas de la doble hélice parental, por lo tanto, solo una de las moléculas hijas llevará la mutación, sin embargo, dos de las moléculas nietas producidas durante la siguiente ronda de replicación del DNA llevarán esta mutación (Campbell and Reece, 2007). Los agentes mutágenos se agrupan principalmente en dos categorías, físicos y químicos (Doan and Obbard, 2012).

1.5 Mutágenos físicos

1.5.1 Radiaciones ionizantes

Son aquellas formas de radiación de alta energía, tales como los rayos X y gamma las cuales son altamente mutagénicas. Tienen varios efectos sobre el DNA dependiendo del tipo y de la intensidad, pueden provocar mutaciones puntuales, inserciones y/o deleciones así como daños más severos que impiden la subsecuente replicación del genoma (Ikehata and Ono, 2011).

Cuando dichas radiaciones alcanzan una célula, ésta es absorbida por los átomos que encuentra, impartiendo energía a los electrones en sus capas exteriores. Estos electrones energizados son expulsados de los átomos, dejando radicales libres tras ello, es decir, átomos ionizados con electrones desapareados (Raven and Johnson, 2002).

Los radicales libres reaccionan violentamente con otras moléculas, incluyendo el ADN. Cuando un radical libre rompe ambos enlaces fosfodiéster de una hélice de ADN, provoca una rotura de la doble cadena y las enzimas de reparación de mutaciones habituales de las células no pueden reparar el daño. Los dos fragmentos creados por la ruptura deben ser alineados, mientras los enlaces fosfodiéster entre ellos se forman de nuevo. Las bacterias no tienen ningún mecanismo para lograr esta alineación, y roturas de doble cadena son letales para sus descendientes. En eucariotas, donde casi todos poseen varias copias de sus cromosomas, el complejo sinaptonémico montado en la meiosis se utiliza para emparejar el cromosoma fragmentado con su homólogo (Raven and Johnson, 2002).

1.5.2 Radiación ultravioleta (UV)

La radiación UV contiene mucha menos energía que las radiaciones ionizantes, no induce la expulsión de electrones de los átomos, y por lo tanto no produce radicales libres. Las únicas moléculas capaces de absorber la radiación UV son ciertos compuestos cíclicos orgánicos, cuyos electrones de capa externa se vuelven reactivos cuando absorben energía UV. El ADN absorbe fuertemente la radiación UV en las bases de pirimidina, timina y citosina, cuando dos pirimidinas, especialmente timinas, son adyacentes en una cadena de ADN, la absorción de la radiación UV causa la formación de enlaces covalentes entre ambas, generando dos principales dímeros de pirimidinas, el dímero ciclobutano de pirimidinas (CDP) (Figura 1.8A) y el fotoproducto (6-4) (Figura 1.8B) (Brown, 2007). El primero se forma mediante enlaces covalentes entre los carbonos 5 y 6 de ambas pirimidinas, mientras que el segundo se produce entre los carbonos número 4 y 6 de las pirimidinas adyacentes (Brown, 2007). Entre el 80 y 90 por ciento de los dímeros de pirimidina son (CPD) y entre el 10 y 20 por ciento son fotoproductos (6-4) (Weaver, 2012, Tropp, 2012). La radiación UV se considera como una forma segura, eficaz y simple de mutagenizar un organismo y se ha utilizado en diversas microlagas incrementar el contenido de lípidos y/o modificar la composición de ácidos grasos (Mehtani *et al.*, 2017).

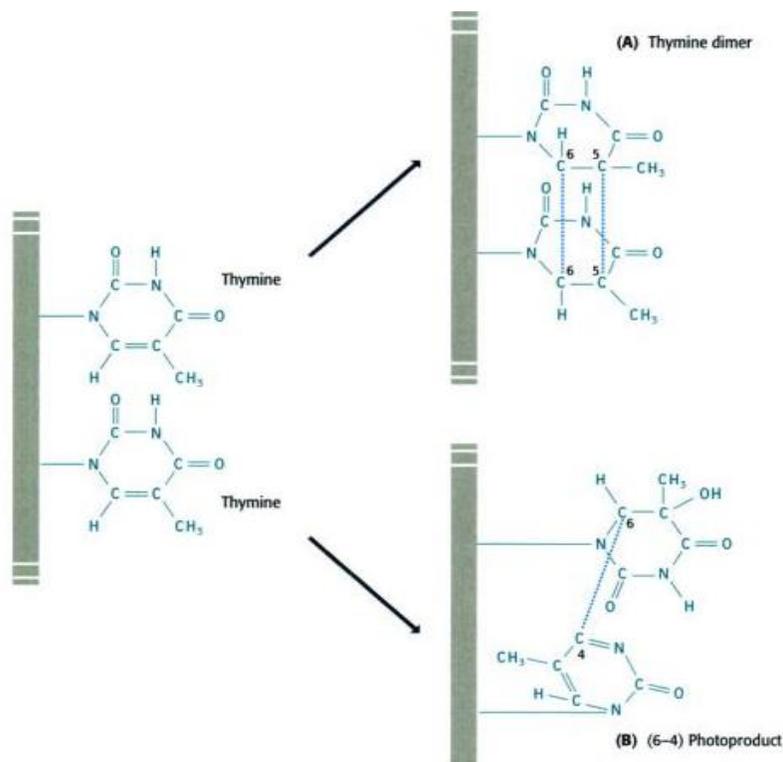


Figura 1.8 Productos de dimerización de pirimidinas por radiación UV (Brown, 2007).

La radiación UV provoca mutaciones mediante dos mecanismos principalmente. El primero de ellos es debido a que los dímeros de pirimidina (dímero ciclobutano o fotoproducto 6-4) introducen una "torcedura" en la doble hélice impidiendo la replicación del dúplex por la ADN polimerasa porque no son codificantes y la maquinaria de replicación no puede decir qué bases insertar frente a estas lesiones (Tropp, 2012). En estos casos, la ADN polimerasa puede dejar de replicar la parte de la cadena que incluye el dímero, saltando adelante y deja el área del problema a rellenar más tarde. Sin embargo, algunas veces el proceso de replicación se lleva a cabo de todos modos y las bases se insertan sin el apareamiento correcto de las bases nitrogenadas lo cual resulta en mutaciones en la secuencia de bases de la región dañada. Algunos dímeros de pirimidina no reparados bloquean la replicación del ADN completamente, lo que es letal para la célula (Raven and Johnson, 2002).

El segundo mecanismo de mutaciones causado por la radiación UV consiste en la sustitución de la citosina por timina en un dímero de pirimidinas debido a que la citosina presente en un anillo ciclobutano de pirimidina se vuelve inestable y se desamina fácilmente, convirtiéndose en uracilo lo cual provoca transversiones de A-T a C-G (Ikehata and Ono, 2011).

1.6 Mutágenos químicos

Los mutágenos químicos provocan mutaciones mediante la modificación química directa del ADN. Los productos químicos que modifican el ADN se agrupan en cuatro clases (Brown, 2007).

1.6.1 Análogos de bases nitrogenadas

Los productos químicos que se asemejan a los nucleótidos de ADN, se aparean incorrectamente cuando se incorporan en el ADN. La ADN polimerasa no puede distinguir entre timina y 5-bromouracilo, que son similares en forma (Figura 1.9) (Raven and Johnson, 2002).

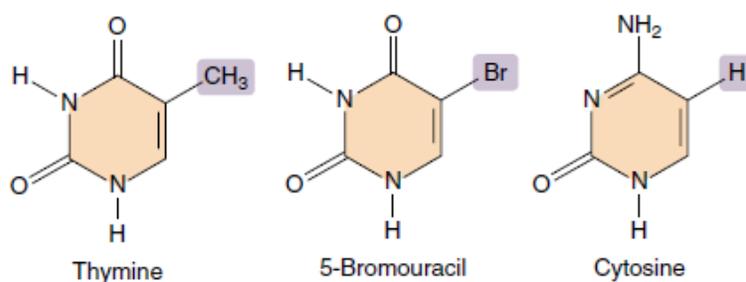


Figura 1.9 Mutágenos químicos análogos de bases nitrogenadas de ADN (Raven y Johnson, 2002).

Una vez incorporado en una molécula de ADN, sin embargo, el 5-bromouracilo tiende a reorganizarse a una forma que se asemeja a la citosina y se aparea con guanina. Cuando esto sucede, lo que originalmente era un par de bases A-T se convierte en un par de bases G-C. Algunos de los nuevos fármacos quimioterapéuticos contra el SIDA son análogos de bases nitrogenadas que se insertan en el ADN de la célula viral o infectada,

este ADN no puede transcribirse correctamente, por lo que ralentiza el crecimiento viral (Campbell and Reece, 2007).

1.6.2 Agentes desaminantes

Son aquellos químicos que remueven los grupos amino de las bases nitrogenadas causando mutaciones puntuales, ejemplos de ellos son el ácido nitroso el cual desamina a la adenina, citosina y guanina y el bisulfito de sodio el cual actúa únicamente sobre la citosina. La desaminación de la guanina no es mutagénica ya que la base resultante, xantina, bloquea la replicación cuando aparece en el polinucleótido templete. Sin embargo, la desaminación de la adenina produce hipoxantina la cual se aparea con citosina en lugar de timina mientras que la desaminación de citosina produce uracilo el cual se aparea con la adenina en lugar de la guanina. Por lo tanto, la desaminación de estas dos bases resulta en mutaciones puntuales cuando la cadena templete es copiada (Raven and Johnson, 2002).

1.6.3 Agentes intercalantes

Están asociados con mutaciones por inserción de nucleótidos. El mutágeno mejor conocido de este tipo es el bromuro de etidio, el cual fluoresce cuando es expuesto a radiación UV y es utilizado para revelar las posiciones de bandas de DNA en geles de agarosa después de la electroforesis. El bromuro de etidio al igual que otros agentes intercalantes son moléculas planas que pueden deslizarse entre las pares de bases de la doble hélice, desenrollando ligeramente la hélice e incrementando la distancia entre las pares de bases adyacentes (Brown, 2007).

1.6.4 Agentes alquilantes

Son un tipo de mutágeno que generan mutaciones puntuales. Químicos tales como el metanosulfonato de etilo (EMS) y dimetilnitrosamina agregan sus grupos alquílicos a los nucleótidos en las moléculas de DNA. El efecto de la alquilación depende de la posición en la cual el nucleótido es modificado y del tipo de grupo alquílico que es agregado. Las metilaciones, por ejemplo, a menudo producen nucleótidos modificados con propiedades alteradas de apareamiento de bases lo cual genera mutaciones puntuales. Otros agentes alquilantes bloquean la replicación por medio de la formación de entrecruzamientos entre

las dos cadenas de una molécula de DNA o por medio de la adición de grupos alquílicos grandes lo cual impide el progreso del complejo de replicación (Shrivastav *et al.*, 2009).

1.6.5 Metanosulfonato de etilo (EMS)

El EMS (Figura 1.10) posee su actividad biológica en su grupo etilo el cual puede ser transferido a una variedad de sitios nucleofílicos celulares. La transferencia del grupo etilo puede ser realizada a través del mecanismo de sustitución nucleofílica unimolecular (SN₁) o bimolecular (SN₂) (Sega, 1984).

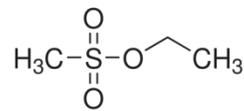


Figura 1.10 Fórmula estructural del metanosulfonato de etilo.

El EMS es altamente reactivo con los centros nucleofílicos tales como el átomo N⁷ de la guanina, N³-adenina y los átomos de oxígeno como O⁶-guanina, O²-timina. El EMS produce principalmente mutaciones GC→AT (Figura 1.11) porque agrega su grupo etilo en el O⁶ de las guaninas provocando el apareamiento erróneo de la O⁶-etilguanina con timina durante la replicación del DNA (Weaver, 2012).

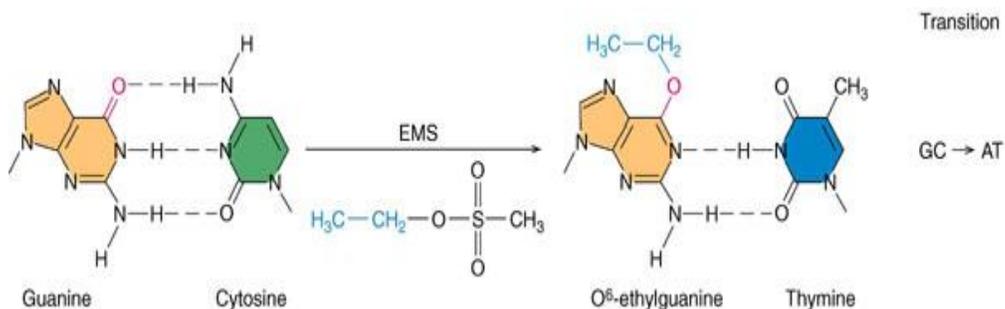


Figura 1.11 Alquilación del DNA por el metanosulfonato de etilo (Weaver, 2012).

1.7 Mecanismos de reparación de mutaciones

Hay dos mecanismos para reparar los daños en el ADN: (1) reversión directa del daño del mediante los mecanismo de la fotoreactivación y de enzimas metiltransferasas (2)

remoción y sustitución de la sección dañada del ADN mediante dos mecanismos, escisión y sustitución de bases y escisión y sustitución de oligonucleótidos (Watson *et al.*, 2004).

1.7.1 Fotorreparación

La fotorreparación es catalizada por una enzima llamada fotoliasa (Figura 1.12). Para el caso de los dímeros de pirimidinas, existen dos enzimas diferentes que catalizan la reparación de los CPDs y de los fotoproductos (6-4). La primera se llama CPD fotoliasa o simplemente fotoliasa y la otra se conoce como (6-4) fotoliasa. La CDP fotoliasa funciona de la siguiente manera: primero, la enzima detecta y se une al sitio de ADN dañado (un dímero de pirimidina), entonces la enzima absorbe la luz en la región UV-A a azul del espectro lo cual la activa y así puede romper los enlaces que mantienen unido el dímero de pirimidina. Esto restaura las pirimidinas a su estado original independiente. Finalmente, la enzima se disocia del ADN ya reparado (Weaver, 2012).

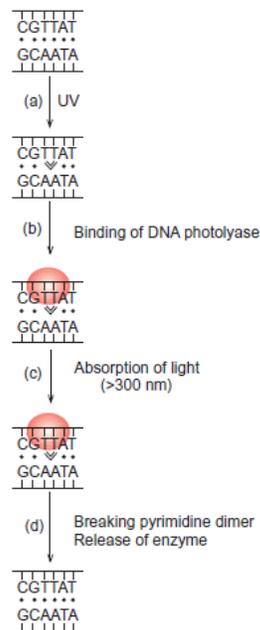


Figura 1.12 Mecanismo de fotorreparación de mutaciones. **a)** La radiación UV causa la formación de un dímero de pirimidinas, **b)** La enzima fotoliasa (rojo) se une a la región dañada del ADN, **c)** La enzima absorbe luz visible cerca de la región UV, **d)** La enzima rompe el dímero de pirimidinas y se disocia del ADN ya reparado.

1.7.2 Metiltransferasas

Los organismos que van desde *E. coli* hasta los seres humanos pueden revertir directamente otro tipo de daño, la alquilación del O6 de la guanina después de que el ADN es metilado o etilado, mediante una enzima llamada a O6-metilguanina metiltransferasas que repara el daño aceptando el propio grupo metilo o etilo (Figura 1.13) (Weaver, 2012). El sitio aceptor en la enzima para el grupo alquilo es el átomo de azufre de un residuo de cisteína. Estrictamente hablando, esto significa que la metiltransferasa no cumple una parte de la definición de una enzima, que se regenera sin cambios después de la reacción. De hecho, esta proteína parece ser inactiva de forma irreversible, por lo que es llamada una "enzima suicida" para denotar el hecho de que "muere" al realizar su función (Watson *et al.*, 2004). El proceso de reparación es por lo tanto costoso; cada evento de reparación cuesta una molécula de proteína. Una propiedad más de la O6-metilguanina metiltransferasa es que, al menos en *E. coli*, es inducida por la alquilación del ADN, esto significa que las células bacterianas que ya han sido expuestas a agentes alquilantes son más resistentes al daño del ADN que las células que acaban de exponerse a dichos mutágenos por primera vez (Tropp, 2012).

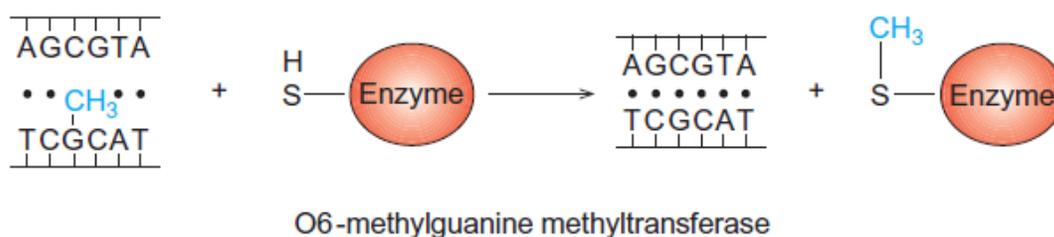


Figura 1.13 Mecanismo de reparación de mutaciones de la O6-metilguanina metiltransferasa. Un grupo sulfhidrilo de la enzima acepta el grupo metilo (azul) de una guanina en el ADN, lo cual la inactiva.

1.7.3 Escisión y sustitución de bases

El porcentaje de productos de daño de ADN que se pueden reparar por los mecanismos de reversión directa es pequeño y no incluyen ni dímeros de pirimidina ni productos de

alquilación del ADN, por lo que deben ser reparados por un proceso llamado escisión y reparación (Watson *et al.*, 2004). En este mecanismo el ADN dañado primero es removido, luego se reemplaza con ADN nuevo, por uno de dos mecanismos: reparación por escisión de la base o reparación por escisión del nucleótido. La reparación por escisión de la base es más frecuente y generalmente funciona en cambios comunes y relativamente sutiles en las bases del ADN, como las modificaciones químicas causadas por mutágenos químicos. La reparación por escisión de nucleótidos generalmente trata con cambios más drásticos en las bases, muchos de los cuales distorsionan la doble hélice del ADN como los dímeros de pirimidina causado por la luz UV (Weaver, 2012).

En la reparación por escisión de bases (BER) (Figura 1.14), una base dañada es reconocida por una enzima llamada ADN glicosilasa, que distorsiona el ADN de forma tal que extruye la base dañada de su asociación con la base apareada, y luego se rompe el enlace glicosídico entre la base dañada y su azúcar. Esto deja un sitio apurínico o apirimidínico (sitio AP), es decir, un azúcar sin su base de purina o pirimidina. Una vez que el sitio AP se crea, es reconocido por una AP-endonucleasa que corta, o mella, la cadena de ADN en el lado 5' del sitio AP (Tropp, 2012).

