



UNAP



FACULTAD DE AGRONOMÍA

DOCTORADO EN AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE

TESIS

**CATÁLOGO DE GENES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS
DE MICROALGAS OLEAGINOSAS AMAZÓNICAS
PROMISORIAS PARA LA PRODUCCIÓN
SUSTENTABLE DE BIODIESEL.
IQUITOS – 2016**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA
EN AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE

AUTORA : Lic. LUZ ANGELICA ANGULO RIOS Mg.

ASESORA : Dra. MARIANELA COBOS RUIZ

IQUITOS – PERÚ

2017



UNAP

Escuela de Post Grado
Oficina de Asuntos Académicos



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Con Resolución Directoral N° 0337-2017-EPG-UNAP, se autoriza la sustentación de la tesis: "CATÁLOGOS DE GENES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS DE MICROALGAS OLEAGINOSAS AMAZÓNICAS PROMISORIAS PARA LA PRODUCCIÓN SUSTENTABLE DE BIODISEL. IQUITOS - 2016" designando como jurados a los siguientes profesionales:

Dr. Rafael Chávez Vásquez	Presidente
Dra. Felicia Díaz Jarama	Miembro
Dr. Juan Carlos Castro Gómez	Miembro

A los doce días del mes de Mayo del 2017, a horas 11:00 a.m., en el Auditorio de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, se constituyó el Jurado Evaluador y Dictaminador, para presenciar y evaluar la sustentación de la tesis: "CATÁLOGOS DE GENES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS DE MICROALGAS OLEAGINOSAS AMAZÓNICAS PROMISORIAS PARA LA PRODUCCIÓN SUSTENTABLE DE BIODISEL. IQUITOS - 2016", presentado por la egresada: LUZ ANGÉLICA ANGULO RIOS, como requisito para optar el Grado Académico de DOCTORA EN AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE, que otorga la UNAP de acuerdo a la Ley Universitaria N° 30220 y el Estatuto de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.

Después de haber escuchado la sustentación y luego de formuladas las preguntas, éstas fueron:

Contestadas satisfactoriamente

El Jurado, después de la deliberación correspondiente en privado, llegó a las siguientes conclusiones, la sustentación es:

- 1. Aprobado como: a) Excelente () b) Muy bueno c) Bueno ()
- 2. Desaprobado: ()

Observaciones : *Ninguna*

A Continuación, el Presidente del Jurado, dio por concluida la sustentación, siendo las ^{1:00} p.m. del día doce de Mayo del 2017; con lo cual, se le declara a la sustentante ^{APTA} para recibir el Grado Académico de ~~DOCTORA EN AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE~~

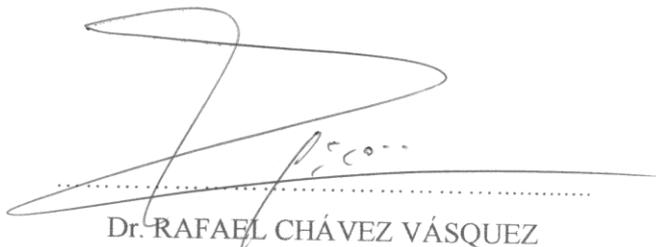
[Signature]
Dr. Rafael Chávez Vasquez
Presidente

[Signature]
Dra. Felicia Díaz Jarama
Miembro

[Signature]
Dr. Juan Carlos Castro Gómez
Miembro

TESIS APROBADA EN SUSTENTACIÓN PÚBLICA DEL DÍA VIERNES 12 DE MAYO DEL 2017 EN EL AUDITORIO DE LA ESCUELA DE POSTGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, EN LA CIUDAD DE IQUITOS-PERÚ

MIEMBROS DEL JURADO:



.....

Dr. RAFAEL CHÁVEZ VÁSQUEZ

Presidente



.....

Dra. FELICIA DÍAZ JARAMA

Miembro



.....

Dr. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ

Miembro



.....

Dra. MARIANELA COBOS RUIZ

Asesora

DEDICATORIA

A Dios, por guiar siempre mi camino y permitir que día a día pueda cumplir con las metas propuestas.

A mi asesora Marianela Cobos Ruíz, por su apoyo constante en el desarrollo de la tesis.

A mi esposo, por brindarme su apoyo constante a lo largo de mi vida en lo moral, económico, sabios consejos, cariño y comprensión para culminar mis estudios de post grado.

A mis hijos Christian y Eros, por su apoyo y comprensión en el transcurso de las clases y ejecución de la tesis, porque me motiva a seguir progresando para ser un ejemplo a seguir en su vida.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto de investigación “Secuenciamiento y anotación de transcriptomas de microalgas oleaginosas de la Amazonia Peruana promisorias para la producción sustentable de biodiesel: descubrimiento de genes y descripción de vías metabólicas” subvencionado por el Programa Nacional de Innovación Para la Competitividad y Productividad (PNICP) y la Universidad Científica del Perú (UCP) por el apoyo financiero brindado para la realización de la presente tesis.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú por permitirme el uso de sus equipos, materiales y reactivos que contribuyeron con el mantenimiento en cultivo de las microalgas que fueron empleadas en este proceso de experimentación.

Al Dr. Jorge Marapara Del Águila, Coordinador de la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana por facilitarnos el uso de equipos necesarios para realizar durante todo este tiempo los ensayos de purificación de ARN total.

En especial a mi asesora, Dra. Marianela Cobos Ruiz por su gran apoyo incondicional y amistad brindada hacia mi persona y por permitirme formar parte de su proyecto de investigación que lidera, logrando así culminar satisfactoriamente el proyecto de tesis.

A la Lic. María Casuso Wong, Bach. Katia Amasifuén, Napoleón Rodríguez, Segundo Estela, quienes me apoyaron en el adiestramiento de las técnicas de laboratorio, durante el proceso de ejecución de la tesis.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la culminación de la tesis, a todas ellas MUCHAS GRACIAS.

CATÁLOGO DE GENES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS DE MICROALGAS OLEAGINOSAS AMAZÓNICAS PROMISORIAS PARA LA PRODUCCIÓN SUSTENTABLE DE BIODIESEL. IQUITOS – 2016

Luz Angélica Angulo-Ríos y Marianela Cobos-Ruíz

RESUMEN

La producción de biodiesel a partir de triglicéridos de microalgas está incrementándose, ya que esta materia prima es una alternativa más sostenible y ventajosa. Sin embargo, hasta el momento desconocemos los genes involucrados en el metabolismo de lípidos de esta especie. Por lo que, el objetivo fue elaborar un catálogo de genes del metabolismo de lípidos de las especies microalgales *Ankistrodesmus* sp. *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. Se cultivaron estas microalgas en medio Chu Nro. 10 con y sin nitrógeno bajo condiciones de laboratorio. La evaluación se realizó por triplicado en un periodo de 7 días. Los lípidos totales fueron extraídos con Cloroformo:metanol (2:1) y determinó su contenido por gravimetría. El ARN total fue purificado utilizando un método simple y eficaz. La identificación de las enzimas que están relacionados con el metabolismo de triglicéridos se realizó a partir del ensamblado y anotación de los transcriptomas microalgales usando diversos programas bioinformáticos. Los resultados indican que *Ankistrodesmus* sp., fue la microalga que bajo condiciones sin nitrógeno presentó el máximo porcentaje de lípidos totales y *Scenedesmus* sp., la que mostró mayor producción de biomasa. Se obtuvo un ARN total de excelente calidad y cantidad. Se identificaron diversas enzimas que codifican los genes relacionados con el metabolismo de triglicéridos. Concluyendo que las microalgas evaluadas constituyen materias primas renovables para la producción de biodiesel.

Palabras clave: Genes, lípidos totales, microalgas, ácidos nucleicos.

CATALOG OF LIPID METABOLISM GENES OF PROMISING AMAZONIAN OLEAGINOUS MICROALGAE FOR THE SUSTAINABLE PRODUCTION OF BIODIESEL. IQUITOS - 2016

Luz Angélica Angulo-Ríos and Marianela Cobos-Ruíz

ABSTRACT

The production of biodiesel from microalgae triglycerides is increasing, as this raw material is a more sustainable and advantageous alternative. However, so far we do not know the genes involved in the lipid metabolism of this species. Therefore, the objective was to develop a catalog of lipid metabolism genes of the microalgal species *Ankistrodesmus* sp. *Scenedesmus* sp. And *Chlorella* sp. These microalgae were cultured in Chu No. 10 medium with and without nitrogen under laboratory conditions. The evaluation was done in triplicate in a period of 7 days. Total lipids were extracted with Chloroform: methanol (2: 1) and determined by gravimetry. Total RNA was purified using a simple and efficient method. The identification of the enzymes that are related to the triglyceride metabolism was made from the assembly and annotation of the microalgal transcripts using various bioinformatic programs. The results indicate that *Ankistrodesmus* sp., Was the microalga that under conditions without nitrogen presented the maximum percentage of total lipids and *Scenedesmus* sp., Which showed greater production of biomass. Total RNA of excellent quality and quantity was obtained. Several enzymes encoding genes related to triglyceride metabolism were identified. Concluding that the evaluated microalgae constitute renewable raw materials for the production of biodiesel.