En *E. coli*, la fosfodiesterasa de ADN elimina el AP del azúcar fosfato, luego la ADN polimerasa I realiza la síntesis de la reparación al degradar el ADN en la dirección 5' → 3', mientras llena con nuevo ADN. Sin embargo, la ADN polimerasa no puede reparar las mellas, así que la ADN ligasa sella el resto para completar el trabajo. Muchas glicosilasas de ADN diferentes han evolucionado para reconocer diferentes tipos de bases dañadas. Los humanos tienen al menos ocho de estas enzimas. Debido a que las modificaciones químicas sutiles de las bases con frecuencia permiten la replicación del ADN, pero siguen causando errores de codificación, el mecanismo BER es importante para prevenir mutaciones (Watson *et al.*, 2004).

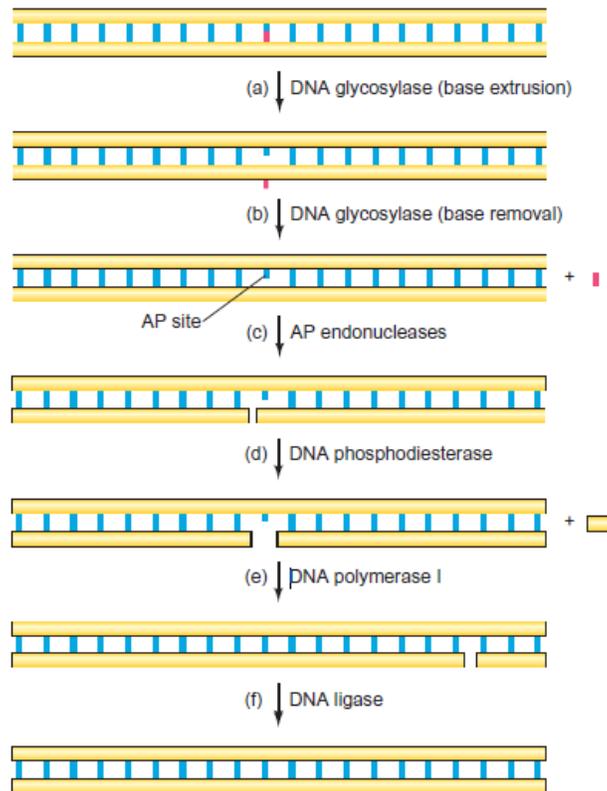


Figura 1.14 Reparación de mutaciones por escisión de bases. **a)** La DNA glicosilasa extruye la base dañada (rojo), **b)** Remoción de la base extruida dejando un sitio apurínico o apirimidínico (AP), **c)** La AP endonucleasa corta el ADN en el extremo 5' del sitio AP, **d)** La ADN fosfodiesterasa remueve el AP-desoxiribosa fosfato, **e)** La ADN polimerasa llena el vacío sintetizando ADN nuevo, **f)** La DNA ligasa sella las mellas dejadas por la ADN polimerasa.

1.7.4 Escisión y sustitución de nucleótidos

Los daños graves en las bases nitrogenadas, incluyendo los dímeros de pirimidina, se pueden eliminar directamente, sin ayuda de una ADN glicosilasa mediante la reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Figura 1.15) (Weaver, 2012). En este sistema, las enzimas de escisión reconocen la hebra con el daño y realiza cortes en cada lado del daño, eliminando un oligonucleótido que contienen la base dañada. La enzima clave que utilizan las células de *E. coli* en este proceso se denomina endonucleasa uvrABC porque contiene tres polipéptidos, los productos de los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*. Esta enzima corta el ADN dañado, produciendo un oligonucleótido de 12-13 bases de longitud, dependiendo si el daño afecta a un nucleótido (alquilaciones) o dos (dímeros de pirimidina) (Campbell and Reece, 2007).

Un término más general para este sistema enzimático que cataliza la reparación por escisión de nucleótidos es nucleasa de escisión o excinucleasa. En células eucariotas la excinucleasa elimina un oligonucleótido de alrededor de 24–32 nucleótidos de longitud, en lugar de uno de 12 a 13. En cualquier caso, la ADN polimerasa llena en el espacio dejado por el oligonucleótido escindido y la ADN ligasa sella la mella final (Figura 1.15) (Weaver, 2012).

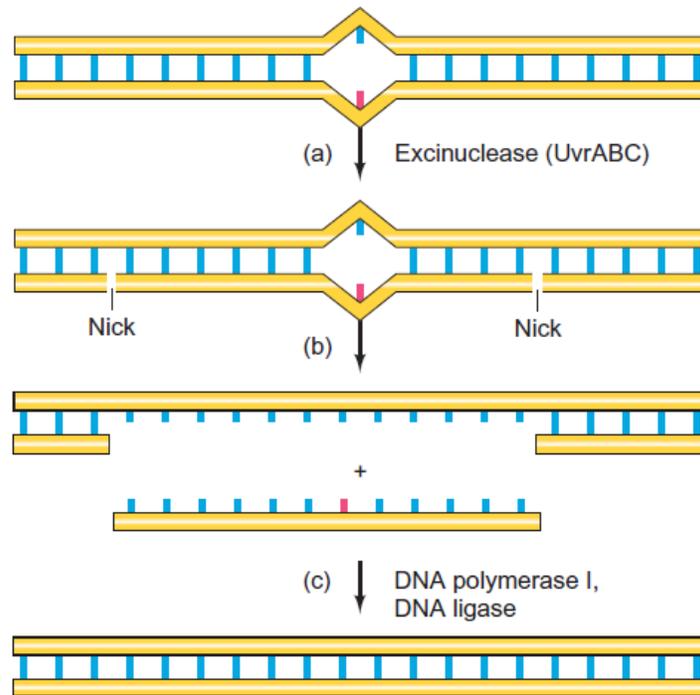


Figura 1.15 Reparación de mutaciones por escisión de nucleótidos. **a)** La excinucleasa uvrABC corta en ambos lados de una base dañada (rojo), **b)** Remoción de un oligonucleótido de 12 nucleótidos de longitud, **c)** La ADN polimerasa llena el vacío dejado por el oligonucleótido mediante la síntesis de ADN usando la cadena complementaria como template. La DNA ligasa sella las mellas dejadas por la ADN polimerasa.

1.8 Estrategias de selección de mutantes potencialmente sobreproductores de TAGs

La mutagénesis inducida con agentes físicos o químicos produce mutaciones puntuales generando diversidad genética en una población de mutantes dentro de la cual pueden existir individuos con características mejoradas respecto al organismo silvestre, por lo tanto, el aislamiento de éstos es una etapa de suma importancia y a la vez el principal reto en un proyecto de mutagénesis (Larkum *et al.*, 2012). La presión selectiva (Tapia *et al.*,

2012) y la centrifugación en gradiente de densidad (Eroglu and Melis, 2009), son estrategias que pueden facilitar la obtención de mutantes potencialmente sobreproductores de TAGs.

1.8.1 Presión selectiva

La presión selectiva es una técnica que permite el aislamiento de mutantes con el fenotipo de interés dentro de una población y consiste en someter a una población mutagenizada a un agente selectivo en cuya presencia el organismo silvestre no puede crecer, las células con resistencia al agente selectivo pueden ser aisladas de una población de millones de células, seleccionando aquellos organismos sobrevivientes (Steensels *et al.*, 2014).

1.8.2 Presión selectiva con pH ácido

Se ha observado que el pH ácido en el medio de cultivo incrementa la acumulación de TAGs en microalgas acidófilas. Tatsuzawa *et al.* (1996) evaluaron el efecto del pH ácido (1, 3 y 6) en el medio de cultivo sobre la composición de lípidos y ácidos grasos de la microalga acidófila *Chlamydomonas* sp. y lo compararon con *Chlamydomonas reinhardtii*, una microalga neutrófila. Los autores reportaron que el porcentaje relativo de triacilglicéridos respecto al contenido total de lípidos de *Chlamydomonas* sp. Cultivada a pH1 fue mayor comparado con valores superiores de pH (3, 5 y 7). Los autores sugieren que *Chlamydomonas* sp. la acumulación de triacilglicéridos, como lípidos de almacenamiento, es un mecanismo de adaptación a niveles bajos de pH para prevenir el desbalance osmótico causado por las altas concentraciones de H₂SO₄. Poerschman *et al.* (2004) reportaron 19.7% mayor contenido de ésteres metílicos de ácidos grasos FAME, por sus siglas en ingles), una medida indirecta del contenido de TAGs, en una cepa de *Chlamydomonas* sp. aislada de un lago minero ácido cuando fue cultivada a pH 2.7 comparado con pH 7. Por otra parte, Eibl *et al.* (2014) reportaron observaron mayor contenido de lípidos (11%) e incremento significativo de la cantidad de FAMEs en una cepa de *Scenedesmus* ssp. cuando fue cultivada a pH 3 comparado con pH 7. La acumulación de TAGs en respuesta a la disminución del pH ha sido reportado también en la diatomea *Pinnlaria braunii* (Yamamoto y Tatsuzawa, 1995). Por lo tanto, el aislamiento de mutantes de *C. saccharophila* resistentes a pH ácido podría facilitar la obtención de microalgas que acumulen una mayor cantidad de TAGs que la cepa silvestre.

1.8.4 Selección de mutantes por el método de gradiente en caja Petri

El método emplea una caja Petri con dos capas complementarias de agar. La primera capa consiste de medio de cultivo con agar la cual se agrega mientras la caja se encuentra inclinada lo suficiente para cubrir ligeramente uno de los bordes y se permite solidificar. Después se coloca la caja en posición horizontal y se agrega un volumen igual de medio de cultivo con agar el cual contiene la concentración apropiada del agente selectivo, aproximadamente de 2 a 10 veces la concentración inhibitoria para el microorganismo en cuestión. La difusión del agente selectivo resulta en su dilución proporcional al grosor de las capas de agar, estableciéndose un gradiente de concentración uniforme. Cuando se esparce una suspensión de microorganismos sobre la superficie de agar, solo las células resistentes al agente selectivo son capaces de desarrollar colonias más allá del límite que delimita la concentración inhibitoria para la mayoría de las células (Szybalski and Bryson, 1952). Este método permite reducir considerablemente la cantidad de antimicrobiano requerido para un experimento y es útil para determinar el rango de concentración de un inhibidor que un organismo puede resistir el cual puede ser utilizado para la selección de mutantes resistentes (Harris, 2008). Los tipos de gradientes que pueden formarse con este método dependerán del producto químico que se agregue en una o ambas capas de agar. Los dos tipos más comunes de gradiente en caja son los de antibióticos y de pH (Weinberg, 1959).

Los gradientes de pH se preparan agregando un ácido en el volumen de agar de la primera capa y un álcali en el volumen de agar de la segunda capa. Después de la solidificación de las capas, se puede verificar la formación del gradiente de pH colocando sobre la superficie de la caja, en dirección del gradiente, una tira de papel filtro previamente sumergida en un indicador de pH tal como el azul de bromotimol (Weinberg, 1959). Los gradientes con antimicrobianos se preparan mediante la adición de un compuesto antimicrobiano a la porción de medio de cultivo con agar que será vertido ya sea en la primera o segunda capa. La concentración de antimicrobiano utilizada dependerá del organismo evaluado, el tipo y la potencia del compuesto y la cantidad de inhibición deseada. La concentración apropiada puede ser determinada en pruebas preliminares en la cual se evalúen cantidades individuales del compuesto (Weinberg, 1959).

JUSTIFICACIÓN

Las microalgas son una fuente promisoría de lípidos para la producción de biocombustibles así como de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) para la nutrición humana y de lípidos bioactivos de alto valor agregado. Sin embargo, la producción comercial aún no es económicamente viable. *Chlorella saccharophila* (UADY-PRIORI-014-FMVZ-04) es una fuente potencial de lípidos para la producción de biocombustibles debido a su alta producción de biomasa y de lípidos, así como por la composición de los ácidos de sus TAGs, idóneos para la producción de biodiesel. El incremento en la producción de TAGs y el aprovechamiento comercial de lípidos bioactivos de alto valor agregado puede contribuir a la viabilidad económica de este proceso. La mutagénesis física acoplada a estrategias de selección permite obtener organismos con características mejoradas respecto a la cepa silvestre, por lo que estas estrategias de mejoramiento genético tienen el potencial de generar nuevas líneas celulares de *C. saccharophila* con mayor producción de TAGs. Aunado a esto, se desconoce la composición de las fracciones lipídicas de otros lípidos de interés comercial de *C. saccharophila*, por lo que el análisis lipídico de esta microlaga podría identificar lípidos bioactivos de alto valor agregado con aplicaciones industriales.

HIPÓTESIS

La mutagénesis física con radiación ultravioleta (UV) de *C. saccharophila* acoplada al uso del pH ácido, como estrategia de selección de mutantes, permitirá obtener líneas celulares tolerantes a pH ácido con mayor producción de TAGs, PUFAs y lípidos bioactivos que la cepa silvestre.

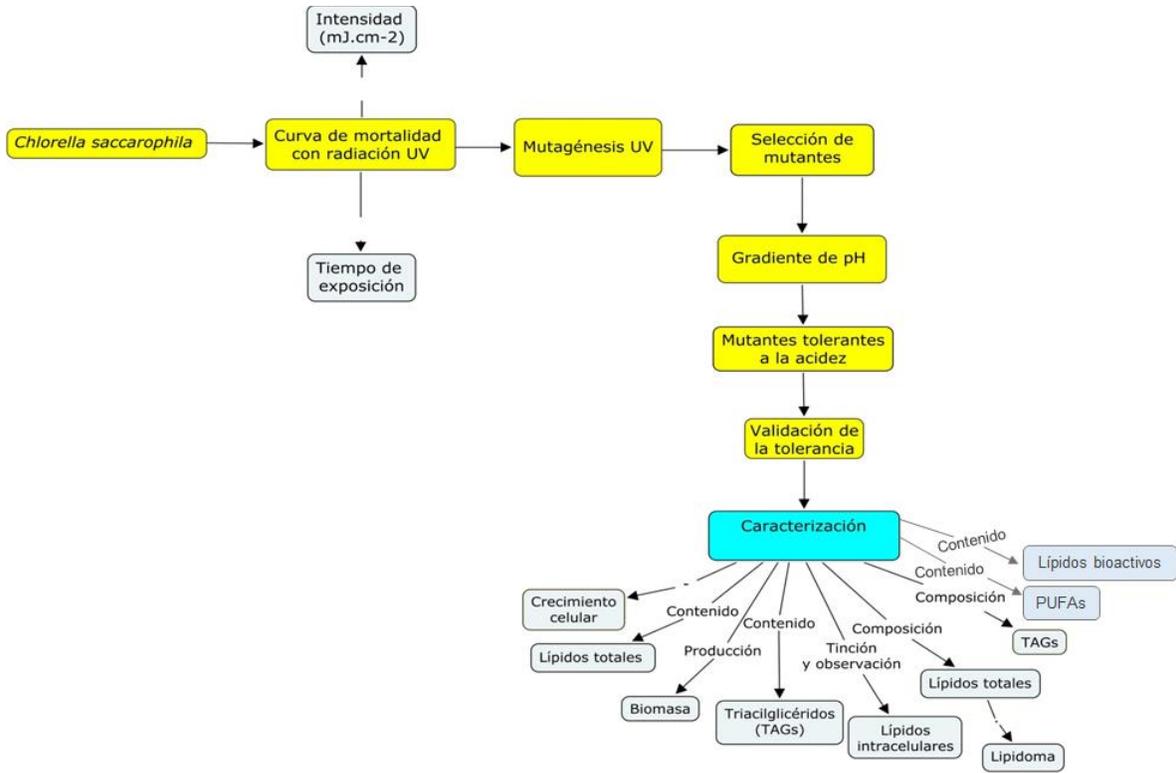
OBJETIVO GENERAL

Mejorar genéticamente a *C. saccharophila* para incrementar la producción de triacilglicéridos, PUFAs y lípidos bioactivos mediante mutagénesis física con radiación UV.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el contenido y el perfil de triacilglicéridos en mutantes de *C. saccharophila* tolerantes a la acidez.
2. Evaluar el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en mutantes de *C. saccharophila* tolerantes a la acidez.
3. Analizar el lipidoma de las mutantes de *C. saccharophila* tolerantes a la acidez para identificar lípidos bioactivos de alto valor comercial.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





CAPÍTULO II

PRODUCCIÓN MEJORADA DE TRIACILGLICÉRIDOS Y DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN NUEVAS MUTANTES TOLERANTES A LA ACIDEZ DE LA MICROALGA VERDE *Chlorella saccharophila*

RESUMEN

En este estudio, la microalga *Chlorella saccharophila* se sometió a mutagénesis ultravioleta (UV) y la selección de mutantes se realizó en función de la tolerancia a la acidez para generar mutantes con un incremento del contenido de triacilglicéridos (TAG) y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Se generaron dos cepas mutantes mejoradas (M1 y M5). M1 y M5 acumularon 27.2% y 27.4% más TAGs, respectivamente, y mostraron una intensidad de fluorescencia más fuerte que la cepa silvestre (WT) cuando se tiñeron con el colorante lipofílico Rojo Nilo. En la mutante M1, el 50.5% de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) fueron saturados (C16:0 y C18:0) y el 25.27% fueron monoinsaturados (C18:1) los cuales son adecuados para la producción de biocombustibles. En la mutante M5, el 65.19% del total de FAMEs fueron PUFA nutricionales (C16:2, C18:2 y C18:3), mientras que estos FAMEs no se detectaron en la cepa WT. Estos resultados demostraron que la mutagénesis UV acoplada a una estrategia de selección con pH ácido representa una plataforma valiosa y rápida para generar mutantes de *C. saccharophila* con contenidos mejorados de TAG y PUFA para biocombustibles y aplicaciones nutraceuticas, respectivamente.

NOTA: El contenido de este capítulo fue publicado como: Enhanced production of triacylglycerols and polyunsaturated fatty acids in novel acid-tolerant mutants of the green microalga *Chlorella saccharophila*. Jalsen Iván Teco-Bravo, Luis Felipe Barahona-Pérez, Carlos Francisco Reyes-Sosa, Ángela Francisca Ku-González, Virginia Aurora Herrera-Valencia, Santy Peraza-Echeverría. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Springer. ISSN: 1615-7605. DOI: 10.1007/s00449-019-02153-2.

2.1 INTRODUCCIÓN

Las microalgas ofrecen un alto potencial como materia prima sostenible para producir biocombustibles a partir de lípidos así como de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) para la nutrición y la salud humana (Sarayloo *et al.*, 2018). Sin embargo, el proceso de producción de lípidos de microalgas aún no es viable comercialmente; para que sea rentable, es necesario mejorar ya sea la producción de biomasa o la biosíntesis de triacilglicerol (TAGs) en la biomasa disponible (Klok *et al.*, 2014).