Key words: Genes, total lipids, microalgae, nucleic acids.

CATÁLOGO DE GENES DO METABOLISMO LIPÍDICO DE ÓLEO DE MICROALGAS AMAZÔNICA PROMISSORES PARA A PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIODIESEL. IQUITOS - 2016

Luz Angélica Ângulo-Ríos e Marianela Cobos-Ruiz

RESUMO

Produção de biodiesel a partir de microalgas está aumentando triglicerídeos, como a matéria-prima é alternativa mais sustentável e vantajoso. No entanto, os genes que até agora desconhecidos envolvidos no metabolismo lipídico nesta espécie. Assim, o objectivo foi desenvolver um catálogo de genes do metabolismo lipídico de espécies de microalgas *Ankistrodesmus* sp. *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. Estas foram cultivadas em microalgas não Chu. 10 com e sem azoto sob condições de laboratório. A avaliação foi efectuada em triplicado ao longo de um período de 7 dias. Total de lípidos foram extraídos com clorofórmio: metanol (2: 1) e determinado por gravimetria conteúdo. O ARN total foi purificado usando um método simples e eficaz. Identificar enzimas que estão relacionados com o metabolismo de triglicérides foi feita a partir da montagem e anotação de transcriptomes microalgas usando vários programas de bioinformática. Os resultados indicam que *Ankistrodesmus* sp., Foi o microalgas que, sob condições sem nitrogênio mostrou o percentual máximo de lípidos totais e *Scenedesmus* sp., Que mostrou maior produção de biomassa. Obteve-se um ARN total de excelente qualidade e quantidade. que codifica várias enzimas relacionadas com o metabolismo dos triglicéridos genes que foram identificados. Concluindo que os microalgas são avaliadas matérias-primas renováveis para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: Genes, lípidos totais, microalgas, ácidos nucleicos.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
RESUMO	viii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
CAPÍTULO I	01
1.1 INTRODUCCIÓN.	01
1.2 PROBLEMAS DE INVESTIGACIÓN	02
1.3 OBJETIVOS	04
1.3.1. Objetivos Generales	04
1.3.2 Objetivos Específicos	04
CAPÍTULO II	05
2.1. MARCO TEÓRICO.	05
2.1.1. Antecedentes.	05
2.1.2. Bases Teóricas.	08
2.1.3. Marco Conceptual.	20
2.2 DEFINICIONES OPERACIONALES	28
2.3 HIPÓTESIS.	29
CAPÍTULO III	30
3. METODOLOGÍA:	30
3.1 Método de investigación	30
3.2 Diseños de investigación.	30
3.3 Población y muestra.	30
3.4 Técnicas e instrumentos	30

3.5	Procedimientos de recolección de datos	31
3.6	Técnicas de procesamiento y análisis de datos	34
3.7	Protección de los derechos humanos	35
CAPÍTULO IV		36
RESULTADOS		36
4.1	Contenido de Lípidos totales y producción de biomasa de <i>Ankistrodesmus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp. cultivados en medio CHU con (N+) y sin nitrógeno (N-).	36
4.2	Purificación de ARN total de <i>Ankistrodesmus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp. cultivados en medio CHU con y sin nitrógeno.	39
4.3	Identificación de enzimas que codifican genes del metabolismo de lípidos en <i>Ankistrodesmus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp cultivadas en medio con nitrógeno.	41
CAPÍTULO V		49
DISCUSIÓN.		49
CAPÍTULO VI		53
PROPUESTA.		53
CAPÍTULO VII		54
CONCLUSIONES.		54
CAPÍTULO VIII		55
RECOMENDACIONES.		55
CAPÍTULO IX		56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		56
ANEXOS		65
ANEXO N° 01: Matriz de consistencia		66

ANEXO N° 02: Cultivos iniciales de las especies de microalgas amazónicas.	67
ANEXO N° 03: Cosecha microalgal para ensayos	68
ANEXO N° 04: Ensayos de Inducción	69
ANEXO N° 05: Cosecha de microalgas sometidas a tratamiento (secado, raspado y pesado)	70
ANEXO N° 06: Extracción de Lípidos totales	71
ANEXO N° 07: Extracción de ARN y Corrida Electroforética	72

INDICE DE CUADROS

N°	DESCRIPCIÓN	Pág.
01	Acumulación de lípidos totales y producción de biomasa en <i>Ankistrodesmus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp, <i>Chlorella</i> sp. Cultivadas en diferentes concentraciones de nitrógeno.	36
02	Ratios de calidad, Cuantificación de ARN total purificado, de tres microalgas Amazónicas	39
03	Relación de enzimas que codifican los genes de las vías metabólicas de lípidos en <i>Ankistrodesmus</i> sp	42
04	Relación de enzimas que codifican los genes de las vías metabólicas de triglicéridos en <i>Chlorella</i> sp.	44
05	Relación de enzimas que codifican los genes de las vías metabólicas de triglicéridos en <i>Scenedesmus</i> sp	47

INDICE DE GRÁFICOS

Nº	DESCRIPCIÓN	Pág.
01	Algunas especies de microalgas de agua dulce. A: <i>Coelastrum astroideu</i> , B: <i>Oocystella solitaria</i> , C: <i>Micractinium bornhemiense</i> , D: <i>Botryococcus braunii</i> .	10
02	Especies de microalgas representativas encontradas en el Río Itaya. A: <i>Ankistrodesmus</i> sp. B: <i>Chlorella</i> sp. C: <i>Scenedesmus</i> sp.	10
03	Interacción del proceso fotosintético con la producción de lípidos en microalgas.	14
04	Panorama general de la biosíntesis de lípidos y Triacilgliceroles en microalgas oleaginosas	15
05	Catabolismo de grasas o beta oxidación que ocurre en el citosol	16
06	Catabolismo de triacilgliceroles.	17
07	Esterificación de los triacilgliceroles producidos por las microalgas oleaginosas para la producción de biodiesel	19
08	Impactos positivos que origina la producción de biodiesel en el ambiente.	20
09	Contenido de lípidos totales de tres especies de microalgas sultivadas en medio con y sin nitrógeno.	37
10	Contenido de lípidos totales de tres especies de microalgas cultivadas en medio con (+) y sin nitrógeno (-). A (<i>Chlorella</i> sp.) B (<i>Ankistrodesmus</i> sp.) y C (<i>Scenedesmus</i> sp.)	38
11	Gel de agarosa al 1% con muestras de ARN total obtenidos de <i>Ankistrodesmus</i> sp., (A) <i>Chlorella</i> sp., (C) y <i>Scenedesmus</i> sp. (S) con (+) y sin nitrógeno (-)	40

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

Los estudios de secuenciación de transcriptomas con tecnologías de última generación nos permiten ampliar significativamente los conocimientos genético moleculares de las microalgas, y son herramientas indispensables para la elaboración del catálogo de genes involucrados en el metabolismo lipídico. Esto ha sido demostrado recientemente en análisis transcriptómicos de especies de microalgas marinas como *Dunaliella tertiolecta* (Rismani *et al.*, 2011), *Chlamydomonas reinhardtii* (Lv *et al.*, 2013), *Monoraphidium neglectum* (Bogen, *et al.*, 2013). Estrategias similares de secuenciación se realizaron en esta investigación con las especies *Ankistrodesmus* sp. *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. Estas microalgas se caracterizan por su alto contenido de lípidos (>50%) y esta acumulación se incrementa significativamente bajo condiciones de estrés fisiológico, como la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo (Wang *et al.*, 2010; Paredes, 2014), una estrategia que también ha sido probada en otras especies de microalgas para mejorar la productividad bioquímica de lípidos (Miller *et al.*, 2010; Kalita *et al.*, 2011).

Es importante conocer y por ende elaborar un catálogo de los genes involucrados en el metabolismo de lípidos. Porque servirá de base para realizar estudios aplicados para manipular los genes e incrementar la productividad de lípidos para la producción de biodiesel a escala industrial que beneficiará a la sociedad y al ambiente (Fernández *et al.*, 2012; Ferreira, 2013); brindando así, productos finales de gran relevancia para la comunidad científica y para la mejora del nivel socioeconómico regional y nacional. Asimismo, el uso potencial de las microalgas mejoradas genéticamente servirá para elaborar biofertilizante, tratar las aguas residuales derivadas de desagües municipales, domésticos, agrícolas y actividades industriales, que potencialmente pueden proporcionar rentables medios sostenibles de crecimiento, pues, la virtud de las microalgas para producir biocombustibles contribuye al mismo tiempo a la mejora del medio

ambiente (Mobin y Alam, 2014). Es decir, gracias a los resultados de esta investigación, permitirán establecer nuevos sistemas de producción que generarán más y diversos puestos de trabajo en todos los niveles de la cadena productiva y de comercialización de productos derivados de las microalgas oleaginosas amazónicas. Esto se expresará en mejoras significativas de los niveles socioeconómicos y por ende en la calidad de vida de los pobladores a nivel local, regional y nacional.

1.2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En la amazonia se presenta una gran biodiversidad y complejidad de organismos responsables de la producción primaria en los ecosistemas acuáticos, tales como las microalgas (Aprile y Mera, 2007). Estos microorganismos son responsables del 60% al 87% de la producción primaria en ríos, lagos y mares (Lusser, 2014), consecuentemente producen hasta el 50% del oxígeno y fijan hasta el 50% del CO₂. Además, por su capacidad de sintetizar carbohidratos, proteínas y lípidos son considerados como fuente de alimentos para el hombre y los animales. También, sobresalen por producir lípidos, por lo que son considerados como una excelente alternativa para la producción sustentable de biocombustibles (Garibay *et al.*, 2009; Okolodkov y Blanco, 2011; Ruíz, 2011).

Es necesario evaluar nuevas alternativas para la producción sustentable de biocombustibles. Porque, actualmente el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero, la disminución de los combustibles fósiles, la inseguridad energética, la creciente demanda de combustibles fósiles en el transporte y el calentamiento global son problemas que requieren soluciones a mediano y largo plazo. Por tanto, debido a la virtud de las microalgas de producir lípidos apropiados para la producción de biodiesel, existe interés en desarrollar alternativas de biocombustibles renovables y sostenibles en el tiempo en base a los lípidos microalgales (Fernández *et al.*, 2012; Mobin y Alam, 2014). Además, el biocombustible que se obtiene por

transesterificación de los lípidos microalgales con metanol son los substitutos potenciales para diésel derivado del petróleo. Comparado con diésel convencional, el biodiesel tiene las ventajas de ser biodegradable, renovable, no tóxico y generar bajas emisiones de SOx contaminante (Arévalo, 2008).

Sin embargo, la producción sustentable de biodiesel a partir de microalgas se ha visto obstaculizada por presentar varias limitaciones. Por ejemplo, los escasos conocimientos y tecnologías relacionadas a la producción industrial de este recurso (Mobin y Alam, 2014), sumándose a las grandes demandas existentes en el mercado mundial, la inviabilidad económica y la extracción específica de triglicéridos, asociados a la eliminación de agua en el proceso, lo que hace que no sea comerciable en escalas mayores (Ladero y Calvo, 2013). Por ello, se han iniciado estudios para identificar grupos de microalgas oleaginosas de agua marina (Ferreira, 2013, Fernández *et al.*, 2012) y agua dulce (Cobos *et al.*, 2014; Paredes, 2014) caracterizadas por almacenar altas concentraciones de lípidos y por ende sean ideales para la viabilidad económica de estos sistemas de producción (Mobin y Alam, 2014),

Investigaciones recientes con microalgas oleaginosas de agua dulce, particularmente de la amazonia peruana se han identificado algunas especies promisorias. Así, de un total de 24 especies microalgales aisladas de las cuencas del Amazonas, Itaya y Nanay, el 50% fueron oleaginosas, es decir contenían más del 20% de lípidos totales. Además, de este grupo de microalgas oleaginosas, las especies *Ankistrodesmus* sp. *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., sobresalieron por contener más del 50% de lípidos en su biomasa seca (Cobos *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta el momento desconocemos los genes involucrados en el metabolismo de lípidos de estas especies. La identificación de estos genes nos permitirá tener un mejor panorama de la producción de lípidos microalgales (Guarnieri *et al.*, 2011). Debido a estos vacíos en el conocimiento, se hace necesario ampliar los

conocimientos genético moleculares de la producción de lípidos en estas microalgas amazónicas, para ello, formulamos la siguiente pregunta de investigación: **¿Es posible elaborar un catálogo de genes de *Ankistrodesmus* sp. *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. involucrados en el metabolismo de lípidos promisorios para la producción sustentable de biodiesel?**

1.3. OBJETIVOS

1.3.1.General

Elaborar un catalogo de genes del metabolismo de lípidos de las especies microalgales *Ankistrodesmus* sp. *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. promisorias para la producción sustentable de biodiesel.

1.3.2.Específicos

- Determinar el contenido de lípidos totales de *Ankystrodermus* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chllorela* sp. cultivados en medio CHU con y sin nitrógeno
- Purificar el ARN total y ARNm de *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chllorela* sp. cultivados en medio CHU con y sin nitrógeno.
- Identificar genes que codifican los enzimas del metabolismo de lípidos en *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chllorela* sp

CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 ANTECEDENTES

Investigaciones recientes analizaron los transcriptomas de microalgas mediante la identificación y secuenciamiento *de novo* del transcriptoma de *Dunaliella tertiolecta*, describiendo los genes y la vía de producción de lípidos para la generación de biocombustible (Khozin y Cohen, 2011). Además, se estudiaron las vías biosintéticas de triacilglicerol mediante el análisis del transcriptoma y proteoma de *Chlorella19 vulgaris* bajo condiciones de acumulación de triacilglicerol demostrando la utilidad de este tipo de análisis en especies que no disponen de genomas secuenciados (Guarnieri *et al.*, 2011).

Los estudios en la especie *Chlamydomonas reinhardtii* permitieron identificar a la proteína comprometida en la hidrólisis de triacilglicerol 7 (CHT7), que actúa como un represor de la quiescencia celular, el mecanismo es la base fundamental y clave en la relación inversa, entre la producción de biomasa y almacenamiento de compuestos lipídicos por la falta de nutrientes. Sin embargo, uno de los mutantes de la misma especie descritos y el CHT7, que compromete la hidrólisis de triacilglicerol fue afectada en el crecimiento celular, después de la eliminación de las condiciones que inducen la reducción de la quiescencia celular se analizó y observó que contiene una delección que afecta a cuatro genes, por tanto, proporciona una posible diana para la ingeniería de microalgas para obtener una alta producción de biomasa y triacilglicéridos (Tsai *et al.*, 2014).

Además, se indujo a estrés a cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* cultivadas en medio sin nitrógeno, que al entrar en la fase estacionaria las células producen abundantes lípidos. Cuando la biosíntesis del almidón se bloquea en el mutante está el contenido de lípidos aumenta 30 veces, lo que demuestra que la manipulación genética puede mejorar la producción de

lípidos. El contenido lipídico purificado contiene 90% de triacilglicéridos (TAG) y 10% de ácidos grasos libres. El 50% de los ácidos grasos asociados con los TAG son saturados (C16 y C18) y el 50% de los ácidos grasos son insaturados (C18:1) constituidos principalmente por ácido oleico (Wang *et al.*, 2009).

En otros estudios, determinaron cambios en la abundancia de transcritos en *Chlamydomonas reinhardtii* por falta de nitrógeno, para predecir el desvío del metabolismo. Se aplicó con diferentes condiciones de nutrientes, con nitrógeno y sin nitrógeno, esto permitió una comparación estadística de los niveles de expresión sujeta a estas condiciones. La falta de nitrógeno activa un subconjunto de genes que reducen la biosíntesis de proteínas y procesos fotosintéticos; con la excepción del Gen RSP; lo que causa redirección del metabolismo de los ácidos grasos, (Miller *et al.*, 2010).

Asimismo, análisis del transcriptoma de *Chlamydomonas reinhardtii* durante el proceso de la biosíntesis y acumulación de lípidos, utilizando la tecnología de Illumina, muestran que más de 2500 genes están regulados por incremento o durante la acumulación de lípidos, en comparación con el crecimiento en fase logarítmica. Las enzimas para el metabolismo de los lípidos que fueron reguladas durante la acumulación de lípidos fueron: la aciltransferasa del ácido lisofosfatídico (LPAAT), diacilglicerol aciltransferasa (DAGAT). Además, 41 factores de transcripción fueron regulados durante el proceso de acumulación de lípidos (Lv *et al.*, 2013).