Se han probado varias estrategias para aumentar el contenido de TAGs en microalgas, como el pH alcalino, la temperatura, la salinidad y la deficiencia de nutrientes (Paliwal *et al.*, 2017). La deficiencia de nitrógeno, un proceso de dos etapas, ha sido considerada como la manera más eficiente de mejorar la acumulación de lípidos neutros intracelulares en microalgas; sin embargo, esta es una estrategia que consume tiempo y que disminuye la productividad total de los lípidos (Jagadevan *et al.*, 2018). Recientemente, nuestro grupo de investigación descubrió que el tratamiento con ácido abscísico (ABA) condujo a un aumento significativo en la acumulación de TAGs en *Chlorella saccharophila* (Contreras-Pool *et al.*, 2016). La ingeniería genética es también una alternativa para mejorar la producción de TAGs en microalgas, sin embargo, el progreso en esta tecnología se ha desarrollado principalmente para la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii*, mientras que el número de genomas completamente anotados, de herramientas moleculares específicas y de genes funcionalmente caracterizados que participan en el metabolismo de los lípidos es limitado en la mayoría de las especies de microalgas; por lo tanto, esta tecnología prometedora está aún en desarrollo (Remmers *et al.*, 2018).

Alternativamente, la mutagénesis ha demostrado ser un método efectivo para el mejoramiento genético y para incrementar la producción de numerosos metabolitos en diversos organismos (Steensels *et al.*, 2014). La mutagénesis inducida es ventajosa ya que no requiere un amplio conocimiento de la genética y bioquímica del organismo en cuestión, lo cual no está disponible actualmente para la mayoría de las especies de microalgas (Jagadevan *et al.*, 2018). La mutagénesis se puede lograr mediante el tratamiento de células con radiación UV, irradiación de iones pesados y con sustancias químicas, de estos métodos, la radiación UV se considera como una forma segura, eficaz

y simple de mutagenizar un organismo (Mehtani *et al.*, 2017). Se han realizado varios estudios de mutagénesis UV en microalgas para aumentar el contenido de lípidos o modificar la composición de ácidos grasos. Por ejemplo, en mutantes de *Scenedesmus obliquus* deficientes en la biosíntesis de almidón se observó 41% mayor contenido de ácidos graso totales y un contenido significativamente mayor de TAGs comparado con la cepa silvestre (de Jaeger *et al.*, 2014). Un incremento del 123% en el contenido de lípidos neutros y un contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) significativamente mayor se reportó en mutantes de *Tetraselmis suecica* (Lim *et al.*, 2015). En mutantes de *Chlorella vulgaris* se observó mayor contenido de lípidos totales (42%), FAMEs y PUFAs que en la cepa silvestre (Sarayloo *et al.*, 2017).

El desarrollo de métodos específicos y eficientes de selección de mutantes es el desafío principal para obtener cepas mejoradas mediante mutagénesis, la presión selectiva se aplica comúnmente para identificar células mejoradas fenotípicamente entre todos los mutantes generados (Steensels *et al.*, 2014).

Tatsuzawa *et al.* (1996) analizaron la composición de lípidos y de ácidos grasos en la microalga acidófila *Chlamydomonas* sp. cultivada a niveles de pH de 1, 3 y 6 y lo compararon con los de *Chlamydomonas reinhardtii* cultivada a pH neutro. Los autores encontraron que el contenido de TAGs con respecto al contenido total de lípidos de *Chlamydomonas* sp. incrementó a medida que el pH disminuyó. Poerschman *et al.* (2004) reportaron mayor rendimiento de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), una medida indirecta de la acumulación de TAGs, en una cepa de *Chlamydomonas* sp. aislada de un lago minero ácido, cuando se cultivó a pH 2.7 comparado con pH neutro. De la misma manera, Eibl *et al.* (2014) encontraron un mayor rendimiento de FAMEs y contenido de lípidos en una cepa de *Scenedesmus* spp. aislada de un cuerpo de agua de pH ácido (pH 4.5) cuando fue cultivada a pH 3 comparado con pH 7. La acumulación de TAG se ha propuesto como un mecanismo de adaptación en condiciones ácidas para prevenir el desequilibrio osmótico causado por la alta concentración de H₂SO₄ (Tatsuzawa *et al.*, 1996) y el efecto osmótico de H₂SO₄ se ha demostrado previamente (Fuggi *et al.*, 1988a, 1988b). También se ha demostrado que el estrés osmótico aumenta el contenido de TAG en la microalga *D. salina* (Paliwal *et al.*, 2017) mientras que en *C. saccharophila*, nuestro grupo de investigación descubrió previamente que el estrés osmótico por NaCl aumentó el

porcentaje del FAME total, una medida indirecta del contenido de TAG (Herrera-Valencia *et al.*, 2011). A partir de estos hallazgos, propusimos que el pH ácido podría usarse como un método de detección en experimentos de mutagénesis de microalgas para seleccionar nuevas cepas con alto contenido de TAG. A partir de estos estudios, proponemos que el pH ácido podría usarse como método de selección de mutantes en experimentos de mutagénesis de microalgas para seleccionar nuevas cepas con alto contenido de TAGs.

Previamente, nuestro grupo de investigación reportó una cepa de *C. saccharophila* aislada de la Península de Yucatán, México como una fuente potencial de lípidos para la producción de biocombustibles debido a su alta producción de biomasa, su contenido de lípidos y por la composición de los ácidos grasos (Herrera-Valencia *et al.*, 2011). En este estudio, se sometió a mutagénesis UV a esta cepa de *C. saccharophila* seguido de un método de selección de mutantes basado en la tolerancia a la acidez para obtener nuevos mutantes con mayor contenido de TAGs y PUFAs que la cepa silvestre.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Cepa de microalga y condiciones de cultivo

Chlorella saccharophila (UADY-PRIORI-014-FMVZ-04) se cultivó en medio Tris-acetato-fosfato (TAP) (Harris, 1989) en condiciones axénicas a 25 ± 2 °C, bajo un fotoperiodo 16/8 h (luz/oscuridad), con intensidad lumínica de $20 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ en agitación a 140 rpm (Herrera-Valencia *et al.*, 2011).

2.2.2 Mutagénesis UV

Suspensiones celulares (20 mL , 1×10^6 células mL^{-1}) de *C. saccharophila* en crecimiento exponencial se transfirieron a una caja Petri estéril y se expusieron a radiación UV (254 nm , 120 mJ cm^{-2}) en un reticulante de UV (CL-1000; UVP, Upland, CA, USA) a 24 °C, posteriormente se transfirió a matraces estériles y se mantuvo en oscuridad durante 24 h para prevenir los mecanismos de fotorreactivación (Sivaramakrishnan e Incharoensakdi, 2017). Para determinar el tiempo óptimo de irradiación UV, se obtuvo previamente la dosis letal media (LD_{50}) mediante la exposición de *C. saccharophila* a radiación UV durante 0 , 12 , 18 , 24 , 36 , 48 y 60 segundos. Después de cada período de exposición, se tomaron alícuotas de 1 mL , se diluyeron (diluciones seriadas de 1000 veces), se

inocularon en medio TAP con agar (15 g L^{-1}) y se incubaron durante 10 días a $24 \text{ }^\circ\text{C}$. Siguiendo el método estándar de diluciones en serie, se contaron las unidades formadoras de colonias; se calculó la tasa de mortalidad para cada tiempo de exposición y se realizó un análisis de regresión Probit.

2.2.3 Selección de mutantes

La selección de mutantes de *C. saccharophila* se realizó mediante presión selectiva a pH ácido. Aproximadamente 4×10^7 células mutagenizadas se esparcieron sobre la superficie de un gradiente de pH en caja Petri y se incubaron durante 20 días a $24 \text{ }^\circ\text{C}$. El mismo número de células no mutagenizadas se inoculó en las mismas condiciones como control interno. Las colonias que crecieron en la región ácida del gradiente, más allá del pH limitante para la mayoría de las células, se aislaron para una caracterización adicional. Los gradientes de pH en caja Petri se prepararon de acuerdo a lo descrito por Wimpenny y Waters (1984). En resumen, se agregaron 10 mL de agar fundido que contenía TAP + 666 μL de una solución estéril de H_2SO_4 0.5 M como primera capa del gradiente y 10 mL de agar fundido que contenía TAP + 500 μL de una solución estéril de NaOH 1 M como la segunda capa. El gradiente de pH se verificó colocando una tira de papel filtro, previamente sumergido en una solución de azul de bromotimol (0.04%, p/v), en la superficie de la caja en dirección del gradiente. El azul de bromotimol se torna amarillo en pH ácido, verde en neutro y azul en alcalino. El pH a lo largo del gradiente se midió utilizando un potenciómetro de electrodo plano (Exstik II EC500, New Hampshire, EE. UU.).

2.2.4 Validación de la tolerancia y comparación de la sensibilidad a la acidez de las mutantes

Suspensiones celulares (1×10^5 células) de una colonia individual aislada en la etapa de selección de mutantes se inocularon de forma lineal sobre una superficie de un gradiente de pH, paralelo al eje del gradiente, utilizando hisopos de algodón estériles. De la misma manera, se inoculó una colonia de la cepa silvestre en el mismo gradiente de pH. Las cepas cuya longitud de crecimiento fue mayor que la silvestre se consideraron mutantes. Posteriormente, se evaluó la tolerancia máxima a la acidez de estas cepas mutantes en

medio líquido cultivándolas en matraces de 50 mL que contenían 10 mL de medio TAP ajustado a pH 6.5, 6, 5.5 y 5 con una concentración celular inicial de 1×10^5 células mL⁻¹.

2.2.5 Evaluación del crecimiento celular

Las cepas silvestres y mutantes se cultivaron en matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio TAP (1×10^5 células mL⁻¹) ajustado ya sea a pH 6 o 7 durante 10 días. Se evaluó el efecto del pH en la concentración celular, el peso de biomasa seca (DBW) y el contenido de lípidos y TAG. Al final de este período, la concentración celular se midió con un hemocitómetro de Neubauer (Hausser Scientific, Horsham, USA) y un microscopio óptico (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). La biomasa se deshidrató en una liofilizadora (Labconco, Freezone 6, Kansas City, EE. UU.) durante 48 h y se pesó para obtener el peso de la biomasa seca (Herrera-Valencia *et al.*, 2011).

2.2.6 Contenido de lípidos totales y TAGs

Los lípidos totales se extrajeron de la biomasa seca de las microalgas utilizando una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v) de acuerdo a lo descrito por Contreras-Pool *et al.* (2016). El procedimiento se repitió dos veces para lograr la extracción completa de los lípidos. El contenido de TAGs en el extracto lipídico total se cuantificó utilizando el kit de triglicéridos glicerol fosfato oxidasa/peroxidasa (BioSystems, Costa Brava, Barcelona, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.7 Fluorescencia intracelular de lípidos neutros

Se tiñeron células de *C. saccharophila* con el colorante fluorescente lipofílico Rojo Nilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE. UU.) a una concentración final de 0.1 mg mL⁻¹ como lo describen Cakmak *et al.* (2012). Se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal y se editaron con el software de visualización Olympus FV 10 ASW 4.1 CLSM (Olympus) como lo descrito por Contreras-Pool *et al.* (2016).

2.2.8 Análisis de la composición de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES)

La cepa silvestre y las mutantes M1 y M5 se cultivaron en biorreactores “Celstir” (Wheaton Scientific, New Jersey, USA) que contenían 1 L de medio TAP (pH 7) con una concentración celular inicial de 1×10^5 células mL⁻¹ durante 10 días, en las mismas

condiciones descritas en la Sección 2.2.1. La extracción de lípidos se realizó como se describe en la Sección 2.2.6 y se repitió cinco veces. El extracto lipídico se fraccionó mediante cromatografía en columna de acuerdo a lo descrito por Herrera-Valencia *et al.* (2012). La fracción que contenía los TAGs se disolvió en 500 μL de heptano. Se usaron 400 microlitros para la transesterificación mediante incubación con 20 μL de una solución de metóxido de sodio (2% p/p de la fracción TAGs) a 60 °C durante 90 minutos en agitación, se añadieron 100 μL de acetato de etilo para homogeneizar el medio de reacción. El producto de la reacción se limpió en una microcolumna empaquetada con gel de sílice usando cloroformo como eluyente. Para el análisis de la composición de FAMES se inyectó 1 μL de muestra en un cromatógrafo Agilent 78900 equipado con un detector de masas Agilent 5977 MSD. Los compuestos se perfilaron en una columna Agilent THP-5 MS de 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm . Las condiciones fueron: temperatura inicial de 70 °C en isoterma por 5 min, con una rampa de calentamiento de 10 °C min^{-1} hasta 200 °C y mantenida en isoterma por 5 min, y la última rampa de 20 °C min^{-1} hasta 290 °C, manteniendo en isoterma 15 min. El gas acarreador fue H_2 a 1 mL min^{-1} .

2.2.9 Análisis de datos

Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar la significancia estadística entre los tratamientos. La prueba de diferencia mínima significativa de Fisher ($p \leq 0.05$) se usó para comparaciones múltiples entre medias. Se realizó un análisis de componentes principales de la cepa silvestre y mutantes de *C. saccharophila* con base en diez variables cuantitativas medidas a pH 6 y 7. El análisis de los datos se realizó utilizando los softwares InfoStat (2013) e IBM-SPSS (24).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Mutagénesis UV

Como se esperaba, la supervivencia celular de *C. saccharophila* disminuyó gradualmente con el incremento del tiempo de radiación UV. La supervivencia celular disminuyó a $74.58 \pm 4.50\%$ con 12 s de radiación UV, y prácticamente no se observó supervivencia celular ($0.06 \pm 0.04\%$) con 60 s de irradiación (Figura 2.1). El análisis Probit de la curva de mortalidad UV de *C. saccharophila* mostró que la LD_{50} fue de aproximadamente 18.93 s (datos no mostrados). Se ha reportado que la severidad del daño al ADN por la radiación UV depende del tiempo de exposición y que este incrementa por la interrupción de la reparación del ADN celular cuando se mantiene en oscuridad después del tratamiento con UV (Sivaramakrishnan e Incharoensakdi, 2017). La tasa de supervivencia celular de *C. saccharophila* bajo radiación UV mostró la típica curva sigmoide de dosis-respuesta como se ha reportado en otras microalgas tratadas con UV (Lim *et al.*, 2015).

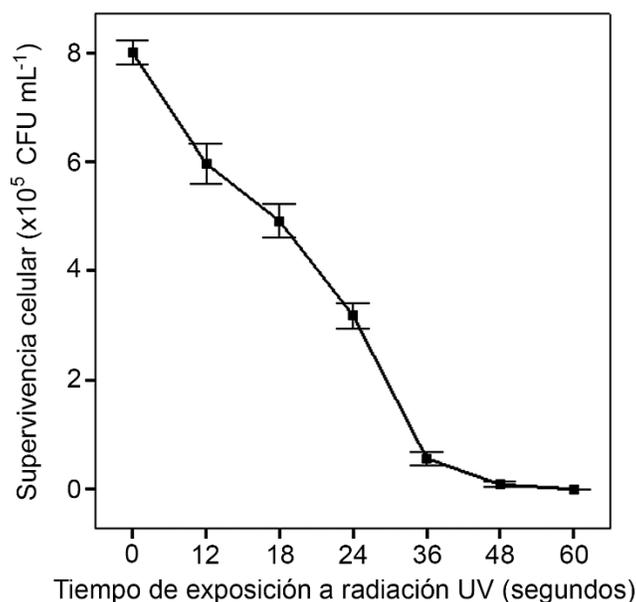


Figura 2.1 Curva de mortalidad de *C. saccharophila* con diferentes tiempos de exposición (segundos) a radiación UV (120 mJ cm^{-2}). Valores promedio \pm desviación estándar ($n = 3$).

2.3.2 Selección de mutantes

La selección mutante de *C. saccharophila* se realizó utilizando el método de gradiente de pH en caja Petri (Figura 2.2A). El pH de la superficie del gradiente varió desde 2.43 en el extremo ácido hasta 10.49 en el extremo alcalino (Figura 2.2B).

Cuando se esparció una suspensión celular (4×10^7 células) de *C. saccharophila* mutagenizada (120 mJ cm^{-2} , 18 s) sobre la superficie del gradiente de pH, se observó el crecimiento de células con pigmentación celular amarillenta en la región alcalina y en la región neutra se observó la típica pigmentación verde (Figura 2.2C). Mientras que en la región ácida del gradiente se observaron algunas colonias verdes más allá del límite que delimita el pH inhibitorio para la mayoría de las células, incluso cerca del borde extremo en los valores de pH más bajos, lo cual indica una alta tolerancia a la acidez de estas colonias; se observaron 17 colonias en promedio en cada caja (Figura 2.2C). El gradiente de pH mostró que la acidez fue muy limitante para el crecimiento celular de las microalgas mientras que la alcalinidad fue subóptima y las condiciones neutras fueron óptimas.

El proceso de validación de tolerancia a la acidez permitió la recuperación de cinco cepas mutantes de *C. saccharophila* con mayor longitud de crecimiento que la cepa silvestre en el gradiente de pH a las cuales se designaron como M1, M5, M8, M12 y M14 (Figura 2.2D y 2.3). Cuando se esparcieron suspensiones celulares (4×10^7 células) en un gradiente de pH fresco, las cinco mutantes crecieron en todas las regiones del gradiente (Figura 2.2E y 2.4) mientras que la silvestre fue incapaz de crecer en la región ácida (Fig. 2F y 2.4). Aunque se observaron algunas colonias pálidas de la cepa silvestre en la región ácida del gradiente de pH durante el proceso de selección, estas colonias no crecieron en la región ácida durante el proceso de validación de la tolerancia.