También el análisis del transcriptoma de la microalga oleaginosa *Neochloris oleoabundans*, revelaron el metabolismo de la acumulación de triacilglicéridos. Después de un crecimiento con nitrógeno y sin nitrógeno, se cuantificaron el contenido celular de principales biomoléculas incluyendo lípidos totales, triacilglicéridos, almidón, proteínas y clorofila. Los genes fueron secuenciados, el transcriptoma se ensambló y la expresión de los genes importantes se cuantificó. Los resultados de expresión bajo la

condición de ausencia de nitrógeno y la producción de triacilglicéridos se multiplicaron por cinco en comparación al cultivo con nitrógeno. Además, se ha observado la sobreexpresión de los genes de la vía de síntesis de ácidos grasos, mostrando una complejidad de interacción de vías asociadas a la producción de triacilglicerol (Rismani *et al.*, 2012).

Adicionalmente, estudios sobre el metabolismo de los lípidos en *Monoraphidium neglectum* y su secuencia del genoma revela características adecuadas para la producción de biocombustibles. El genoma de *M. neglectum*, así como la reconstrucción metabólica de vías de lípidos, proporciona nuevos conocimientos sobre la diversidad del metabolismo de los lípidos. Pues, produce lípidos neutros de aproximadamente 21% (peso seco), presenta ácidos grasos de cadena C18 : 1 y C16: 0.; lo que provee datos para aplicaciones biotecnológicas y producción de biodiesel (Bogen *et al.*, 2013).

También determinaron los genes de *Chlorella pyrenoidosa*, microalga oleaginosa que responden a la biosíntesis y acumulación de lípidos en respuesta a tres factores estresantes de nutrición. Los lípidos totales y el contenido de lípidos neutros muestran el incremento muy marcado al estrés fisiológico mediante el agotamiento de nutrientes. El curso de transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de lípidos mostró diversas dinámicas de expresión que contribuyen a los diferentes fenotipos lipídicos. La correlación entre el contenido de lípidos y el nivel de expresión de genes, meg 6562 (enzimas málicas), ACCA (acetil-CoA carboxilasa α carboxiltransferasa), ACCD (acetil-CoA carboxilasa β carboxil transferasa), g2354 DGAT, g3280 DGAT y g7063 DGAT (genes de la diacilglicerol aciltransferasa), que codifican enzimas o subunidades de correspondiente enzima málica, ACCasa y diacilglicerol aciltransferasa en la biosíntesis *de novo* de triacilglicerol, están muy relacionadas con la acumulación de lípidos que podrían ser explotados como genes diana para la modificación genética (Fan *et al.*, 2014).

También se analizaron y compararon los transcriptomas de cuatro algas Prymnesiophyte (*Parvum Prymnesium*, *Chrysochromulina brevifilum*, *Chrysochromulina Ericina* y *Phaeocystis antártida*), lo que proporcionan una alternativa rentable para examinar el potencial genético y las respuestas fisiológicas de los eucariotas microbianas a los estímulos ambientales. Los resultados revelaron que los cuatro transcriptomas poseen un conjunto de genes esenciales que son similares en número y son compartidos en los cuatro organismos (Koid *et al.*, 2014). El estudio del transcriptoma proporciona la base de la genética molecular y la genómica funcional que servirán para dirigir esfuerzos de la ingeniería metabólica que buscan mejorar la cantidad y calidad de lípidos de microalgas y producir biocombustibles (Rismani *et al.*, 2011).

2.1.2 BASES TEÓRICAS

a) Generalidades de las microalgas

El término microalga incluye aquellos microorganismos unicelulares capaces de llevar a cabo la fotosíntesis. En esta categoría quedan agrupadas las cianobacterias o algas verdeazuladas junto con algas eucariotas como algas verdes, algas rojas y algas doradas, entre otras (Ruíz, 2011). La vasta diversidad de dimensiones del plancton (oscilan de 0,2 a 2,0 μm de diámetro), la ecología y los hábitats colonizados, la estructura celular, los niveles de organización y la morfología, los pigmentos para la fotosíntesis, la reserva y los polisacáridos estructurales, el tipo de historia de vida refleja diversos orígenes evolutivos de este conjunto heterogéneo de organismos, tanto procariontas como eucariotas (Salazar, 2012).

Estos microorganismos están distribuidos por todo el planeta, se encuentran en zonas costeras alrededor de los continentes e islas y el mar abierto, también en aguas salobres, continentales o aguas dulces, desde los ambientes fríos hasta los ambientes tropicales, por ello, son llamados cosmopolitas. Además, su importancia ecológica radica en que son

responsables de la productividad primaria de los cuerpos de aguas y la mayor generación del oxígeno en el planeta (Okolodkov y Blanco, 2011). El número estimado de especies microalgales son aproximadamente de 30,000 distribuidos en seis grupos característicos; 1) *Cyanophyta*, conocidas como algas verde azuladas, son organismos procariotas; 2) *Chlorophyta*, conocidas como algas verdes, presentan cloroplastos definidos, y formas celulares diferentes; 3) *Cryptophyta*, unicelulares y flageladas, de forma generalmente aplanada con dos flagelos casi iguales, plastos de color marrón excepcionalmente verdes, amarillos o verde azules; 4) *Chrysophyta*, unicelulares o coloniales, raramente filamentosos, de formas diversas con impregnaciones de sílice que forman valvas a modo de caja con ornamentaciones características, los plastos a menudo de color verde, marrón o amarillo; debido a ello el nombre de algas doradas; 5) *Pyrrophyta*, son móviles con hendidura ecuatorial transversales o longitudinales donde se insertan dos flagelos, aunque también hay especies cocoides inmóviles; 6) *Euglenophyta*, son unicelulares, solitarias, desnudas o con escamas (loricadas), que nadan libremente, provistas de 1, 2, 3 ó 7 flagelos dispuestos de forma variada (Garibay *et al.*, 2009; Paredes, 2014). Siendo responsables de la productividad primaria, inician la cadena alimenticia en los cuerpos de agua (Echenique *et al.*, 2013). Su capacidad fotosintética hace que utilicen luz y CO₂ como fuente de carbono para el incremento de su biomasa, éste mecanismo es similar al de las plantas superiores (Lusser, 2014). Además, son organismos con mayor crecimiento en la tierra, cien veces más rápido que los árboles y pueden crecer en distintos ambientes con valores variables de pH y temperatura (AST ingenieros, 2013). Estudios realizados en la amazonía colombiana por Echenique *et al.* (2013), registraron 51 taxones que pertenecen a las familias *Coelastraceae*, *Chlorococcaceae*, *Radiococcaceae*, *Palmellaceae*, *Oocystaceae*, *Characiaceae*, *Treubariaceae*, *Botryococcaceae*, *Micractiniaceae* e *Hydrodictyaceae*. En la Figura 1 se muestran algunas especies representativas.

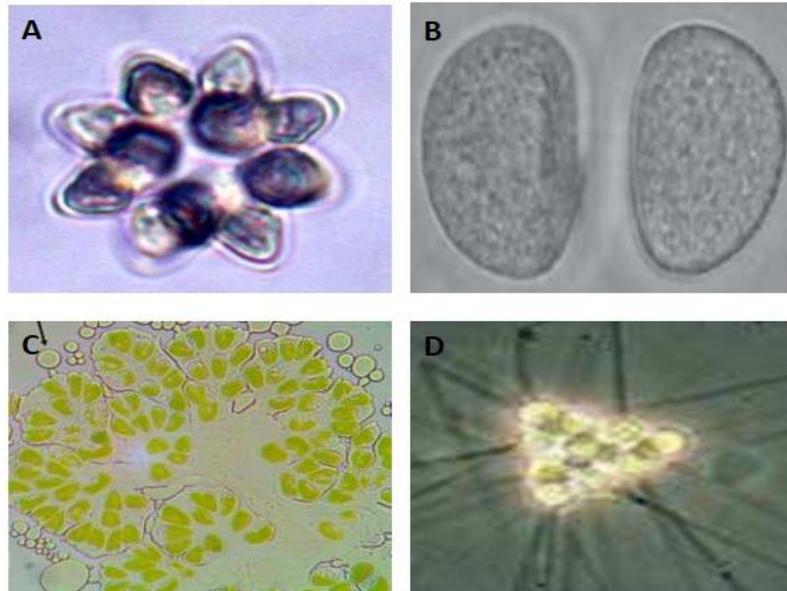


Figura 1. Algunas especies de microalgas de agua dulce. A: *Coelastrum astroideu*, B: *Oocystella solitaria*, C: *Micractinium bornhemiense*, D: *Botryococcus braunii*. Fuente: Echenique *et al.*

Asimismo, estudios de bioprospección de microalgas oleaginosas realizadas por Cobos *et al.*, (2014) en el Río Itaya han encontrado 24 especies, de estas el 50% fueron oleaginosas, siendo las especies más representativas *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. (Figura 2).