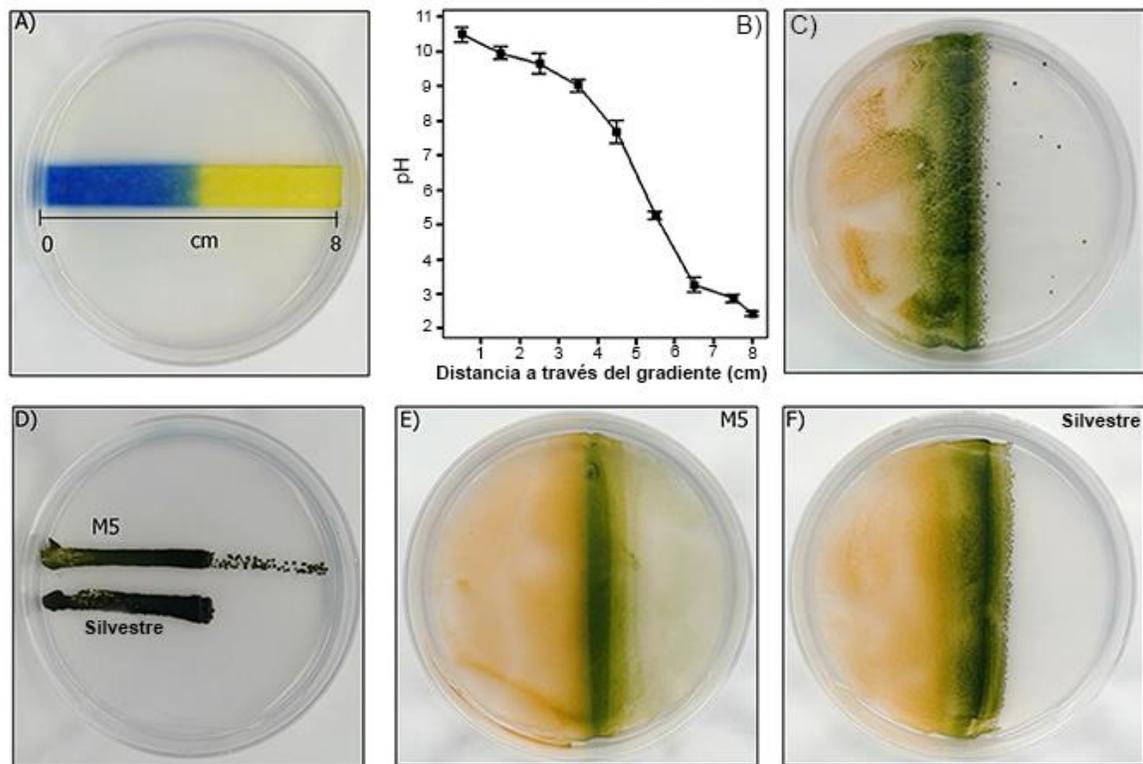


Figura 2.2 Selección de mutantes de *C. saccharophila* en gradiente de pH. **A)** Gradiente de pH en caja Petri. Una tira de papel de filtro empapada en una solución de azul de bromotimol (0.04%, p/v), se tornó azul en la región alcalina, verde en la neutral y amarilla en la región ácida; **B)** Valores de pH a través del gradiente, desde la región alcalina hacia la región ácida. Valores promedio \pm desviación estándar ($n = 3$); **C)** Células de *C. saccharophila* mutagenizadas con UV ($120 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$; 18 s). Se observan colonias tolerantes al pH ácido más allá del límite de pH que delimita el crecimiento para la mayoría de las células; **D)** Validación y comparación de la tolerancia a la acidez, se inocularon de forma lineal aproximadamente 1×10^5 células de la cepa silvestre y una cepa mutante en la misma caja con gradiente de pH; **E)** y **F)** Patrones de crecimiento de la cepa silvestre y cada una de las mutante en gradiente de pH. Aproximadamente 4×10^7 células fueron esparcidas en C), E) y F).

Cuando se cultivaron en medio TAP líquido a pH 6,5, 6, 5,5 y 5 para la identificación de la tolerancia máxima de acidez, las cinco mutantes pudieron crecer a pH 6, sin embargo, los valores por debajo de este pH inhibieron el crecimiento en todas ellas, mientras que la WT pudo crecer sólo hasta pH 6.5 y los valores de pH más bajos inhibieron su crecimiento. La cepa WT de *C. saccharophila* utilizada en este estudio se aisló de un cuerpo de agua artificial en la ciudad de Mérida, ubicada en el estado kárstico de Yucatán, México, en el que el pH fue de 7. El pH de los cuerpos de agua en Yucatán tiene valores que varían de

6.9 a 9.1 (Pérez *et al.*, 2011), por lo tanto, las cepas de microalgas de estos sitios están adaptadas a ambientes neutros o alcalinos, lo que podría explicar la incapacidad de la WT para crecer a valores de pH por debajo de 6.5.

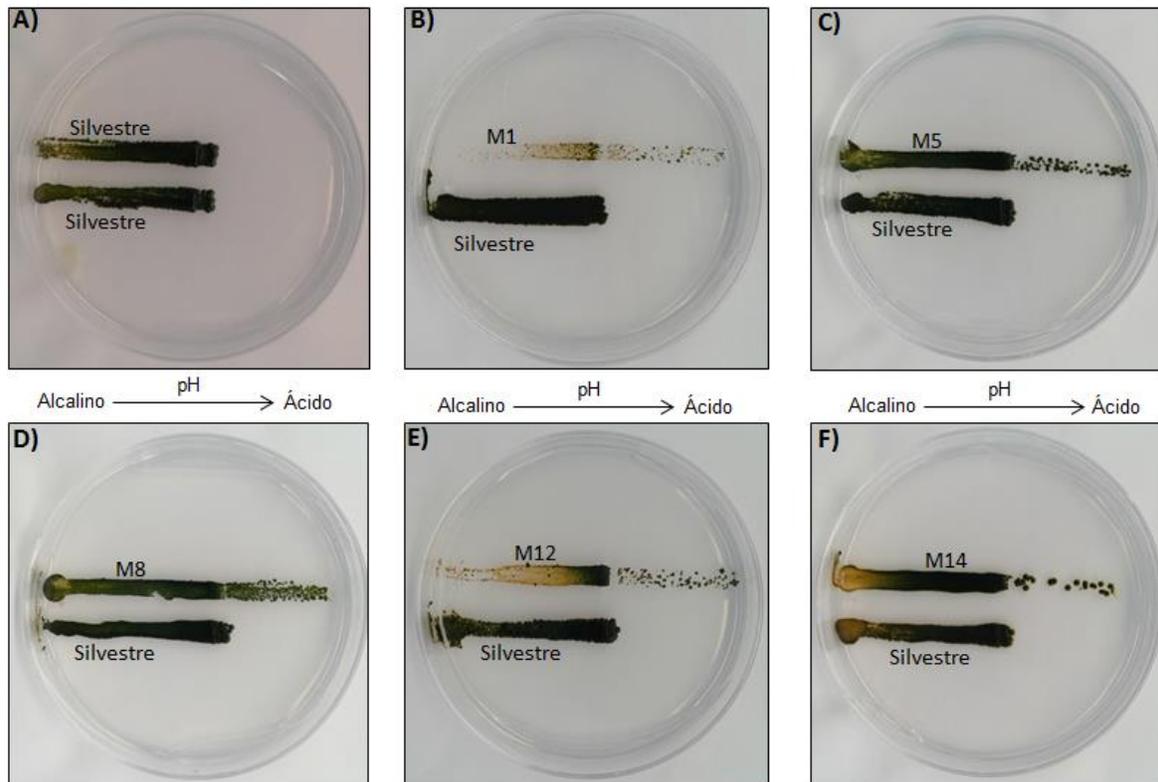


Figura 2.3 Comparación de la tolerancia a la acidez entre la cepa silvestre y mutantes en gradiente de pH. **A)** Control; solo se inoculó la cepa silvestre. **B-F)** La cepa silvestre y mutantes se inocularon de forma lineal en el mismo gradiente de pH. Aproximadamente 1×10^5 células mutagenizadas y de la cepa silvestre se inocularon en la dirección del gradiente, desde la región ácida hacia la región alcalina.

El método de gradiente placa es una forma sencilla de obtener información sustancial en una sola placa de Petri. Se ha utilizado en varios estudios para probar y comparar la tolerancia a los antibióticos en cepas clínicas bacterianas (Drago *et al.*, 2010), al etanol en levaduras industriales para el proceso de fermentación (Hong *et al.*, 2010) así como en estudios de circuitos cerebrales para la quimiotaxis (Luo *et al.*, 2014). Existen pocos reportes sobre el uso de este método para fines de selección; solo se ha reportado para seleccionar cepas de *Lactobacillus* tolerantes a la acidez (Patnaik *et al.*, 2002).

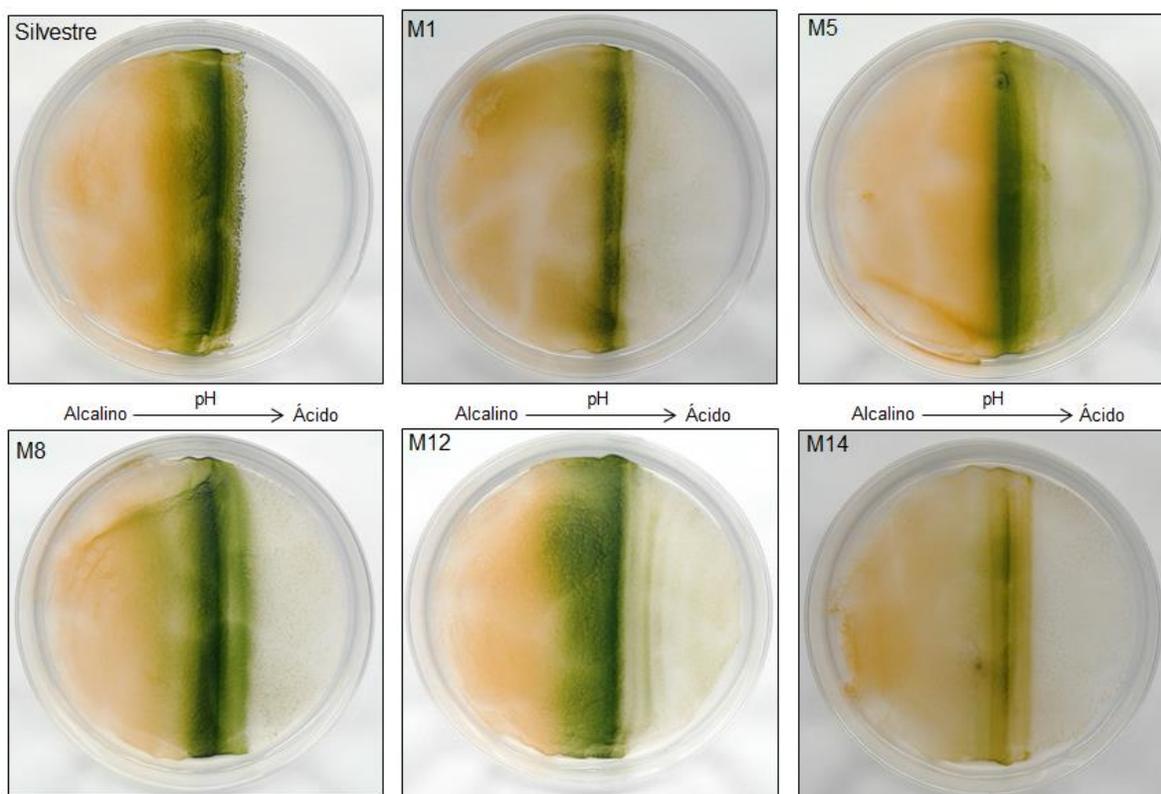


Figura 2.4 Patrones de crecimiento de la cepa silvestre y mutantes de *C. saccharophila* en gradiente de pH. Aproximadamente 4×10^7 células se esparcieron sobre la superficie del gradiente.

En este estudio, reportamos por primera vez el uso del gradiente de pH en caja Petri como un método exitoso para seleccionar mutantes de *C. saccharophila* tolerantes a la acidez ya que sólo las células tolerantes desarrollaron colonias en la región ácida, más allá del pH inhibitorio para las células susceptibles. Consideramos que este enfoque es de bajo costo y de alto rendimiento, ya que la preparación del gradiente de pH en caja Petri requiere principalmente H_2SO_4 y NaOH , al mismo tiempo que permite el cribado de aproximadamente 4×10^7 células en una sola caja.

2.3.3 Crecimiento de la cepa silvestre y de las mutantes

La cepa silvestre de *C. saccharophila* fue incapaz de crecer cuando se cultivó a pH 6, mientras que a pH 7 alcanzó una concentración celular de $11.36 \pm 0.82 \times 10^6$ células mL^{-1} (Figura 2.5A). Las cinco cepas mutantes fueron capaces de crecer a pH 6 y 7, sin embargo, la concentración celular final fue significativamente más baja que la silvestre,

independientemente del pH (Figura 2.5A). La cepa M1 alcanzó una concentración celular significativamente mayor a pH 6 ($9.54 \pm 0.38 \times 10^6$ células mL^{-1}) que a pH 7 ($7.93 \pm 0.61 \times 10^6$ células mL^{-1}) (Figura 2.5A). La acumulación de biomasa seca de la cepa silvestre fue de $840.67 \pm 39.31 \text{ mg L}^{-1}$ de cultivo, la mutante M8 fue la única que tuvo resultados similares a la silvestre ($812.00 \pm 28.84 \text{ mg L}^{-1}$ de cultivo), cuando se cultivó a pH neutro (Figura 2.5B). Las cuatro mutantes restantes acumularon significativamente menos biomasa que la silvestre cuando se cultivaron tanto a pH neutro como ácido (Figura 2.5B).

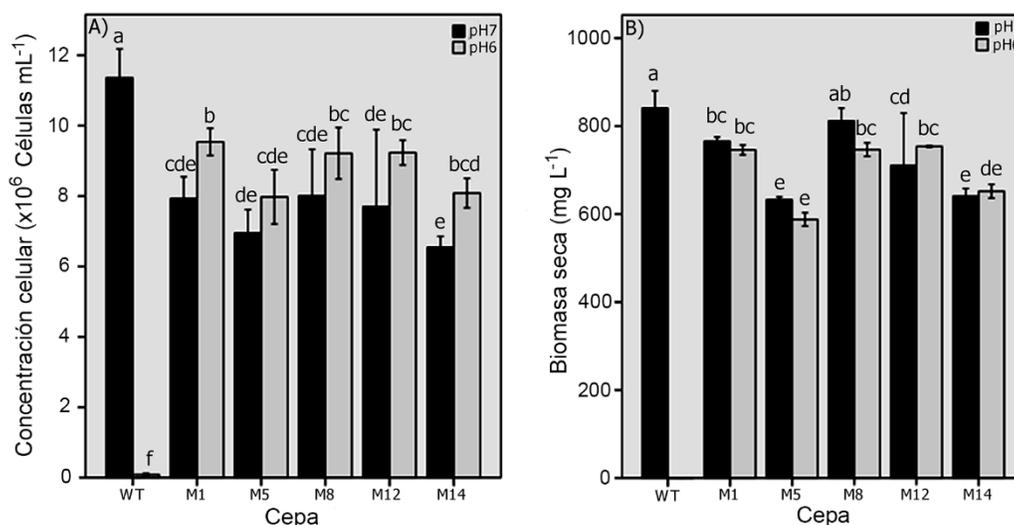


Figura 2.5 Crecimiento de la cepa silvestre y de las cinco mutantes de *C. saccharophila* a pH 6 y 7. **A)** Concentración celular; **B)** Peso de la biomasa seca. Las células se incubaron en 50 mL de medio TAP ajustado al pH indicado durante 10 días. Valores promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). Los promedios con una letra común no son significativamente diferentes (Diferencia mínima significativa de Fisher, $p < 0.05$).

La disminución en la proliferación celular es una característica común en las cepas mutantes ya que tanto la mutagénesis física y química introducen mutaciones adicionales que generalmente afectan la tasa de crecimiento de los organismos (Guihneuf *et al.*, 2010). Este fenómeno se ha reportado en otras microalgas mutantes tales como *Nannochloropsis salina* (Beacham *et al.*, 2015) y *Dunaliella tertiolecta* (Sirikhachornkit *et al.*, 2016).

2.3.4 Contenido de lípidos totales y triacilglicéridos de la cepa silvestre y mutantes de *C. saccharophila*

El extracto lipídico de la cepa silvestre de *C. saccharophila* fue de 416.00 ± 19.70 mg L⁻¹ de cultivo. La cepa M1 produjo una cantidad similar de extracto lipídico que la silvestre a pH 6 (364.67 ± 11.02 mg L⁻¹ de cultivo) y pH 7 (377.33 ± 12.22 mg L⁻¹ de cultivo) mientras que las otras mutantes produjeron cantidades inferiores a la silvestre, independientemente del pH del medio de cultivo (Figura 2.6A). Como porcentaje de la biomasa seca, el contenido de lípidos de la cepa silvestre fue de $49.49 \pm 0.98\%$ (Figura 2.6B). Las mutantes M1, M5 y M12 mostraron un contenido de lípidos similar al de la silvestre mientras que la M8 y la M14 tuvieron valores más bajos que la silvestre tanto a pH 6 como a pH 7 (Figura 2.6B).

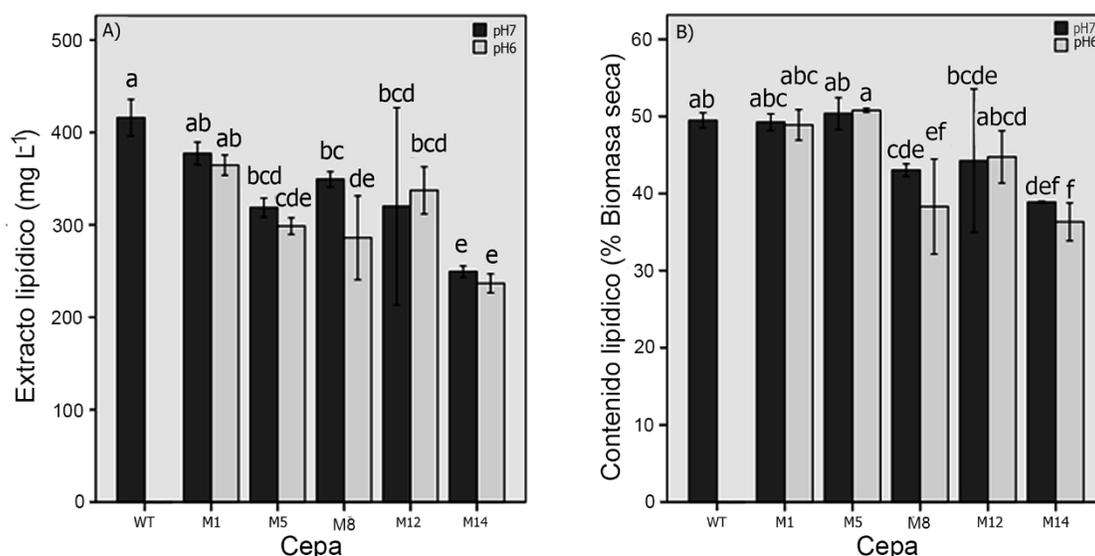


Figura 2.6 Contenido lipídico de la cepa silvestre y mutantes de *C. saccharophila* a pH 6 y 7. **A)** Extracto lipídico; **B)** Contenido de lípidos como porcentaje de la biomasa seca (% DBW). Las células se incubaron en 50 mL de medio TAP ajustado al pH indicado durante 10 días. Valores promedio \pm desviación estándar (n = 3). Los promedios con una letra común no son significativamente diferentes (Diferencia mínima significativa de Fisher, p < 0.05).

Interesantemente, la acumulación de TAGs de la mutante M1 a pH 7 (223.66 ± 10.86 mg L⁻¹ de cultivo) y M5 a pH 6 (224.05 ± 11.15 mg L⁻¹) y pH 7 (215.16 ± 19.23 mg L⁻¹) fue significativamente mayor que la silvestre (175.82 ± 0.14 mg L⁻¹) (Figura 2.7A). En las tres

mutantes restantes, no se observó una acumulación de TAG significativamente mayor que la silvestre (Figura 2.7A).