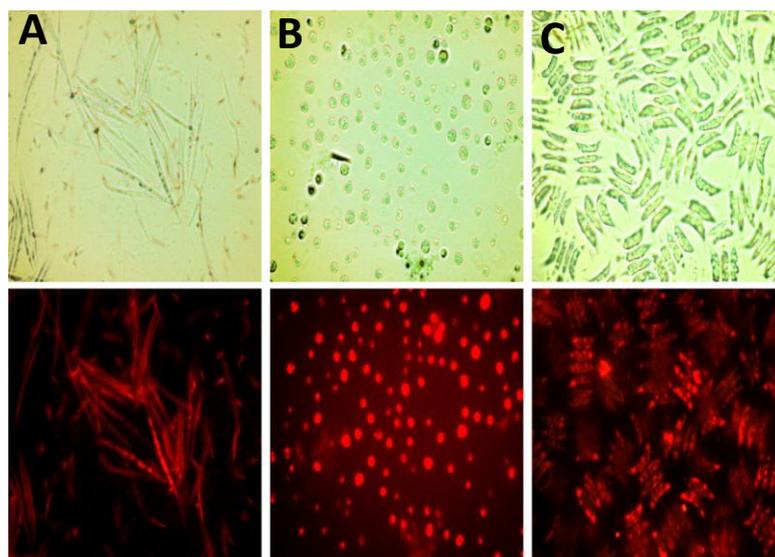


Figura 2. Especies de microalgas representativas encontradas en el Río Itaya. A: *Ankistrodesmus* sp. B: *Chlorella* sp. C: *Scenedesmus* sp. Fuente: Cobos *et. al.*

b) Factores fisicoquímicos y crecimiento de las microalgas

Para determinar el comportamiento de la fisiología celular en relación a su crecimiento, desarrollo y reproducción de las microalgas, se desarrollaron estudios en los que se observó el crecimiento exponencial del número de células del primer al sexto día, con aproximadamente 144×10^4 cel/ml, luego le sigue un decrecimiento de 90×10^4 cel/ml. Posteriormente, las algas tienden de nuevo a incrementar su crecimiento al octavo día, y a los once días llegan a un máximo de 135×10^4 cel/ml a los 17 días; Los análisis mostraron que las formas de nitrógeno (N_2 , NO_2 , NO_3 y NH_4^+), el fósforo, azufre, potasio, entre otros minerales tienen gran influencia en las características reproductivas y de desarrollo de las microalgas (Aprile y Mera, 2007; Ferreira, 2013; Paredes, 2014).

En condiciones limitadas de nitrógeno, se manifiesta cambios fisiológicos en las microalgas, pues, disminuyen su actividad reproductiva y fotosintética, aumentando aún más su capacidad de producción de lípidos (Miller *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2010; Fan *et al.* 2014). La privación de azufre, es también condicionante para estos microorganismos, origina un estrés oxidativo que podría ocasionar cambios masivos induciendo a la producción de lípidos e incluso la muerte (Gonzales *et al.*, 2010).

Las microalgas oleaginosas de la especie *Ankistrodesmus falcatus* responden a los cambios en la variación de NaCl, estos cambios son considerables en el crecimiento, así como en el incremento de la producción de constituyentes lipídicos, el máximo nivel de producción lipídica se alcanzó a 0,17 M de NaCl. Sin embargo, el contenido de proteínas y carbohidratos, se incrementa a 0,34 M NaCl, pero hubo una disminución de la clorofila con el aumento de NaCl. Los cambios indican una gran adaptabilidad del organismo a altos niveles de salinidad (Kalita *et al.*, 2011; Bogen *et al.*, 2013). Todos los cambios podrían ser reversibles si se restablecen las

condiciones adecuadas de salinidad y nutrientes, estas vuelven a sus actividades fisiológicas normales (Tsai *et al.*, 2010).

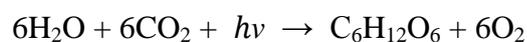
Además, al estudiar la acumulación de lípidos y almidón seis cepas de *Chlorella* bajo condiciones comparativas de intensidad de luz y su relación con niveles de nutrientes; lo que se observó fue que a mayor intensidad de luz favorece la productividad (fotones de $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) en condiciones de luz continua que en condición de Luz-oscuridad, las microalgas mostraron sobre productividad de lípidos y almidón, más aún si se limitan los nutrientes N, P y S (Takeshita *et al.*, 2014; Ho *et al.*, 2014). En otro estudio relacionado a la tasa de crecimiento y el incremento de la biomasa y el contenido de lípidos totales, se observó mayor crecimiento de *Scenedesmus sp.* ($0,55 \text{ dia}^{-1}$) al ser cultivada con intensidad luminosa de $73 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, siendo estadísticamente significativa en comparación con *chlorella sp.* Además, *Scenedesmus sp.* mostró un gran incremento de su biomasa $175,40 \text{ mg/L}$ y elevada producción del contenido de lípidos totales de 22% (Vásquez *et al.*, 2015). De modo que, todo esto sugiere que los nutrientes, concentraciones salinas, temperatura, la disponibilidad de luz, son factores determinantes en la productividad. Es importante mencionar que los medios de cultivo utilizados para realizar estos experimentos fueron los medios NPK (20-5-20) y CHU-10, lo que muestran ser alternativas para cultivos en masa a bajos costos (Sipaúba y Pereira, 2008; Cobos *et al.*, 2014).

c) Fotosíntesis y metabolismo de lípidos por microalgas

La fotosíntesis es el proceso que mantiene la vida en el planeta y es una característica fundamental de las algas ya que la tasa de conversión es de 1 a 4% superior a las plantas que es 1%, por ello, las microalgas se muestran como elemento amortiguador en la acumulación del CO_2 atmosférico. Además, gracias a este proceso y a la energía solar, se introducen minerales y nutrientes generando materia orgánica que será consumida por organismos heterótrofos en los ambientes acuáticos (Ruíz, 2011; Salazar, 2012; AST ingeniería S.L., 2013).

En la célula microalgal la fotosíntesis se realiza en el cloroplasto, estos orgánulos citoplasmáticos de color verde presenta dos zonas; 1) el estroma, donde ocurre la fase oscura y 2) la membrana del tilacoide donde ocurre la fase luminosa. El proceso fotosintético inicia cuando los fotones excitan a la clorofila que actúa directamente en la transformación de la energía luminosa a energía química, la clorofila está ubicada en el complejo del fotosistema II, que a vez está adherida a la membrana del tilacoide, el fotosistema II es capaz de extraer los electrones del agua y eliminar el O₂ como subproducto, en esta fase luminosa estos electrones se transportan para promover la reducción del NADP⁺ a NADPH. Dentro del lumen del tilacoide se produce una gradiente electroquímica, debido a la liberación de protones originada por la oxidación del agua por el fotosistema II, el cual se emplea para formar ATP mediante la enzima ATP sintasa.

Los productos de la fase luminosa ATP y NADPH son sustratos en la fase oscura, donde la enzima Rubisco cataliza la conversión de CO₂ y ribulosa-5-fosfato en dos triosas, que mediante la hidrólisis del ATP y la oxidación del NADPH se convierten a dos triosas de gliceraldehido 3 fosfatos y formar glucosa. (Fernández *et al.*, 2012; Ruíz, 2011), la estequiometria del proceso fotosintético es como sigue:



El proceso fotosintético se encuentra acoplado al proceso de la producción de los lípidos por la necesidad natural de las microalgas (Figura 3), pues los productos fotosintéticos de triosas mediante catálisis enzimática se convierten en piruvato y acetil-coA (Fernández *et al.*, 2012).

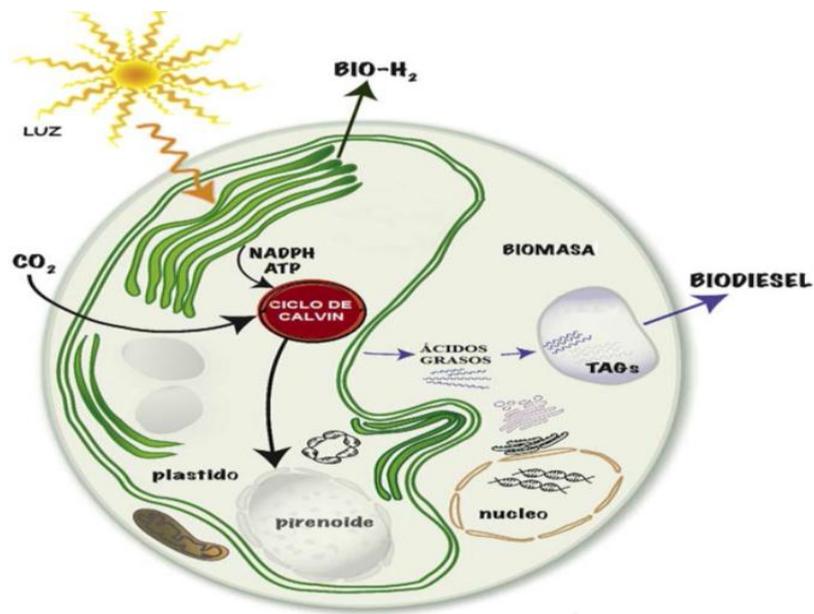


Figura 3. Interacción del proceso fotosintético con la producción de lípidos en microalgas. Fuente: Fernández *et al.* (2012).