Expresado como porcentaje de la biomasa seca (% DBW), las mutantes M1 y M5 mostraron un contenido de TAGs significativamente mayor que la silvestre ($20.93 \pm 0.72\%$) tanto a pH 6 (M1 = $27.20 \pm 2.92\%$; M5 = $38.1 \pm 1.55\%$) como a pH 7 (M1 = $29.19 \pm 1.21\%$ y M5 = $34.03 \pm 3.36\%$) (Figura 2.7B). La mutante M5 mostró un mayor contenido de TAG (% DBW) a pH 6 que a pH 7, mientras que la M14 mostró un porcentaje mayor a pH 7 que a pH 6 (Figura 2.7B). No se encontraron valores superiores a la silvestre en las cepas mutantes restantes (Figura 2.7B).

Expresado como porcentaje del extracto lipídico total (% de extracto lipídico), el contenido de TAG de la cepa silvestre fue de $42.31 \pm 1.36\%$ (Figura 2.7C). Al igual que la acumulación de TAG (Figura 2.7A) y el contenido de TAG como porcentaje de la biomasa seca (Fig. 2.7B), las mutantes M1 y M5 mostraron un contenido de TAG significativamente mayor (% de extracto de lípidos) que la silvestre cuando se cultivaron tanto a pH 6 (M1 = $55.57 \pm 4.43\%$; M5 = $75.02 \pm 2.92\%$) como a pH 7 (M1 = $59.26 \pm 1.40\%$; M5 = $67.44 \pm 4.00\%$) (Figura 2.7C). La mutante M14 también mostró contenido mayor de TAG (% de extracto de lípidos) que la silvestre a pH 6 ($53.21 \pm 6.96\%$) y pH 7 ($60.29 \pm 0.37\%$) mientras que no se encontraron valores significativamente mayores a la silvestre en las dos mutantes restantes (Figura 2.7C). La mutante M8 mostró mayor contenido de TAG (% de extracto de lípidos) a pH 6 ($41.63 \pm 7.67\%$) que a pH neutro ($31.88 \pm 5.11\%$) (Figura 2.7C).

Para identificar las variables que contribuyeron en mayor medida con la diferenciación de las cepas en estudio, así como para identificar las cepas con los valores más altos de estas variables para su caracterización posterior, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de las cepas WT y mutantes. El primer componente principal (CP1) explicó 60.7% de la variación y estuvo dominado por las variables cuantificadas a pH 6, estas fueron el contenido de lípidos (% DBW), el contenido de TAGs (% de extracto de lípidos y mg) y la productividad de TAGs (Figura 2.7D y 2.8).

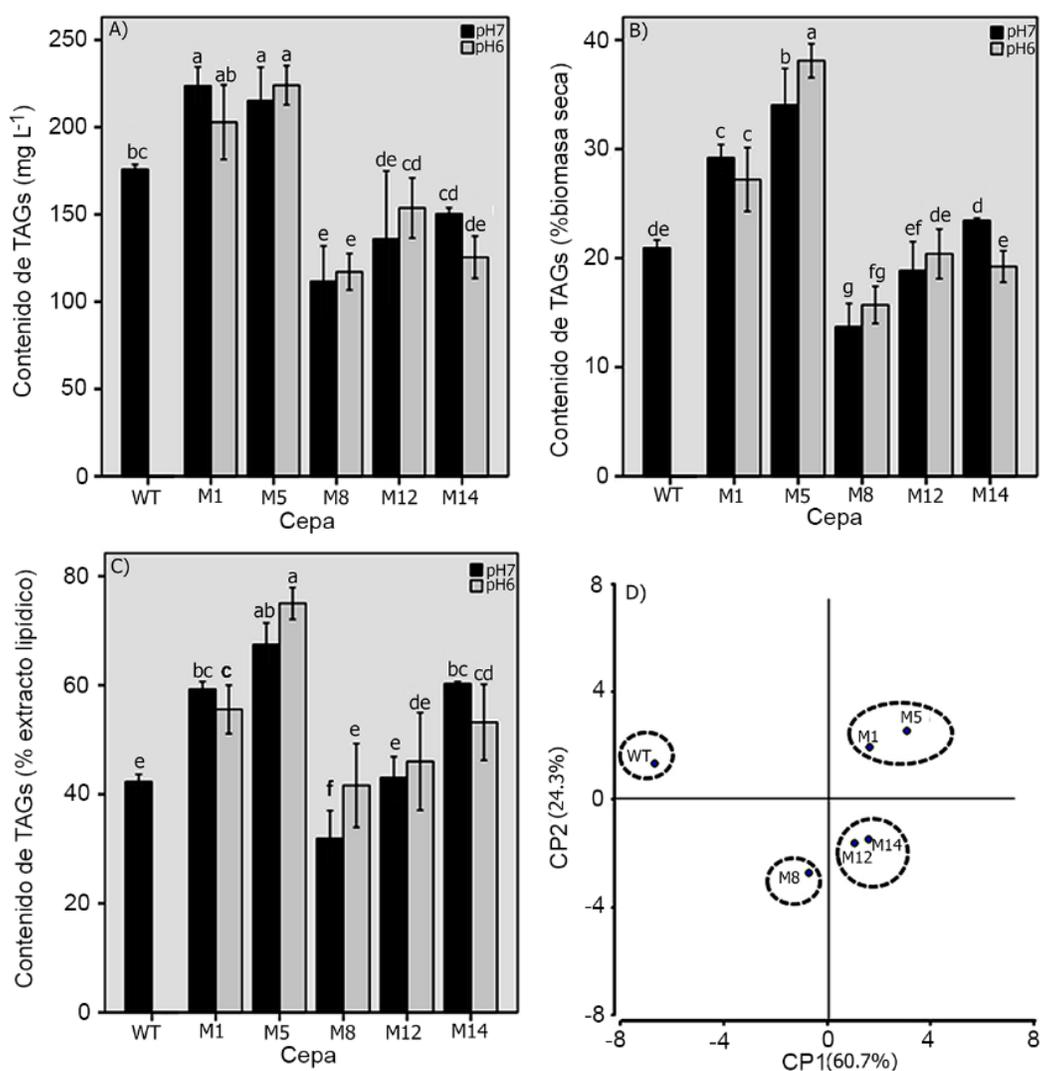


Figura 2.7 Acumulación de triacilglicéridos (TAG) de la cepa silvestre y mutantes de *C. saccharophila* a pH 6 y 7. **A)** Acumulación de TAG; **B)** Contenido de TAG como porcentaje de la biomasa seca; **C)** Contenido de TAG como porcentaje del extracto lipídico. Las células se incubaron en 50 mL de medio TAP ajustado al pH indicado durante 10 días. Valores promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). Los promedios con una letra común no son significativamente diferentes (Diferencia mínima significativa de Fisher, $p < 0.05$). **D)** Análisis de componentes principales de la cepa silvestre y mutantes de *C. saccharophila* con base en diez variables cuantificadas a pH 6 y 7.

El segundo componente principal (CP2) explicó un 24.3% adicional de la variación total y estuvo dominado por las variables cuantificadas a pH 7, estas fueron el contenido de TAGs (mg y % DBW), la productividad de TAGs ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) y el contenido de lípidos (% DBW) (Figura 2.7D y 2.8). La gráfica del ACP dispersó las seis cepas en cuatro grupos y

dejó en claro que la M1 y la M5 difieren de la cepa silvestre y las mutantes restantes, mostrando los valores más altos de las variables que dominan el respectivo CP (Figura 2.7D).

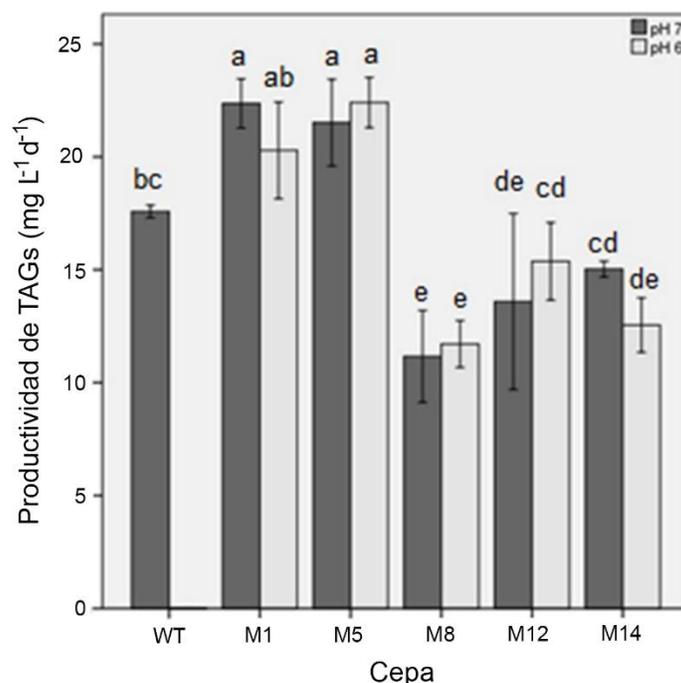


Figura 2.8 Productividad de TAG de la cepa silvestre y mutantes de *C. saccharophila* cultivadas a pH 6 y 7. Las células se incubaron en 50 mL de medio TAP ajustado al pH indicado durante 10 días. Valores promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). Los promedios con una letra común no son significativamente diferentes (Diferencia mínima significativa de Fisher, $p < 0.05$).

Aunque las cepas mutantes M1 y M5 mostraron menor concentración celular y acumulación de biomasa seca, así como contenido similar de lípidos totales que la silvestre, estas fueron las que exhibieron mayor contenido de TAGs totales (Figura 2.7A), como porcentaje de biomasa seca (Figura 2.7B) y como porcentaje del extracto lipídico (Figura 2.7C) comparado con la cepa silvestre y las mutantes restantes. Una posible explicación es que, si bien la proliferación celular disminuyó en las mutantes M1 y M5, éstas sintetizaron una cantidad similar de lípidos totales que la silvestre y acumularon una mayor cantidad de TAG, como se ha observado anteriormente en *C. saccharophila* (Contreras-Pool *et al.*, 2016).

La reducción de la proliferación celular en las mutantes M1 y M5 en comparación con la silvestre podría ser la razón del incremento de la acumulación de TAGs en estas cepas. Se ha demostrado que bajo condiciones óptimas de crecimiento las microalgas producen biomasa con un bajo contenido de TAGs mientras que, en condiciones adversas de crecimiento o estrés, la proliferación celular se vuelve limitada y se sintetiza TAGs como una forma de almacenamiento de carbono y de energía ya que la producción de biomasa y la biosíntesis de TAG compite por los asimilados fotosintéticos (Klok *et al.*, 2014). Cuando la proliferación celular disminuye, se produce un exceso de NADPH, y la biosíntesis de TAG también actúa como un sumidero de electrones mediante la reoxidación de NADPH para prevenir la sobreredución de la cadena de transporte de electrones fotosintéticos, de los lípidos de la membrana, de las proteínas y de otras macromoléculas puesto que los TAG son moléculas altamente reducidas (Hu *et al.*, 2008).

La disminución en la reproducción celular a favor de la acumulación de lípidos ha sido observada en mutantes de microalgas. Un aumento notable incremento en el contenido de lípidos (46.10%) a pesar de la reducción del contenido de biomasa (11.84%) fue reportado en mutantes UV de *Chlorella vulgaris* (Anthony *et al.* al., 2014) mientras que una densidad celular significativamente reducida estuvo acompañada por una elevación significativa del contenido total de FAME (46%) en mutantes de *Nannochloropsis salina* (Beacham *et al.*, 2015).

La cepa WT de *C. saccharophila* no pudo crecer a pH 6, probablemente porque está adaptada a ambientes neutros o alcalinos que varían de 6.9 a 9.1 en la península de Yucatán (Pérez *et al.*, 2011). Sin embargo, los mutantes M1 y M5 pudieron crecer a pH 6, lo que puede estar relacionado con su capacidad para acumular contenidos más altos de TAGs que la WT. Se ha demostrado que la acidez aumenta la acumulación de TAGs en microalgas acidófilas y se ha reconocido que la concentración de protones es un factor fisiológico crucial que altera la composición de los ácidos grasos en los organismos planctónicos (Poerschmann *et al.*, 2004).

Tatsuzawa *et al.* (1996) reportaron que el contenido de TAGs en *Chlamydomonas* sp. aislada en un lago ácido volcánico fue de 63%, 46%, 51% y 37% a valores de pH de 1, 3, 5 y 7, respectivamente (causados por el aumento de la concentración de H₂SO₄), lo que demostró un aumento del contenido de TAGs a medida que el pH disminuyó. Estos

autores sugirieron que la acumulación de TAGs en las células, como lípido de almacenamiento, era un mecanismo de adaptación a pH bajo para prevenir el desequilibrio osmótico causado por la alta concentración de H₂SO₄ (Tatsuzawa *et al.*, 1996). Otro mecanismo de adaptación a pH ácido propuesto por estos autores fue la disminución de la fluidez de la membrana celular al aumentar la saturación de los ácidos grasos en los lípidos de la membrana ya que también encontraron un mayor contenido de ácidos grasos saturados en los lípidos polares a valores de pH bajos en comparación con las condiciones neutras (Tatsuzawa *et al.*, 1996).

De la misma manera, Poerschman *et al.* (2004) encontraron un mayor rendimiento de FAMEs (19.7%), una medida indirecta del contenido de TAGs, un mayor contenido total de ácidos grasos y una mayor proporción de ácidos grasos saturados en una cepa de *Chlamydomonas* sp. aislada de un lago minero ácido cuando se cultivó a pH 2.7 comparado con pH 7. Estos autores sugirieron que la síntesis *de novo* de lípidos de almacenamiento en condiciones de pH bajo es un mecanismo de adaptación para prevenir el desequilibrio osmótico causado por la alta concentración de protones. Estos autores también mencionaron que el perfil alterado de ácidos grasos era otro mecanismo de adaptación a pH ácido ya que un mayor contenido de ácidos grasos saturados disminuye la fluidez de la membrana, lo que protege a la célula contra una alta concentración de protones. De la misma manera, Eibl *et al.* (2014) observaron un mayor contenido de lípidos (11%) y un mayor rendimiento de FAMEs en una cepa de *Scenedesmus* spp. aislada de un cuerpo de agua de bajo pH cuando se cultivó a pH 3 en comparación con pH 7.

La irradiación ultravioleta induce transversiones A/T a C/G y se ha utilizado ampliamente para modificaciones genéticas y funcionales en varios organismos, desde bacterias hasta plantas, como un método eficaz para mejorar la producción de diferentes metabolitos (Sivaramakrishnan e Incharoensakdi, 2017; Steensels *et al.*, 2014). El mejoramiento del contenido de TAGs en mediante mutagénesis UV ha sido previamente reportado en microalgas como *Scenedesmus obliquus* (de Jaeger *et al.*, 2014), *Dunaliella tertiolecta* (Sirikhachornkit *et al.*, 2016) y *Chlorella vulgaris* (Sarayloo *et al.*, 2017).

Las mutaciones inducidas por UV en los genes del metabolismo de lípidos y su relación con la producción de lípidos fue analizada en una mutante de *Chlorella vulgaris* en la cual

la sustitución de una leucina por una serina en el gen de la acetil CoA carboxilasa confirió una mayor actividad de esta enzima, y esta característica fue propuesta como la razón del incremento de la producción de lípidos en la cepa mutante (Anthony *et al.*, 2014). El efecto de la radiación UV sobre los genes biosintéticos de lípidos también fue demostrado en mutantes de *Chlorella vulgaris* con producción mejorada de FAME en la cual un análisis transcriptómico mostró una regulación positiva de los genes biosintéticos de lípidos y una regulación negativa de los genes catabólicos de éstos (Sarayloo *et al.*, 2017). Las mutaciones en los genes biosintéticos de TAGs, principalmente *DGAT1* del retículo endoplásmico que codifica para una diacilglicerol aciltransferasa, que cataliza la conversión de diacilglicerol a triacilglicerol, también se han sugerido para aumentar el contenido de TAGs en mutantes de microalgas (Mehtani *et al.*, 2017).

En este estudio, reportamos por primera vez la generación de mutantes UV de *C. saccharophila* tolerantes a la acidez con un mayor contenido de TAGs. Análisis adicionales genómicos, transcriptómicos y proteómicos de las mutantes UV generadas en este estudio tienen el potencial de ampliar nuestra comprensión de cómo estas células se adaptan a las condiciones de estrés del pH ácido y su relación con la síntesis de TAGs.

2.3.5 Análisis de microscopía confocal de la cepa silvestre y de las mutantes de *C. saccharophila*

La intensidad de la fluorescencia intracelular fue más fuerte en las cepas mutantes M1 y M5 comparado con la cepa silvestre (Figura 2.9). El Rojo Nilo manifiesta fluorescencia solo cuando interactúa con lípidos neutros y por esa razón se ha utilizado con frecuencia para evaluar el contenido de lípidos neutros, principalmente TAGs, en varios organismos tanto cualitativa como cuantitativamente (Doan y Obbard, 2011). Por lo tanto, se puede deducir un mayor contenido de TAGs intracelular en las cepas M1 y M5 en comparación con la cepa silvestre.

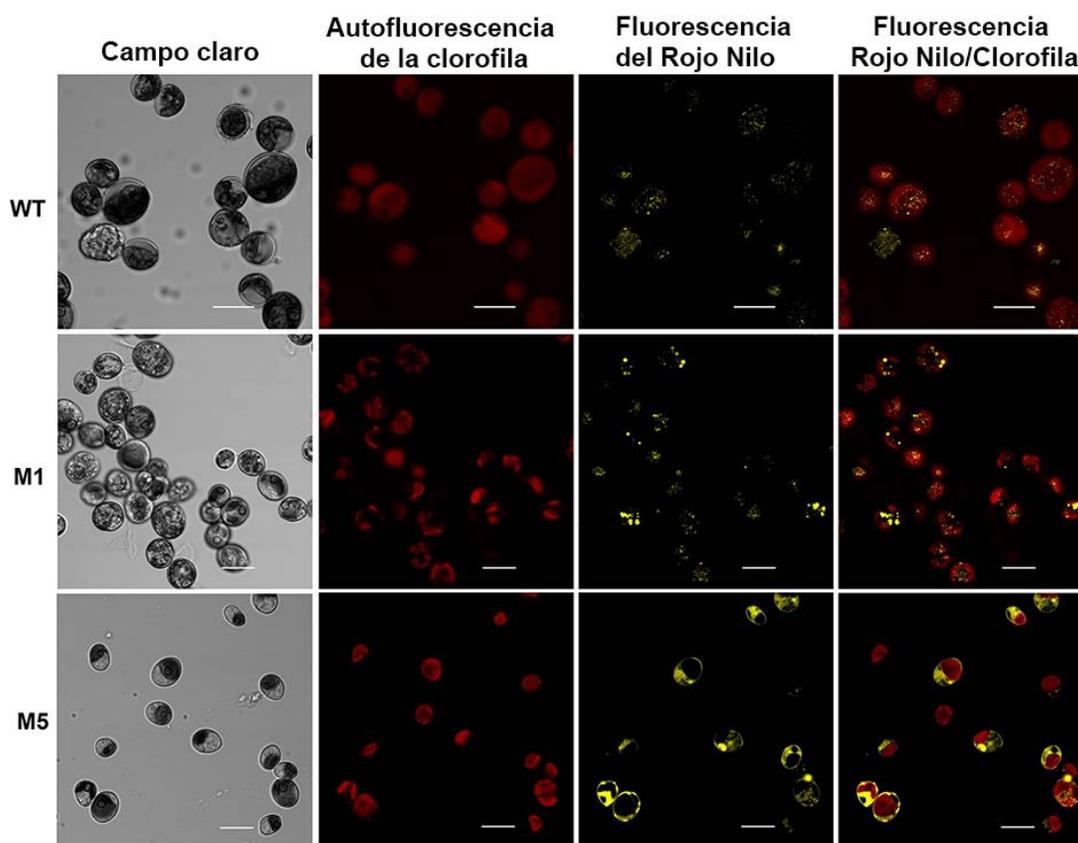


Figura 2.9 Imágenes confocales de células teñidas con Rojo Nilo de la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de *C. saccharophila*. Amarillo: fluorescencia del Rojo Nilo; Rojo: autofluorescencia de la clorofila. Barra de escala = 10 μm .

2.3.6 Composición de los ésteres metílicos de ácidos grasos de la cepa silvestre y de las mutantes de *C. saccharophila*

Los TAGs de la cepa silvestre y de las mutantes M1 y M5 se transesterificaron y se analizó el perfil de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La composición de FAME de la cepa silvestre estuvo dominada por ácidos grasos saturados y monoinsaturados con C16:0 en mayor proporción (55.82%) seguido de C18:0 (13.75%) y C18:1 (12.08%) (Figura 2.10 y Cuadro 2.1). La composición FAME de mutante M1 fue similar a la silvestre con C16:0 (41.84%), C18:0 (8.66%) y C18:1 (25.27%) como principales ácidos grasos (Figura 2.10). El perfil de FAME de la mutante M5 mostró una menor proporción de ácidos grasos saturados y de monoinsaturados que las cepas silvestre y M1 con 22.83% de C16:0,

4.00% de C18:0 y 2.51% de C18:1. Mientras que el 65.19% del total de FAME en esta mutante fueron ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que contenían dos o más enlaces dobles en los que C18:3 estuvo en mayor proporción (45.53%), seguido de C18:2 (16.00%) y finalmente C16:2 (3.66%) (Figura 2.10 y Cuadro 2.1).

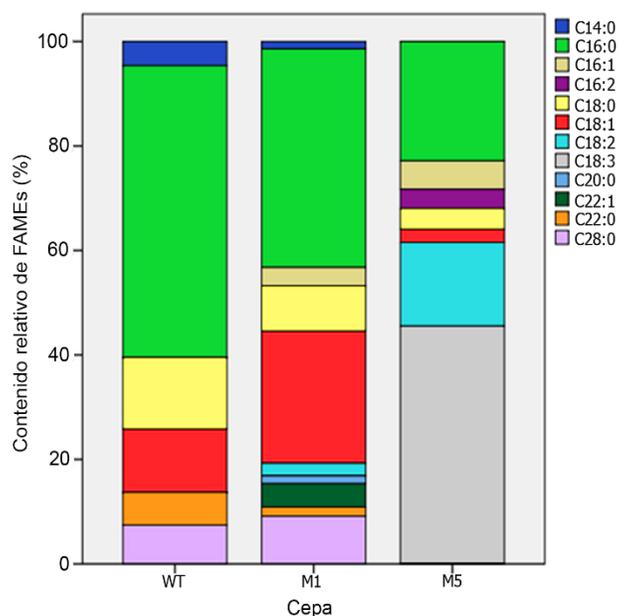


Figura 2.10 Composición de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de *C. saccharophila* (Porcentaje del total de FAMES).

Cuadro 2.1 Composición de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de *C. saccharophila* (Porcentaje del total de FAMES).

Cepa	FAME (%)											
	C14:0	C16:0	C16:1	C16:2	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C28:0
Silvestre	4.64	55.82	ND	ND	13.75	12.08	ND	ND	ND	ND	6.27	7.44
M1	1.37	41.84	3.55	ND	8.66	25.27	2.43	ND	1.50	4.50	1.71	9.15
M5	ND	22.83	5.47	3.66	4.00	2.51	16.00	45.53	ND	ND	ND	ND

ND: No detectado

Similar a estos resultados, la composición alterada de ácidos grasos ha sido reportada previamente en mutantes UV de microalgas. Un incremento significativo en el contenido de C16:4, C18:4 y C20:5 fue reportado en mutantes de *Tetraselmis suecica* (Lim *et al.*, 2015), mientras que en mutantes de *Chlorella vulgaris* se reportó un contenido

significativamente más alto que en la cepa silvestre de C16:2, C18:2 y C18:3 (Sarayloo *et al.*, 2017). Por otra parte, también se ha reportado una disminución en el contenido de C18:2 y C18:3 comparado con la silvestre en mutantes de *Dunaliella tertiolecta* (Sirikhachornkit *et al.*, 2016) y de *Scenedesmus* sp (Sivaramakrishnan e Incharoensakdi, 2017).

El conocimiento actual de la biosíntesis de lípidos en microalgas es limitado, sin embargo, se ha propuesto que los cambios en la composición de los ácidos grasos están regulados por genes involucrados en la elongación y la insaturación de los ácidos grasos (Sarayloo *et al.*, 2018). Las desaturasas son las enzimas especializadas que insertan dobles enlaces en las cadenas preformadas de ácidos grasos y son específicas para la ubicación y la cantidad de enlaces que insertan en los ácidos grasos (Sharma *et al.*, 2015). Por lo tanto, una posible explicación para el alto contenido de C18:3 en la mutante M5 podría deberse a la regulación positiva de los genes desaturasa clave, por ejemplo, un gen que codifica la Δ^{12} ácido graso desaturasa (FAD), la cual desatura el ácido oleico (C18:1) a ácido linoleico (C18:2), y un gen que codifica para la Δ^{15} FAD que convierte el ácido linoleico (C18:2) en ácido α -linoleico (C18:3) como ha sido propuesto por Sarayloo *et al.* (2017), Beacham *et al.* (2015) y Sharma *et al.* (2015). La baja proporción de C18:0, C18:1 y C18:2, así como la alta proporción de C18:3 en los FAME de la mutante M5 (Fig. 6) son consistentes con esta explicación. Investigaciones adicionales que comparen los perfiles de expresión de los genes que codifican para las enzimas desaturasas en las cepas silvestre y M5 pueden dilucidar esta cuestión.

Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados son adecuados para la producción de biocombustibles mientras que los PUFA son preferidos para aplicaciones en la nutrición y la salud humana (Sarayloo *et al.*, 2018). En este sentido, las mutantes M1 y M5 generadas en este estudio tienen aplicaciones potenciales en las industrias de biocombustibles y nutracéuticos debido a su alto contenido de TAG y PUFA. Por otra parte, C18:3 es el precursor de la biosíntesis del ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5) y el ácido docosahexaenoico (DHA; C22:6) los cuales tienen efectos benéficos significativos en la nutrición y la salud humana, por esa razón se han realizado esfuerzos para aumentar la producción de C18:3 en microalgas mediante la sobreexpresión del gen ácido graso desaturasa omega-3 (Norashikin *et al.*, 2018). En este sentido, la cepa mutante M5

sobreproductora de C18:3 es una candidata prometedora para la sobreexpresión de genes elongasa y desaturasa para la producción de EPA y DHA.

2.4 CONCLUSIÓN

En este estudio se mejoró el contenido de TAG y PUFA de *C. saccharophila* mediante mutagénesis UV y selección de mutantes utilizando el método de gradiente de pH en caja Petri. Dos cepas mutantes, M1 y M5, mostraron 27.2% y 27.4% mayor acumulación de TAG que la silvestre, respectivamente. El perfil de FAME de la M1 mostró 50.5% de ácidos grasos saturados (C16:0 y C18:0) y 25.27% de ácidos grasos monoinsaturados (C18:1), ambos adecuados para la producción de biocombustibles. La composición de FAME de la M5 exhibió 65% de ácidos grasos poliinsaturados nutricionales (C16:2, C18:2 y C18:3). Los hallazgos en este estudio revelaron que la mutagénesis UV acoplada al método del gradiente de pH es un enfoque rápido y fácil para mejorar el contenido de TAG y PUFA en *C. saccharophila*, con aplicaciones potenciales en las industrias de biocombustibles y de nutracéuticos, respectivamente.



CAPÍTULO III

CONTENIDO DIFERENCIAL DE HIDROCARBUROS Y DE LÍPIDOS BIOACTIVOS DE ALTO VALOR AGREGADO DE LA MICROALGA VERDE *Chlorella saccharophila* Y DE DOS MUTANTES TOLERANTES A LA ACIDEZ DETECTADO MEDIANTE UN ANÁLISIS LIPIDÓMICO

3.1 INTRODUCCIÓN

Las microalgas son una fuente potencial para la producción de biocombustibles debido a su buena producción de lípidos aunada a su naturaleza de autótrofos y su crecimiento rápido, sin embargo, la producción de biocarburantes a partir de estos organismos aun no es económicamente viable. Por otra parte, la biomasa de las microalgas contiene una diversidad de moléculas bioactivas de alto valor agregado cuyo aprovechamiento comercial puede contribuir a la viabilidad económica de los sistemas de producción de biocombustibles (Safi *et al.*, 2014)

Los compuestos de alto valor agregado que pueden aislarse de la biomasa de microalgas tienen aplicaciones como aditivos en la industria de los alimentos, compuestos bioactivos en la industria farmacéutica (antioxidantes, antiinflamatorios, antibacterianos, antivirales, anticancerígenos, antihipercolesterolemicos y para el tratamiento de problemas cardiacos) y en la industria cosmética como surfactantes, fragancias, tintes y biomoléculas antienvjecimiento (Budzianowski, 2017). Los compuestos bioactivos se encuentran en baja proporción en la biomasa pero tienen un alto valor comercial a diferencia de los lípidos para producir biocombustibles los cuales se necesitan en grandes volúmenes pero tienen un precio de mercado bajo (Mehta *et al.*, 2018). Una mayor conciencia de la salud entre los consumidores ha incentivado el desarrollo de alimentos funcionales, es decir, aquellos que contienen compuestos bioactivos de origen natural como aditivos para elevar su valor nutricional proporcionando beneficios adicionales a la salud del consumidor, más allá del suministro de energía o nutrimentos propios de cualquier alimento (Budzianowski, 2017).

Las plantas son las principales fuentes de éstos compuestos, sin embargo, el incremento en la demanda de compuestos bioactivos hace necesaria la búsqueda de fuentes

naturales alternas para la producción y aprovechamiento sostenible de éstos (Plaza *et al.*, 2010). En este sentido, en años recientes se ha reconocido el enorme potencial de las microalgas como una fuente de compuestos bioactivos y gracias a su crecimiento relativamente rápido y a la posibilidad de cultivarlas de forma continua, pueden convertirse en una fuente ilimitada de estos compuestos (Plaza *et al.*, 2010). Existen varios reportes sobre el potencial de las microalgas como fuente de contenido de bioproductos de alto valor agregado (Mehta *et al.*, 2018).

Previamente nuestro grupo de investigación reportó que la composición de ácidos grasos de los TAGs de *C. saccharophila* es adecuada para la producción de biodiesel (Herrera-Valencia *et al.*, 2011) y recientemente generó dos cepas mutantes de *C. saccharophila* (M1 y M5) tolerantes a la acidez con mayor producción de TAG y de ácidos grasos poliinsaturados que la cepa silvestre (Teco-Bravo *et al.*, 2019). Sin embargo, se desconoce la composición de las otras fracciones lipídicas de *C. saccharophila*, por lo que en este estudio se realizó un análisis lipidómico de la cepa silvestre y de las mutantes M1 y M5 para explorar la composición y el contenido de otros lípidos que pueden ser usados para la producción de biocombustibles y de lípidos bioactivos de alto valor agregado con aplicaciones potenciales a nivel comercial.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Cepa de microalga y condiciones de cultivo

La cepa silvestre de *Chlorella saccharophila* (UADY-PRIORI-014-FMVZ-04) y las dos mutantes (M1 y M5) tolerantes a la acidez (Teco-Bravo *et al.*, 2019) fueron cultivadas en biorreactores Celstir (Wheaton Scientific, New Jersey, USA) con 1 L de medio tris-acetato-fosfato (TAP, pH 7) (Harris, 1989) con un inóculo inicial de 1×10^5 células mL⁻¹ durante 10 días, bajo las condiciones reportadas por Herrera-Valencia *et al.* (2011). La biomasa se recuperó después de 24 h de sedimentación a 4 °C, se centrifugó a 5000 rpm, 4 °C por 10 min, se liofilizó (Labconco, Freezone 6, Kansas City, USA) durante 48 h y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

3.2.2 Extracción y partición de lípidos totales

Se extrajeron los lípidos totales de la biomasa liofilizada con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v) (Contreras-Pool *et al.*, 2016), el procedimiento se repitió cinco veces para una extracción completa. Los lípidos totales se partitionaron por cromatografía en columna de gravedad con gel de sílice como fase estacionaria (tamaño de partícula de 0.063-0.2 mm, Fluka Analytical, Munich, Germany). Como fase móvil se utilizó hexano, diferentes mezclas de hexano: acetato de etilo (90:10, 80:20, 70:30 v/v), acetato de etilo y finalmente metanol (Herrera-Valencia *et al.*, 2012). Las fracciones lipídicas fueron visualizadas por cromatografía analítica en capa fina (TLC) (Herrera-Valencia *et al.*, 2012) y se usó aceite de canola (Capullo®, ACH Foods S. de R.L. de C.V., México) como lípido de referencia. La fracción conteniendo los TAGs se transesterificó disolviéndola en 500 μL de heptano de los cuales 400 μL se mezclaron con 20 μL de metóxido de sodio (2% w/w de la fracción de TAG). Se agregaron 100 μL de acetato de etilo para homogenizar la reacción y se dejó reaccionar por 90 min a 60 °C en agitación. El producto de la transesterificación se pasó por una microcolumna empacada con gel de sílice usando cloroformo como eluyente, para eliminar trazas de glicerol y catalizador.

3.2.3 Análisis de la composición de lípidos

El análisis de las fracciones lipídicas se realizó por GC-MS. Se inyectó 1 μL de cada fracción y del producto de la transesterificación a un cromatógrafo de gases (Agilent 78900) equipado con un detector de masas (Agilent 5977 MSD). Los compuestos se separaron en una columna Agilent THP-5 MS de 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm , bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 70 °C en isoterma por 5 minutos, con una rampa de calentamiento de 10 °C min^{-1} hasta 200 °C y mantenida en isoterma por 5 minutos, y la última rampa de 20 °C min^{-1} hasta 290 °C, manteniendo en isoterma 15 minutos. Se utilizó H_2 (1 mL min^{-1}) como gas acarreador.

3.2.4 Análisis de datos

Los compuestos presentes en las fracciones lipídicas de *C. saccharophila* fueron identificados utilizando la base de datos de la biblioteca del instituto nacional de estándares y tecnología (NIST) con el software Enhanced Data Analysis (MS data:

Quantitated Multi Pt.). Se calculó la abundancia relativa de los compuestos identificados con base en las áreas de los picos, sin usar factores de corrección. Los datos se analizaron usando el software IBM-SPSS versión 24.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Clases de lípidos detectados en *C. saccharophila*

Los lípidos identificados en *C. saccharophila* se agruparon de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas (Figura 3.1). En la WT se detectó mayor contenido de hidrocarburos (73.63%) comparado con M1 (31.54%) y M5 (26.19%) (Figura 3.1) mientras que la proporción de FAAEs fue mayor en M1 (28.39%) y M5 (29.17%) que en la WT (5.29%). El contenido de ácidos grasos libres en la WT fue de 10.57%, 15.66% en la M1 y 6.43% en la M5 (Figura 3.1). La proporción de terpenos fue mayor en M1 (11.72%) y M5 (16.57%) que en la WT (6.79%). Los esteroides se detectaron únicamente en las mutantes M1 (9.94%) y M5 (12.15%). La proporción de alcoholes grasos fue de 3.71%, 2.75% y 9.49% en la WT, M1 y M5, respectivamente (Figura 3.1).

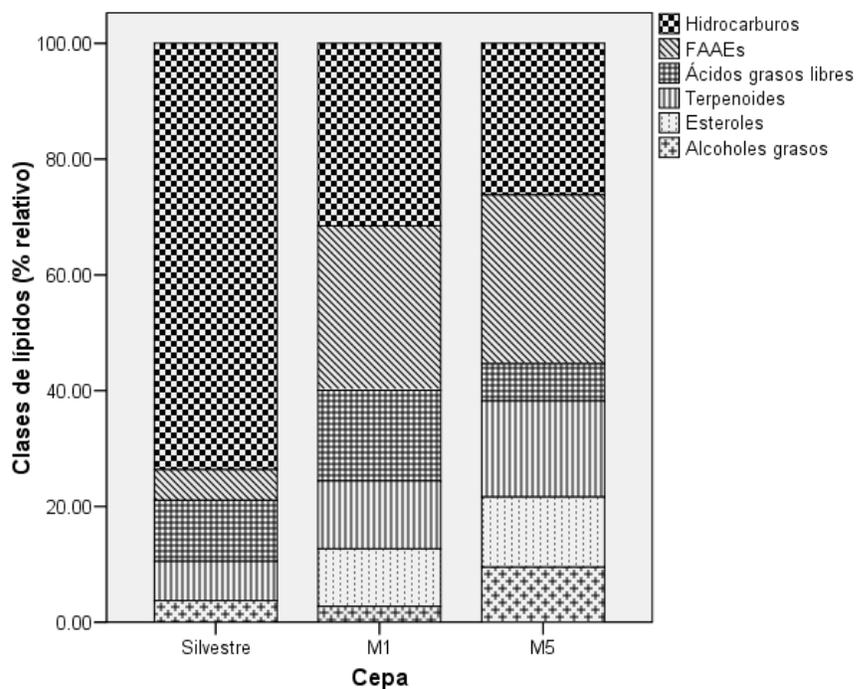


Figura 3.1 Clases de lípidos identificadas en la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de *C. saccharophila* y su abundancia relativa.

La comparación del perfil lipídico de la WT con ambas mutantes nos sugiere que el flujo de los esqueletos carbonados de los hidrocarburos se redistribuyó a las diferentes clases de lípidos como los FAAEs, terpenos y esteroides, haciendo cuantificables a algunos que se encontraban por debajo del límite de detección en la WT, esto quizá como una manera de mantener la homeostasis dentro de la microalga.

De las clases de lípidos detectados en las cepas de *C. saccharophila*, algunos tienen propiedades para usarse como biocombustibles y otros como compuestos bioactivos de alto valor agregado.