El cloroplasto aporta metabolitos para la síntesis de *novo* de ácidos grasos, desde el 3 fosfoglicerato hasta el piruvato catalizado por dos enzimas: fosfogliceromutasa y enolasa; el piruvato es el paso inicial en el cual ocurre una deshidrogenación del piruvato para convertirse en acetil-CoA y la carboxilación de acetil-CoA dependiente de ATP para su conversión en malonil-coA. Esta reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa y es considerada el paso limitante del proceso, ya que compromete el flujo de acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos, donde las unidades de acetil-CoA que probablemente derivan del piruvato proveniente del Ciclo de Calvin y glucólisis. La reacción anterior es seguida por ciclos de adición descarboxilativa de malonil-CoA a unidades acilo y β -reducción, catalizados por el sistema ácido graso sintetasa, hasta producir moléculas de 16C y 18C saturadas. Los ácidos palmítico (16:0) y oleico (18:1 ω 9) son los precursores de las moléculas poliinsaturadas, a su vez producidas mediante mecanismos de saturación aerobia y elongación.

La biosíntesis de triacilglicéridos sucede en el citosol y en el retículo endoplásmico esencialmente a través de la catálisis por acil-transferasas del traslado secuencial de ácidos grasos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde antes de la última transferencia, se requiere de la defosforilación del ácido fosfatídico previamente formado. En la figura 4, se presenta un esquema que describe en términos generales la biosíntesis de lípidos microalgales, importantes en la producción de biodiesel (Garibay *et al.*, 2009; Rismani *et al.* 2011; Fernández *et al.*, 2012).

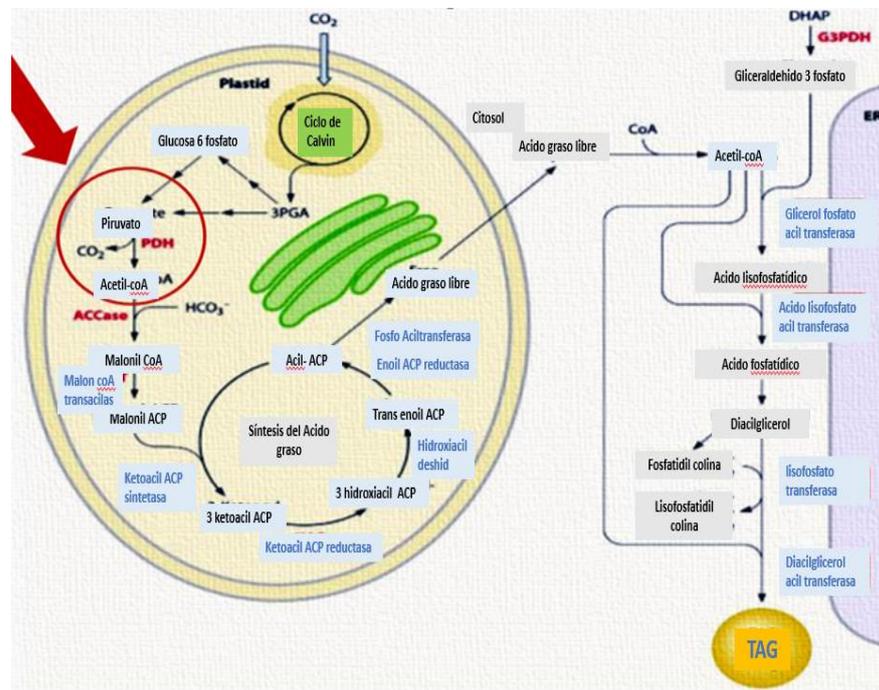


Figura 4. Panorama general de la biosíntesis de lípidos y Triacilglicéridos en microalgas oleaginosas Fuente: Lv *et al.* (2013).

Sin embargo, por la necesidad y los requerimientos energéticos, en ausencia de energía sobre todo en las noches obligan a las microalgas a consumir sus productos de síntesis, perdiendo el 25% de su biomasa ganada (AST ingeniería S.L., 2013). Mediante la degradación de los lípidos y triacilglicéridos que genera de nuevo acetil-CoA, para mantener activo los procesos vitales como: reproducción, desplazamiento y el metabolismo. De

acuerdo con Fernández *et al.* (2012), ésto ocurre de la siguiente manera; la deshidrogenación ligada a FAD catalizada por la enzima acil-CoA deshidrogenasa que introduce un doble enlace entre los carbonos α y β del ácido graso; también la adición de agua que forma doble enlace, que cataliza la enoil-CoA hidratasa, deshidrogenación ligada a NAD^+ y por la β -hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa que origina β -Acil-CoA acetiltransferasa. Este intermediario metabólico es convertido a un ácido graso con dos átomos de carbono menos por incorporación de CoA-SH y generación de Acetil-CoA por acción de la enzima β -cetoliasa (Figura 5).

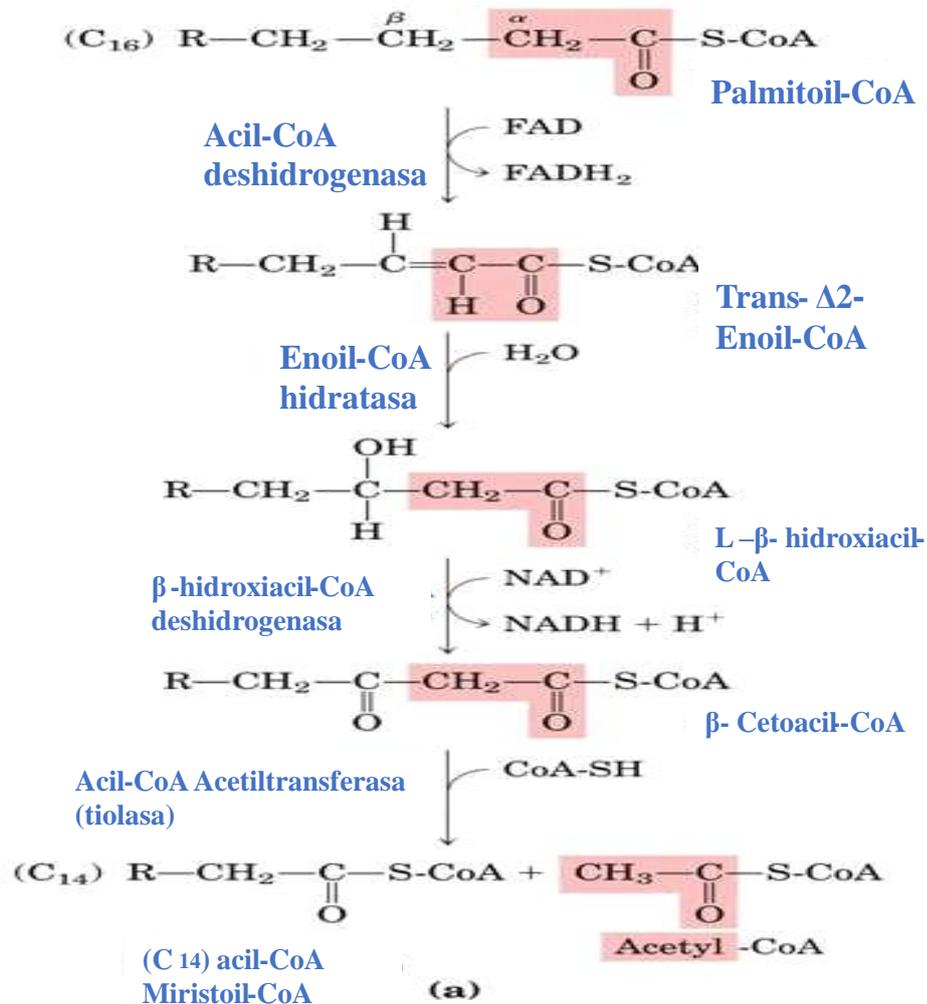


Figura 5. Catabolismo de grasas o beta oxidación que ocurre en el citosol.
Fuente: Fernández et al (2012)

Al igual que los ácidos grasos, en la Figura 6 se observa cómo las moléculas de triacilgliceroles son catabolizadas (Lv *et al.*, 2013).