3.3.2 Lípidos para la producción de biocombustibles

Las fracciones de hidrocarburos y de FAAEs pueden ser utilizadas como biocombustibles. Los FAAEs son lo que se denomina biodiesel. En las mutantes M1 y M5 se detectó 23.09% y 23.87% más FAAEs que en la WT (Figura 3.1), respectivamente. Estos resultados son consistentes con el mayor contenido de TAGs de M1 y M5 respecto a la WT encontrado previamente en nuestro grupo de investigación (Teco-Bravo *et al.*, 2019) ya que los FAAEs son producto de la transesterificación de TAGs. El potencial de *C. saccharophila* como fuente de lípidos para la producción de biodiesel ha sido previamente señalado por Herrera-Valencia *et al.* (2011).

En la fracción de los hidrocarburos se detectaron compuestos lineales del tipo alcanos y alquenos de entre 12 y 29 carbonos, lineales y ramificados (Cuadro 3.1). La WT tuvo 42.09% y 47.45% mayor contenido de hidrocarburos que la M1 y M5, respectivamente (Figura 3.1). Del total de los hidrocarburos, el 1-Docoseno (C22) estuvo en mayor proporción en las tres cepas con 58.64% en la WT, 51% en la M1 y 48.48% en la M5 (Tabla 1). El 87.24% de los hidrocarburos de la WT fue de C19-C29, el 5.66% de C12-C15 y el 7.10% entre C16-C18. Aunque la mayor proporción de hidrocarburos de *C. saccharophila* descritos en este trabajo son mayores de C19, estos pueden convertirse a cadenas más cortas mediante cracking catalítico para producir gasolina (C7-C11), keroseno (C12-C15) o diésel (C16-C18) (Eroglu and Melis, 2010).

En la WT, el 71.77% de los hidrocarburos fueron monoinsaturados, el 26.37% saturados y el 1.85% diinsaturados (Cuadro 3.1). Este parámetro es importante porque el grado de insaturación, por ejemplo en el biodiesel, mientras mayor número de insaturaciones, mayor emisión de óxidos de nitrógeno (Benjumea *et al.*, 2010) y menor calidad de la combustión (Ramos *et al.*, 2009). Las características cualitativas como cuantitativas de los hidrocarburos encontrados en *C. saccharophila* en este trabajo apoyan la propuesta de que esta microalga es una buena fuente de biomasa para la producción de biocombustibles debido a su alta productividad de biomasa ($159.58 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y de lípidos ($99.33 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (Herrera-Valencia *et al.*, 2011).

Cuadro 3.1 Compuestos hidrocarburos identificados en la cepa silvestre y mutantes (WT, M1 y M5) de *C. saccharophila* y su abundancia relativa.

TR* (min)	Compuesto	Número de carbonos/insaturaciones	Abundancia relativa (%)		
			Silvestre	M1	M5
12.41	Dodecano	C12:0	0.77	ND	ND
16.20	Ciclododecano	C12:0	0.52	0.90	2.71
16.52	Tetradecano	C14:0	1.28	ND	2.52
17.72	Hexadecano	C16:0	2.50	2.29	ND
18.36	10-Metilnonadecano	C20:0	3.20	ND	ND
18.59	7-Tetradeceno, (Z)-	C14:1	ND	ND	1.68
18.63	9-Octadeceno, (E)-	C18:1	3.23	ND	ND
18.85	Hexacosano	C26:0	15.48	17.43	15.78
19.93	Nonadecano	C19:0	ND	2.06	ND
20.02	Ciclotetradecano	C14:0	1.24	1.05	2.71
20.59	3-Eicosino	C20:1	1.27	ND	5.85
22.25	Eicosano	C20:0	1.38	5.53	8.96
23.60	7-Hexadeceno, (Z)-	C16:1	0.84	ND	5.25
28.48	1,21-Docosadieno	C22:2	ND	2.27	ND
28.90	1-Octadeceno	C18:1	0.53	ND	ND
28.93	9-Tricoseno, (Z)-	C23:1	3.71	ND	ND
29.70	1,19-Eicosadieno	C20:2	ND	7.15	ND
29.89	1,13-Tetradecadieno	C14:2	1.85	2.39	1.58
30.00	1-Docoseno	C22:1	58.64	51.00	48.48
31.03	Nonacos-1-eno	C29:1	1.05	ND	3.67
34.31	1-Nonadeceno	C19:1	2.50	7.93	0.80

*TR: tiempo de retención.

3.3.3 Lípidos bioactivos detectados en *C. saccharophila*

Se detectaron compuestos bioactivos, previamente reportados en la literatura, en el grupo de los terpenos, los esteroides y los alcoholes grasos, con contenido y composición diferencial entre la WT y las mutantes M1 y M5 (Figura 3.1).

En la fracción de los terpenos, el neofitadieno fue el de mayor abundancia en las cepas silvestre (56.82%) y M5 (63.84%) mientras que fue el segundo de mayor proporción en la cepa M1 (36.86%) (Figura 3.2). El escualeno tuvo una abundancia relativa de 16.07% en la cepa silvestre, 9.49% en la M1 y 26.07% en la M5, el fitano representó el 27.11% en la cepa silvestre, 38.62% en la M1 y 5.08% en la M5, el resto de los compuestos de esta fracción se detectaron en proporciones inferiores a los anteriores (Figura 3.2).

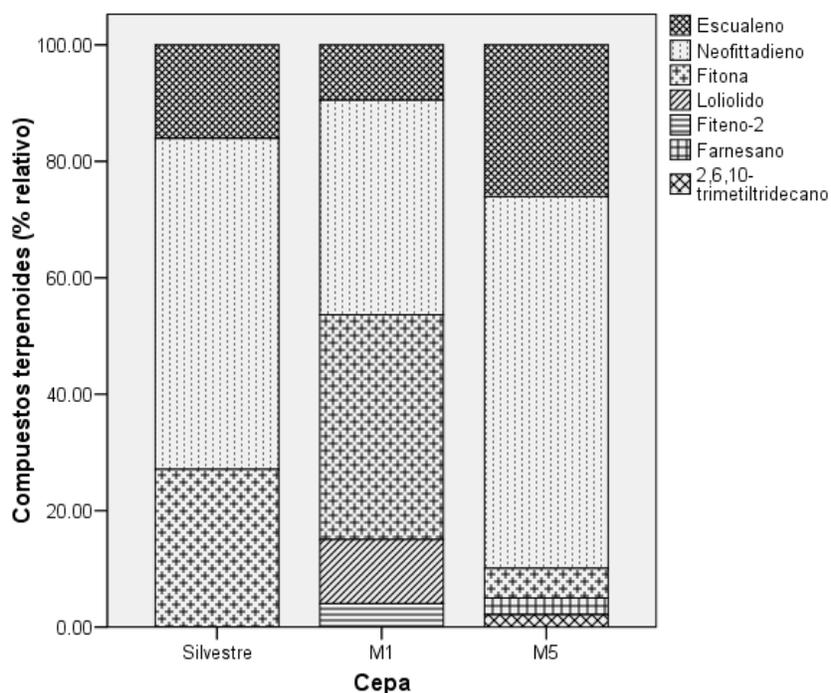


Figura 3.2 Compuestos terpenoides identificados en la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de *C. saccharophila* y su abundancia relativa.

El neofitadieno ha sido identificado en extractos de plantas y microalgas con actividad antibacteriana y antifúngica (Plaza *et al.*, 2010) así como antioxidante y citotóxica (Madhuvanathi *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de su actividad biológica, actualmente el

neofitadieno es un producto de alto valor agregado por su uso principalmente como aditivo en cigarrillos líquidos para potenciar el aroma a tabaco y la tasa de evaporación, aplicación para lo cual fue patentado (Wembo and Lik, 2012), con un valor comercial actual (2018) de 30 USD mg⁻¹ (Santa Cruz Biotechnology TRC). El escualeno por su parte es un terpenoide con diversas aplicaciones industriales tales como humectante en los cosméticos, excipiente de medicamentos, profármaco para quimioterapias, detoxificador, hidratante para la piel y como suplemento alimenticio para la estimulación del sistema inmune (Kajikawa *et al.*, 2015). Varios estudios *in vitro* en modelos animales han demostrado que el escualeno tiene actividad anticancerígena, antiviral, antioxidante, emoliente, inmunoestimulante, detoxificante y preventiva de afecciones cardiovasculares (Fagundes *et al.*, 2018). El fitano también ha mostrado actividad tripanocida y leishmanicida con concentraciones inhibitorias inferiores a la de los tratamientos comerciales (de Felício *et al.*, 2010).

Los compuestos de la fracción de los esteroides fueron detectados únicamente en las dos cepas mutantes de *C. saccharophila* (Figura 3.3). El campesterol fue el único presente en la mutante M1 y el de mayor abundancia en la cepa M5 (71.48%) en la cual se detectó, además, el 5,6-dihidroergosterol (15.03%) y el schotenol (3 β ,5 α -stigmast-7-en-3-ol), (13.49%) (Figura 3.3).

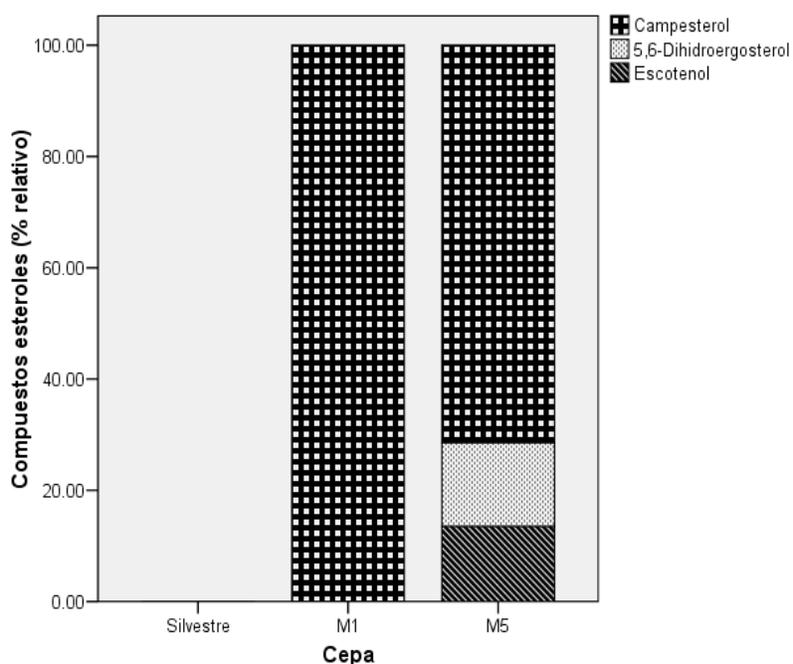


Figura 3.3 Compuestos esteroides identificados en la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de *C. saccharophila* y su abundancia relativa.

Los fitoesteroides son esteroides derivados de plantas y algas ampliamente reconocidos por sus propiedades para prevenir enfermedades cardiovasculares debido a su capacidad de inhibir la absorción de colesterol en la sangre (Fakih *et al.*, 2018). El campesterol se encuentra entre los fitoesteroides para los cuales la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos de América (USA) emitió en el año 2010 una declaración de propiedades saludables, además, autorizó la fortificación de alimentos con fitoesteroides (Luo *et al.*, 2015). Actualmente los fitoesteroides son utilizados en la formulación de alimentos funcionales como yogurt, aderezos, aceite vegetal y chocolate así como en fórmulas farmacéuticas (Tolve *et al.*, 2018). El 5,6-dihidroergosterol, otro de los fitoesteroides detectados en este trabajo, es utilizado como precursor de la vitamina D2 y como ingrediente para la producción de cortisona y ha sido identificado en extractos con actividad antileucémica (Atasever-Arslan *et al.*, 2016).

En la fracción de los alcoholes grasos, el alcohol behénico (*n*-docosanol) fue el único detectado en la cepa silvestre y el de mayor abundancia en la mutante M1 (67.15%) mientras que fue el segundo de mayor proporción en la cepa M5 (31.65%), el *n*-

tetracosanol fue el de mayor abundancia (37.43%) en la cepa M5 y el segundo en la cepa M1 (32.85%) mientras que el 1-heptacosanol se detectó únicamente en la cepa M5 (30.93%) (Figura 3.4).

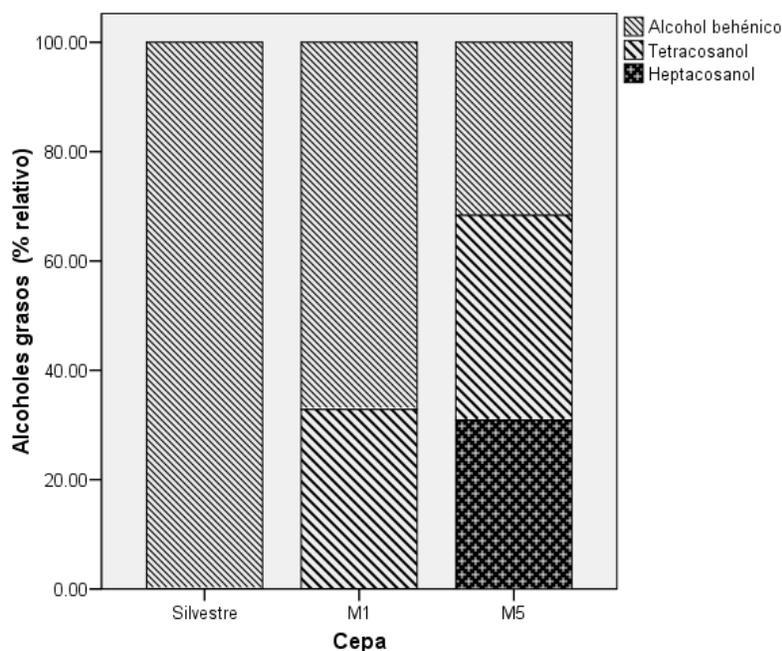


Figura 3.4 Alcoholes grasos identificados en la cepa silvestre y mutantes (M1 y M5) de *C. saccharophila* y su abundancia relativa.

Los alcoholes grasos detectados en *C. saccharophila* se comercializan en la actualidad principalmente en la industria farmacéutica tanto de forma individual como en mezclas. El docosanol es el alcohol graso de importancia comercial debido a sus propiedades antivirales por lo cual la FDA de USA autorizó su uso en el año 2000 como ingrediente activo (10%, v/v) para el tratamiento de lesiones periorales causadas por el virus del herpes simple tipo-1 bajo el nombre comercial Abreva® (Chaudhuri *et al.*, 2018).

Por otra parte, la mezcla de alcoholes grasos de cadena larga (C20-C36), conocida como policosanol, fue aprobada en Cuba como fármaco para el tratamiento de la hipercolesterolemia y actualmente se comercializa bajo el nombre comercial Ateromixol® en USA, Canadá y varios países del caribe (Gong *et al.*, 2018). Además, la mezcla de policosanol con ácidos grasos de cadena larga fue patentado por sus propiedades para

mejorar la actividad sexual masculina y para el tratamiento de la aterosclerosis y de la trombosis (Matkin *et al.*, 2006).

Las fracciones lipídicas de *C. saccharophila* detectadas en este trabajo son similares a los reportados previamente en otras microalgas verdes. Alcaloides, cetonas, terpenos, fenoles, hidrocarburos, ácidos grasos libres, alcoholes grasos, ésteres y esteroides fueron detectados en la composición lipídica del alga verde filamentosa *Spirogyra longata* (Abdel-Aal *et al.*, 2015) mientras que en *Nannochloropsis* sp. y *Nannochloris* sp. las fracciones lipídicas detectadas incluyeron, al igual que *C. saccharophila*, hidrocarburos, TAGs, ácidos grasos libres y terpenos además de aminas (López-Rosales *et al.*, 2019).

Se ha reportado que la composición de lípidos de las microalgas se ve afectada por factores ambientales. En la microalga verde *Ettlia oleoabundans*, la limitación de nitrógeno y fósforo incrementó la proporción de TAGs y disminuyó la proporción de esteroides, fosfatidilglicerol (PGs), monogalactosilmonoacilglicerol (MGMGs), digalactosildiacilglicerol (DGDGs), sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDGs), clorofilas y sus derivados, ácidos grasos y sus derivados hidroxilados, fosfatidilcolinas, monoacilglicerol (MAG), fitoesfingolípidos y quinonas (Matich *et al.*, 2018). Mientras que en *Nannochloropsis salina*, el estrés por frío alteró la proporción de lípidos neutros y polares ya que incrementó la proporción de PUFAs (ácido eicosapentaenoico, EPA), TAGs, MGMGs, monoacilgliceroltrimetilhomoserinas (MGTSSs), diacilgliceroltrimetilhomoserinas (DGTSSs), diacilglicerol (DAGs) y SQDGs mientras que hubo una disminución en la abundancia de monogalactosildiacilglicerol (MGDGs) y de fosfatidildiacilglicerol (PGs) (Willette *et al.*, 2018).

Las cepas mutantes M1 y M5 analizadas en el presente trabajo mostraron contenido diferencial de lípidos para biocombustibles (hidrocarburos y FAAEs) y de lípidos bioactivos (terpenos, esteroides y alcoholes grasos). Previamente nuestro grupo de investigación encontró que los ésteres metílicos de ácidos grasos de la mutante M5 contienen 65 % de PUFAs (C16:2, C18:2 y C18:3) mientras que en la cepa silvestre no fueron detectados (Teco-Bravo *et al.*, 2019, en imprenta). La alteración de la composición de lípidos de M1 y M5 respecto a la WT es atribuido al efecto de la mutagénesis. La radiación UV induce transversiones de A/T a C/G y su efectividad para inducir mutaciones en genes del

metabolismo de lípidos y para mejorar la producción de metabolitos ha sido probada en microalgas (Anthony *et al.*, 2014; Sarayloo *et al.*, 2017).

Las principales fuentes de los metabolitos bioactivos de alto valor agregado detectados en este trabajo son organismos superiores, sin embargo, la producción a partir de estos sistemas biológicos requiere de intervalos de tiempo prolongados y en algunos casos se propicia la sobreexplotación de los recursos naturales (Kajikawa *et al.*, 2015).

Por ejemplo, de un tiburón adulto (*Echinorhinus brucus*) de aproximadamente 170 kg de peso se puede obtener hasta 1.15 kg de escualeno, una baja proporción, la cual de hecho ha propiciado la sobreexplotación de esta fuente (Fagundes *et al.*, 2018). Del tabaco virginia, la variedad más productiva, se puede obtener hasta 2.5 mg de neofitadieno por gramo de biomasa (Leffingwell, 2014). Del salvado de arroz, la principal fuente de fitoesteroles, se puede obtener hasta 32.25 mg g⁻¹ de aceite (Luo *et al.*, 2015). De la cera de caña de azúcar, la fuente principal de policosanoles es posible obtener hasta 2.2 mg g⁻¹ de corteza (Attard *et al.*, 2015).