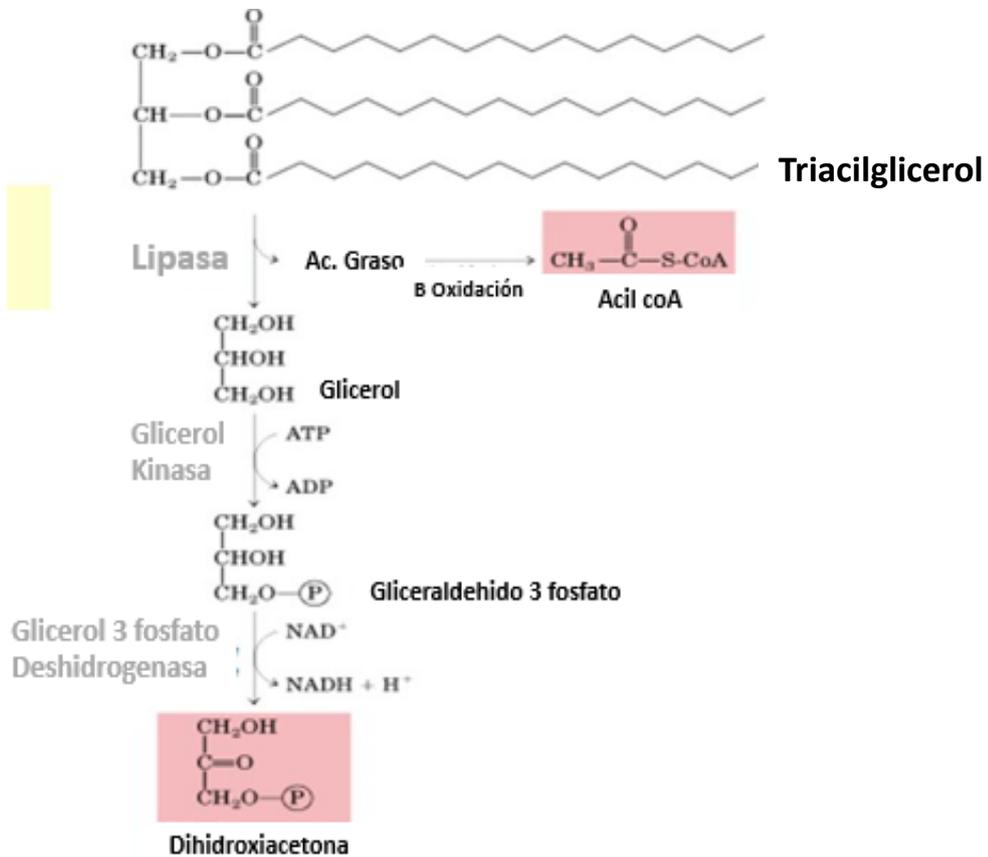


Figura 6. Catabolismo de triacilgliceroles. Fuente: Lv *et al.* (2013)

La composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas, donde la posición y el número de enlaces dobles (1 a 6) es variable, siendo por lo general *cis* la configuración de éstos. Los ácidos grasos de 16C a 18C son los más frecuentes, no obstante moléculas de cadena media (10C, 12C, 14C) o demasiado larga (> 20C) predominan en algunas especies. Por lo general, en las microalgas dulceacuícolas prevalecen los ácidos grasos saturados y mono-insaturados, observándose en menor proporción compuestos poli-insaturados esto es lo que hace que las

microalgas sean atractivos para la producción de biodiesel (Garibay *et al.*, 2009; Ruíz 2011). Además, al estudiar la elevada productividad de lípidos de una microalga termotolerante *Desmodesmus sp.* F2, mediante la optimización de los factores ambientales y de nutrientes, (intensidad de luz: 700 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$; temperatura: 35 °C; nitrógeno: 6,6 mM, dióxido de carbono: 2,5 %) se logró una alta productividad de lípidos de 113 mg/L/d y se incrementó aún más a 263 mg/L/d en estas condiciones. La composición de ácidos grasos de C16 y C18 representaron el 95 %. Así mismo, los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados representaron el 38,9%, 33,1 % y 22,6 %, respectivamente. Esta calidad de lípidos hace que sea considerado materia prima ideal para biodiesel (Ho *et al.*, 2014)

d) Microalgas y su importancia en la producción de Biodiesel

Debido al aumento del precio del petróleo, el creciente parque automotor en el mundo y el amplio uso de combustibles fósiles en las diferentes actividades del que hacer en nuestra sociedad, los científicos están buscando nuevas alternativas energéticas (D'Elia *et al.*, 2010; Mobin y Alam, 2014). Las microalgas oleaginosas representan una buena alternativa. Debido a esto, han sido ampliamente estudiadas en el mundo, presentando las siguientes características: 1) pueden crecer y desarrollarse a ritmos elevados en cualquier ambiente acuático (aguas marinas, aguas residuales, aguas poluidas, etc), 2) pueden crecer y ser cultivadas en ambientes muy pequeños o grandes extensiones de terreno, de modo que las microalgas producen menos impactos ambientales (Fernández *et al.*, 2012; Nalley, 2014). Además, los triacilgliceroles microalgales producidos pueden ser convertidos a biodiesel fácilmente mediante esterificación (Figura 7).

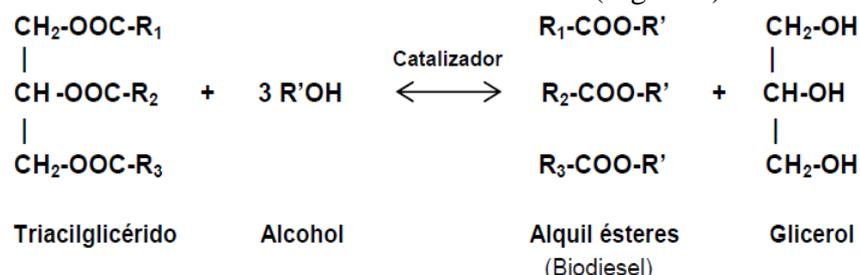


Figura 7. Esterificación de los triacilgliceroles producidos por las microalgas oleaginosas para la producción de biodiesel.

Fuente: Fernández *et al.* (2012)

Sin embargo, es importante evaluar distintos métodos de extracción de lípidos y reacciones de esterificación, a fin de seleccionar los más eficientes, económicamente viables y de menor impacto ambiental (Salazar, 2012).

Además, la producción de lípidos microalgales ocurre todo el año de manera continua, permitiendo ser atractiva y una alternativa potencial de energía renovable en la elaboración de biodisel (Ladero y Calvo, 2013). El biocombustible elaborado a partir de microalgas produce menos impacto en el ambiente por ser biodegradable. Siendo las microalgas la materia prima muy eficaz para la producción de biocombustible; también se estudia el proceso de biosíntesis metabólica de los lípidos, para mejorar su capacidad de producción mediante manipulación con una perspectiva de producción a gran escala (Fernández *et al.*, 2012; Ferreira, 2013),

También, se ha encontrado que algunas especies de la amazonia peruana presentan elevado contenido de lípidos, entre estas destacan *Ankistrodesmus* sp. *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. (Cobos *et al.*, 2014) por contener hasta más del 50% del peso seco. Debido a las altas tasas de crecimiento y contenido de lípidos, se estima que se pueden producir entre 58700 y 136,9 L/ ha al año, lo que abre una gran perspectiva para el desarrollo (Figura 8) de este tipo de combustible sin tener impactos negativos sobre la naturaleza. De modo que cultivar microalgas, con el fin de producción de biocombustible en la amazonía sería importante en estos tiempos de desequilibrio ambiental (Garibay *et al.*, 2009; D'Elia *et al.*, 2010; Torres y Trujillo, 2013).