Las microalgas, en cambio, tienen ciclos de producción muy cortos (10 días en el caso de *C. saccharophila*) y pueden cultivarse durante todo el año en espacios contenidos y menores del que necesitan las plantas, lo cual permite elevar la productividad en varios órdenes de magnitud respecto a las fuentes vegetales. Por ejemplo, podemos calcular que la cepa M5 produjo aproximadamente 0.40 mg de escualeno, 3.14 mg de neofitadieno, 1.04 mg de fitoesteroles y 0.94 mg de policosanoles por gramo de biomasa seca y por litro de cultivo (Datos no mostrados). Haciendo una estimación de la producción a pequeña escala industrial (100 m³ día⁻¹) de la cepa M5, se obtendrían aproximadamente de 40 kg de escualeno, 314 kg de neofitadieno, 104 kg de fitoesteroles y 94 kg de policosanoles en solo 10 días.

Además, si se incrementa el volumen de cultivo en determinada magnitud, la producción incrementaría en la misma proporción. Finalmente, el contenido de compuestos bioactivos de las cepas de *C. saccharophila* reportado en este trabajo se analizó en condiciones normales de cultivo, lo que hace posible mejorar la productividad aplicando estrategias como la adición de ácido abscísico (Contreras-Pool *et al.*, 2016), incrementando aún más su potencial como fuente de compuestos bioactivos de alto valor agregado.

3.4 CONCLUSIÓN

En este estudio se analizó la composición del extracto lipídico de la cepa silvestre y de dos mutantes de *C. saccharophila* tolerantes a la acidez. En la cepa silvestre se identificó mayor proporción de hidrocarburos mientras que en las mutantes se detectó mayor proporción de lípidos bioactivos de alto valor comercial principalmente el neofitadieno, escualeno, campesterol y docosanol. Los resultados de este estudio revelaron que *C. saccharophila* es una rica fuente de hidrocarburos y que la mutagénesis UV fue capaz de mejorar el contenido de lípidos bioactivos de alto valor agregado en esta microalga.



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

- La radiación UV es un método efectivo para generar mutantes en *C. saccharophila*.
- El gradiente de pH en caja Petri es un método robusto que permite seleccionar colonias mutantes de *C. saccharophila* en función de su tolerancia a pH ácido.
- La mutagénesis con radiación UV acoplada al uso del gradiente de pH es una estrategia que permite obtener mutantes de *C. saccharophila* con mayor acumulación de TAGs y PUFAs que la cepa silvestre.
- *C. saccharophila* es una fuente potencial de lípidos bioactivos de alto valor agregado, principalmente neofitadieno, escualeno, campesterol y docosanol.
- La mutagénesis UV mejora el contenido de lípidos bioactivos de alto valor comercial de *C. saccharophila*.

PERSPECTIVAS

- Analizar el genoma, transcriptoma y proteoma de las mutantes generadas en este estudio con contenido mejorado de TAG para elucidar cómo estas células se adaptan a las condiciones de estrés del pH ácido y su relación con la síntesis de TAG.
- Comparar los perfiles de expresión de los genes que codifican para las enzimas desaturasas en la cepa silvestre y la mutante M5 para elucidar su capacidad de sobreproducción de PUFAs.
- Sobreexpresar genes elongasa y desaturasa en la mutante M5 sobreproductora de C18:3 para evaluar la producción de EPA y DHA.
- Evaluar diferentes condiciones de estrés abiótico para el mejoramiento de la producción de lípidos bioactivos de *C. saccharophila*.

- Evaluar la sobreexpresión de genes involucrados en la biosíntesis de lípidos bioactivos en *C. saccharophila* para el mejoramiento de la productividad de estos metabolitos.



BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal, E.I., Haroon, A.M., Mofeed, J. (2015). Successive solvent extraction and GC-MS analysis for the evaluation of the phytochemical constituents of the filamentous green alga *Spirogyra longata*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41, 233–246.
- Amin, S. (2009). Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 50, 1834–1840.
- Anthony, J., Rangamaran, V.R., Gopal, D., Shivasankarasubbiah, K.T., Thilagam, M.L.J., Peter Dhassiah, M., Padinjattayil, D.S.M., Valsalan, V.K.N., Manambrakat, V., Dakshinamurthy, S., Thirunavukkarasu, S., Ramalingam, K. (2014). Ultraviolet and 5'fluorodeoxyuridine induced random mutagenesis in *Chlorella vulgaris* and its impact on fatty acid profile: a new insight on lipid-metabolizing genes and structural characterization of related proteins. *Marine Biotechnology*, 17, 66–80.
- Atasever-Arslan, B., Yilancioglu, K., Kalkan, Z., Timucin, A.C., Gür, H., Isik, F.B., Deniz, E., Erman, B., Cetiner, S. (2016). Screening of new antileukemic agents from essential oils of algae extracts and computational modeling of their interactions with intracellular signaling nodes. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 83, 120–131.
- Attard, T.M., Mcelroy, C.R., Rezende, C.A., Polikarpov, I., Clark, J.H., Hunt, A.J. (2015). Sugarcane waste as a valuable source of lipophilic molecules. *Industrial Crops and Products*, 76, 95–103.
- Becker, E.W. (2007). Micro algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25, 207–210.
- Benjumea, P., Agudelo, J.R., Agudelo, A.F. (2010). Effect of the degree of unsaturation of biodiesel fuels on engine performance, combustion characteristics, and emissions. *Energy and Fuels*, 25, 77–85.
- Brennan, L., Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and*

-
- Sustainable Energy Reviews, 14, 557–577.
- Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H. (2013). Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 143, 1–9.
- Budzianowski, W.M. (2017). High-value low-volume bioproducts coupled to bioenergies with potential to enhance business development of sustainable biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 70, 793–804.
- Campbell, N., Reece, J. (2007). *Biología*, 7th ed. Médica Panamericana, California, USA.
- Chaudhuri, S., Symons, J.A., Deval, J. (2018). Innovation and trends in the development and approval of antiviral medicines: 1987–2017 and beyond. *Antiviral Research*, 155, 76–88.
- Chen, B., McClements, D.J., Decker, E.A. (2013). Design of foods with bioactive lipids for improved health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 35–56.
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26, 126–131.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294–306.
- Contreras-Pool, P.Y., Peraza-Echeverria, S., Ku-González, Á.F., Herrera-Valencia, V.A. (2016). The phytohormone abscisic acid increases triacylglycerol content in the green microalga *Chlorella saccharophila* (Chlorophyta). *Algae*, 31, 267–276.
- De Felício, R., de Albuquerque, S., Young, M.C.M., Yokoya, N.S., Debonsi, H.M. (2010). Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52, 763–769.
- De Jaeger, L., Verbeek, R.E., Draaisma, R.B., Martens, D.E., Springer, J., Eggink, G., Wijffels, R.H. (2014). Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (I) mutant generation and characterization.
-

- Biotechnology for Biofuels, 7, 69.
- Doan, T.T.Y., Obbard, J.P. (2012). Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. *Algal Research*, 1, 17–21.
- Eibl, J.K., Corcoran, J.D., Senhorinho, G.N. a, Zhang, K., Hosseini, N.S., Marsden, J., Laamanen, C. a, Scott, J. a, Ross, G.M. (2014). Bioprospecting for acidophilic lipid-rich green microalgae isolated from abandoned mine site water bodies. *AMB Express*, 4, 7.
- Eroglu, E., Melis, A. (2010). Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae *Botryococcus braunii* var. *Showa*. *Bioresource Technology*, 101, 2359–2366.
- Eroglu, E., Melis, A. (2009). “Density equilibrium” method for the quantitative and rapid *in situ* determination of lipid, hydrocarbon, or biopolymer content in microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1406–1415.
- Fagundes, M.B., Vendruscolo, R.G., Maroneze, M.M., Barin, J.S., de Menezes, C.R., Zepka, L.Q., Jacob-Lopes, E., Wagner, R. (2018). Towards a sustainable route for the production of squalene using cyanobacteria. *Waste and Biomass Valorization*, 0, 1–8.
- Fakih, O., Sanver, D., Kane, D., Thorne, J.L. (2018). Exploring the biophysical properties of phytosterols in the plasma membrane for novel cancer prevention strategies. *Biochimie*, 153, 150–161.
- Fuggi, A., Pinto, G., Pollio, A. (1988a). Effects of NaCl, Na₂SO₄, H₂SO₄ and glucose on growth, photosynthesis and respiration in the acidophilic alga *Dunaliella acidophila* (Volvocales, Chlorophyta). *Phycologia*, 27, 334–339.
- Fuggi, A., Pinto, G., Pollio, A., Taddei, R. (1988b). The role of glycerol in osmoregulation of the acidophilic alga. *Phycologia*, 27, 439–446.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 405–416.

-
- Gong, J., Qin, X., Yuan, F., Hu, M., Chen, G., Fang, K., Wang, D., Jiang, S., Li, J., Zhao, Y., Huang, Z., Dong, H., Lu, F. (2018). Efficacy and safety of sugarcane policosanol on dyslipidemia: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62, 1–13.
- Harris, E. (2008). *Chlamydomonas* in the Laboratory, in: Harris, E. (Ed.), *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*. pp. 241–302.
- Harris, E.H. (1989). *The Chlamydomonas Sourcebook: A comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. Academic Press, San Diego, CA.
- Herrera-Valencia, V.A., Contreras-Pool, P.Y., López-Adrián, S.J., Peraza-Echeverría, S., Barahona-Pérez, L.F. (2011). The green microalga *Chlorella saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production. *Current Microbiology*, 63, 151–157.
- Herrera-Valencia, V.A., Us-Vázquez, R.A., Larqué-Saavedra, F.A., Barahona-Pérez, L.F. (2012). Naturally occurring fatty acid methyl esters and ethyl esters in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Annals of Microbiology*, 62, 865–870.
- Hlavova, M., Turoczy, Z., Bisova, K. (2015). Improving microalgae for biotechnology - From genetics to synthetic biology. *Biotechnology Advances*, 33, 1194–1203.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal*, 54, 621–639.
- Huang, Y., Zhang, D., Xue, S. (2016). The potential of microalgae lipids for edible oil production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 438–451.
- Ikehata, H., Ono, T. (2011). The Mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of Radiation Research*, 52, 115–125.
- Jagadevan, S., Banerjee, A., Banerjee, C., Guria, C., Tiwari, R., Baweja, M., Shukla, P. (2018). Recent developments in synthetic biology and metabolic engineering in microalgae towards biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, 11, 185.
-

- Kajikawa, M., Kinohira, S., Ando, A., Shimoyama, M., Kato, M., Fukuzawa, H. (2015). Accumulation of squalene in a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* by genetic modification of squalene synthase and squalene epoxidase genes. *PLoS ONE*, 10, 1–21.
- Khozin-Goldberg, I., Iskandarov, U. (2011). LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 905–915.
- Klok, A.J., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H. (2014). Edible oils from microalgae: Insights in TAG accumulation. *Trends in Biotechnology*, 32, 521–528.
- Krienitz, L., Huss, V.A.R., Bock, C. (2015). *Chlorella*: 125 years of the green survivalist. *Trends in Plant Science*, 20, 67–69.
- Kröger, M., Müller-Langer, F. (2012). Review on possible algal-biofuel production processes. *Biofuels*, 3, 333–349.
- Larkum, A.W.D., Ross, I.L., Kruse, O., Hankamer, B. (2012). Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 30, 198–204.
- Leffingwell, J. (2014). Leaf chemistry-basic chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types, 265-284. Reprinted from *Tobacco: Production, Chemistry, And Technology*, eds D. Layten Davis and MT Nielson (Hoboken, NJ: Blackwell Science).
- Li, Y., Han, D., Hu, G., Dauvillee, D., Sommerfeld, M., Ball, S., Hu, Q. (2010). *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metabolic Engineering*, 12, 387–391.
- Lim, D.K.Y., Schuhmann, H., Sharma, K., Schenk, P.M. (2015). Isolation of high-lipid *Tetraselmis suecica* strains following repeated UV-C mutagenesis, FACS, and high-throughput growth selection. *Bioenergy Research*, 8, 750–759.

- López-Rosales, A.R., Ancona-Canché, K., Chavarria-Hernandez, J.C., Barahona-Pérez, F., Toledano-Thompson, T., Garduño-Solórzano, G., López-Adrian, S., Canto-Canché, B., Polanco-Lugo, E., Valdez-Ojeda, R. (2019). Fatty acids, hydrocarbons and terpenes of *Nannochloropsis* and *Nannochloris* isolates with potential for biofuel production. *Energies*, 12, 1-21.
- Luo, X., Su, P., Zhang, W. (2015). Advances in microalgae-derived phytosterols for functional food and pharmaceutical applications. *Marine Drugs*, 13, 4231–4254.
- Madhuvanathi, C., Santhosh Kumar, K., Antony Ceasar, S., Valivittan, K., inivasan, K., Tamilselvi, A. (2014). Antibacterial, antioxidant and antiproliferative activities of solvent extracts of *Tiliacora acuminata*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 6, 398–403.
- Matich, E.K., Ghafari, M., Camgoz, E., Caliskan, E., Pfeifer, B.A., Haznedaroglu, B.Z., Atilla-Gokcumen, G.E. (2018). Time-series lipidomic analysis of the oleaginous green microalga species *Ettlia oleoabundans* under nutrient stress. *Biotechnology for Biofuels*, 11, 1–15.
- Matkin, J.R., Wang, S., Li, C., Huang, W. (2006). United States Patent Application No 11/119, 893.
- Meher, L.C., Sagar, D.V., Naik, S.N., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10, 248–268.
- Mehta, P., Singh, D., Saxena, R., Rani, R., Gupta, R.P., Puri, S.K., Mathur, A.S. (2018). High-value coproducts from algae—an innovational way to deal with advance algal industry. *Waste to Wealth*, 343–363.
- Mehtani, J., Arora, N., Patel, A., Jain, P., Pruthi, P.A., Mohan, K., Pruthi, V. (2017). Augmented lipid accumulation in ethyl methyl sulphonate mutants of oleaginous microalga for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 242, 121–127.
- Michalak, I., Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in life sciences*, 15,160–176.

-
- Napier, J.A., Sayanova, O., 2017. The production of very-long-chain PUFA biosynthesis in transgenic plants: towards a sustainable source of fish oils. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64, 387–393.
- Norashikin, M.N., Loh, S.H., Aziz, A., Cha, T.S. (2018). Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in *Chlorella vulgaris* using an endogenous omega-3 fatty acid desaturase gene with its promoter. *Algal Research*, 31, 262–275.
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S.V.V., Ghosh, T., Dubey, S., Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244, 1216–1226.
- Patnaik, R. (2008). Engineering complex phenotypes in industrial strains. *Biotechnology Progress*, 24, 38–47.
- Pérez, L., Bugja, R., Lorenschat, J., Brenner, M., Curtis, J., Hoelzmann, P., Islebe, G., Scharf, B., Schwalb, A. (2011). Aquatic ecosystems of the Yucatán Peninsula (México), Belize, and Guatemala. *Hydrobiologia*, 661, 407–433.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García, G., Herrero, M., Mendiola, J.A., Ibañez, E. (2010). Screening for bioactive compounds from algae. *Advanced Biofuels and Bioproducts*, 51, 450–455.
- Poerschmann, J., Spijkerman, E., Langer, U. (2004). Fatty acid patterns in *Chlamydomonas* sp. as a marker for nutritional regimes and temperature under extremely acidic conditions. *Microbial Ecology*, 48, 78–89.
- Pulz, M.O., Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 635–648.
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., Posewitz, M.C. (2010). Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell*, 9, 486–501.
- Ramos, M.J., Fernández, C.M., Casas, A., Rodríguez, L., Pérez, Á. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 100, 261–268.
-

-
- Raven, P., Johnson, G. (2002). *Biology*, 6th ed. St. Louis Missouri, USA.
- Remmers, I.M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., Lamers, P.P. (2018). Can we approach theoretical lipid yields in microalgae? *Trends in Biotechnology*, 36, 265–276.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology*/edited by Amos Richmond. Orton.Catie.Ac.Cr 472.
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100–112.
- Rowlands, R.T. (1984). Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, 6, 3–10.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278.
- Sarayloo, E., Simsek, S., Unlu, Y.S., Cevahir, G., Erkey, C., Kavakli, I.H. (2018). Enhancement of the lipid productivity and fatty acid methyl ester profile of *Chlorella vulgaris* by two rounds of mutagenesis. *Bioresource Technology*, 250, 764–769.
- Sarayloo, E., Tardu, M., Unlu, Y.S., Simsek, S., Cevahir, G., Erkey, C., Kavakli, I.H. (2017). Understanding lipid metabolism in high-lipid-producing *Chlorella vulgaris* mutants at the genome-wide level. *Algal Research*, 28, 244–252.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Research*, 1, 20–43.
- Sega, G.A. (1984). A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 134, 113–142.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization,

- and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627–662.
- Shrivastav, N., Li, D., Essigmann, J.M. (2009). Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: Cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis*, 31, 59–70.
- Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M.P., Voordeckers, K., Verstrepen, K.J. (2014). Improving industrial yeast strains: Exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38, 947–995.
- Stephens, E., Wolf, J., Oey, M., Zhang, E., Hankamer, B., Ross, I.L. (2015). Stephens, E., Wolf, J., Oey, M., Zhang, E., Hankamer, B., Ross, I. L. (2015). Genetic engineering for microalgae strain improvement in relation to biocrude production systems. In *Biomass and Biofuels from Microalgae* (pp. 191-249). Springer, Cham
- Szybalski, W., Bryson, V. (1952). Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 64, 489–499.
- Tapia, E. V, Anschau, A., Coradini, A.L., T Franco, T., Deckmann, A.C. (2012). Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. *AMB Express*, 2, 64.
- Tatsuzawa, H., Takizawa, E., Wada, M., Yamamoto, Y. (1996). Fatty acid and lipid composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas* sp. *Journal of Phycology*, 32, 598–601.
- Teco-Bravo, J.I., Barahona-Pérez, L.F., Reyes-Sosa, C.F., Ku-González, Á.F., Herrera-Valencia, V.A., Peraza-Echeverria, S. (2019). Enhanced production of triacylglycerols and polyunsaturated fatty acids in novel acid-tolerant mutants of the green microalga *Chlorella saccharophila*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*.
- Tolve, R., Condelli, N., Caruso, M.C., Barletta, D., Favati, F., Galgano, F. (2018). Fortification of dark chocolate with microencapsulated phytosterols: Chemical and sensory evaluation. *Food and Function*, 9, 1265–1273.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gan, A., Levine, M., Losick, R. (2004). *Molecular Biology of*

the Gene. Yale J. Biol. Med.

Weinberg, E. (1959). Gradient Agar Plates. *The American Biology Teacher*, 21, 347–350.

Wembo, L., Lik, H. (2012). United States Patent Application No.13/330, 505.

Willette, S., Gill, S.S., Dungan, B., Schaub, T.M., Jarvis, J.M., St. Hilaire, R., Omar Holguin, F. (2018). Alterations in lipidome and metabolome profiles of *Nannochloropsis salina* in response to reduced culture temperature during sinusoidal temperature and light. *Algal Research*, 32, 79–92.

Xue, Z., Wan, F., Yu, W., Liu, J., Zhang, Z., Kou, X. (2018). Edible oil production from microalgae : A Review. *European Journal of Lipid Science*, 1–11.

Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., Kawano, S. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Plant Research*, 117, 257–264.