Figura 8. Impactos positivos que origina la producción de biodiesel en el ambiente. Fuente: Fernández *et al.* (2012)

2.1.3 MARCO CONCEPTUAL

Ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos de cadena larga. Por lo general, contienen un número par de átomos de carbono, normalmente entre 12 y 24. Ello se debe a que su síntesis biológica tiene lugar mediante la aposición sucesiva de unidades de dos átomos de carbono. Sin embargo también existen ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono, que probablemente derivan de la metilación de un ácido graso de cadena par. (Gonzales, J., 201)

ADN

El ácido desoxirribonucleico, frecuentemente abreviado como ADN (y también DNA, del inglés deoxyribonucleic acid), es un tipo de ácido nucleico, una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria. Desde el punto de vista químico, el ADN es un polímero de nucleótidos, es decir, un polinucleótido. Un polímero es un compuesto formado por muchas unidades simples conectadas entre sí, como

si fuera un largo tren formado por vagones. En el ADN, cada vagón es un nucleótido, y cada nucleótido, a su vez, está formado por un azúcar (la desoxirribosa), una base nitrogenada (que puede ser adenina→A, timina→T, citosina→C o guanina→G) y un grupo fosfato que actúa como enganche de cada vagón con el siguiente. Lo que distingue a un vagón (nucleótido) de otro es, entonces, la base nitrogenada, y por ello la secuencia del ADN se especifica nombrando sólo la secuencia de sus bases. La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena (el ordenamiento de los cuatro tipos de vagones a lo largo de todo el tren) es la que codifica la información genética: por ejemplo, una secuencia de ADN puede ser ATGCTAGATCGC... En los organismos vivos, el ADN se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en la que las dos hebras están unidas entre sí por unas conexiones denominadas puentes de hidrógeno. (Equipos y laboratorio de Colombia, 2017)

ARN

El ARN (ácido ribonucleico) es un ácido nucleico de cadena sencilla compuesto por los nucleótidos Adenina (A), Uracilo (U), Guanina (G) y Citosina (C). En las células sirve como intermediario de la información genética ya que copia ésta del ADN y en el citoplasma dirige la síntesis de proteínas según su secuencia de nucleótidos. Además de este ARNm o mensajero otros tipos incluyen el ARNt o de transferencia encargado de dirigir a cada aminoácido a su lugar cuando es requerido en la síntesis proteica y el ARN r o ribosómico, que formando parte del ribosoma es esencial en la actividad enzimática de éste para generar enlaces peptídicos entre aminoácidos adyacentes en el proceso de síntesis de proteínas. (FIBAO, 2017)

Biodiesel

Es un combustible de origen vegetal que puede reemplazar al gasoil mineral.

La ASTM (American Society for Testing and Materials) define el Biodiesel como “el éster monoalquílico de cadena larga de ácidos grasos derivados de recursos renovables, como por ejemplo aceites vegetales o grasas animales, para utilizarlos en motores Diesel”. Se presenta en estado líquido y se obtiene a partir de recursos renovables como aceites vegetales de soja, colza/canola, girasol, palma y otros, como así también de grasas animales, a través de un proceso denominado Transesterificación. (Nextfuel Argentina, 2017)

Biomasa microalgal

Materia total de los seres que viven en un lugar determinado, expresada en peso por unidad de área o de volumen. La biomasa de las algas contienen tres componentes principales: proteínas, cuyo % sobre el peso seco varía entre 46-63%, carbohidratos, con entre 10 y 17% (hasta 32% en *Dunaliella salina*) y los lípidos con porcentajes que varían de 4 a 61%. En medida menor (+-6%) se encuentran los ácidos nucleicos. De todas ellas, las biomoléculas de mayor interés en el proceso de obtención de biocombustibles. (Rodríguez, P.; Sánchez, Y.; Zumalacárregui, M.; Pérez, O., Hernández, A; Echeveste, P. y Lombardi, A., 2014).

Cianobacterias

Son una división del reino Monera que comprende las bacterias capaces de realizar fotosíntesis oxigénica y, en algún sentido, a sus descendientes por endosimbiosis, los plastos. Son los únicos procariotas que llevan a cabo ese tipo de fotosíntesis, por ello también se les denomina oxifotobacterias (Oxyphotobacteria). Pueden encontrarse tanto en el agua como en la tierra, pueden vivir también en zonas de altas temperaturas y bajas. Pueden dar lugar a estructuras calcáreas e incluso vivir en aguas residuales. (EcuRed, 2017)

Cosmopolitas

La expresión "distribución cosmopolita" se aplica a los organismos que pueden hallarse en cualquier región del mundo, pero solo en condiciones propicias para su habitación, sin que implique que ocupe todos y cada uno de los rincones de estas regiones. (Fotografía y biodiversidad, 2017)

Cyanophyta

Son organismos procariotas (dominio Bacteria) y al igual que otras bacterias tienen células poco complejas, carentes de orgánulos delimitados por membranas. Es decir no presentan núcleo, ni mitocondrias, ni cloroplastos, etc. (Cubas, P., 2008)

Chlorophyta

Se considera que son algas verdes, que contienen clorofilas a, b que no suelen estar enmascaradas por los pigmentos supernumerarios. El hidrato de carbono que asimilan es típicamente el almidón. Tanto los pigmentos como los asimilados son muy similares a los de las plantas superiores. Se subdividen en tres clases: clase clorofíceas, prasinofíceas y zigofíceas. La división contiene tanto especies unicelulares como pluricelulares. Si bien la mayoría de las especies viven en hábitats de agua dulce y un gran número en hábitats marinos, otras especies se adaptan a una amplia gama de entornos. Por ejemplo, *Chlamydomonas nivalis* (sandía de la nieve), de la clase Chlorophyceae, habita en verano los ventisqueros alpinos. Otras especies se fijan a las rocas o partes leñosas de los árboles. Algunos líquenes son relaciones simbióticas entre un hongo y un alga verde. Algunos miembros de Chlorophyta también establecen relaciones simbióticas con protistas, esponjas y cnidarios. Algunas especies son flageladas y tienen la ventaja de la motilidad. (EcuRed, 2017)

Cloroplastos

Los cloroplastos son los plastos de mayor importancia biológica; ya que por medio de la fotosíntesis, en ellos se transforma la energía lumínica en energía química, que puede ser aprovechada por los vegetales, fueron

identificados como los orgánulos encargados de la fotosíntesis, en ellos se transforma la energía lumínica en energía química, que puede ser aprovechada por los vegetales. (Biología, 2017)

Fotosíntesis

Es un proceso que transforma la energía de la luz del sol en energía química. Consiste básicamente, en la elaboración de azúcares a partir del CO₂ (dióxido de carbono), minerales y agua con la ayuda de la luz solar. (Botanical online, 2017)

Genes

Los genes en eucariotas, son unidades dispersas en la molécula de ADN cuyos productos dirigen todas las actividades metabólicas de las células. Estos genes están organizados en cromosomas, estructuras que sirven de vehículo para la transmisión de la información genética. La información genética almacenada en el ADN y transferida al ARN durante el proceso de transcripción se presenta como un código de tres letras que dirigen la especificidad de los 20 aminoácidos y las señales de iniciación y terminación de la síntesis proteica. La síntesis se basa en ADN transcripción (de un gen activo) ARN, que luego se traduce a proteína. (Llambí, S., 2001)

Genoma

Se denomina Genoma de una especie al conjunto de la información genética, codificada en una o varias moléculas de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) (en muy pocas especies ARN), donde están almacenadas las claves para la diferenciación de las células que forman los diferentes tejidos y órganos de un individuo. Por medio de la reproducción sexual de los individuos esa información es permanentemente reordenada y transmitida a los descendientes, constituyendo una población dinámica. El conjunto de esa información codificada es el Genoma, y el de las características morfológicas y funcionales resultantes de la "expresión" de dicha

información caracteriza a cada especie de los seres vivos. (Clemente estable, 2017)

Ingeniería metabólica

Manipulación de los procesos metabólicos mediante tecnología recombinante con el objetivo de mejorar las propiedades de los microorganismos. Asimismo, es la alteración racional y dirigida de las rutas metabólicas de un organismo para mejor comprender y utilizar las rutas celulares en transformaciones (conversiones), transducción de energía y ensamblaje supramolecular. (Láñez Pareja Enrique, 2017)

Lípidos

Son un grupo de sustancias insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos que incluyen los triglicéridos (comúnmente llamados grasas), fosfolípidos y esteroides. (Carbajal, A., 2012)

Metabolismo

Es la suma de todas las reacciones físicas y químicas que suceden en el interior de las células que permiten realizar todas las funciones primordiales para la vida, como respirar, moverse, crecer, reproducirse, realizar la digestión y reaccionar ante distintos estímulos. (Nachon, H., 2017)

Microalgas oleaginosas

Son aquellas microalgas que contienen ácidos grasos como componentes de su membrana, productos de almacenamiento, metabolitos y fuente de energía. (Gonzales, J., 201)

Nitrógeno

Elemento químico, símbolo N, número atómico 7, peso atómico 14.0067; es un gas en condiciones normales. El nitrógeno molecular es el principal constituyente de la atmósfera (78% por volumen de aire seco). Esta concentración es resultado del balance entre la fijación del nitrógeno

atmosférico por acción bacteriana, eléctrica (relámpagos) y química (industrial) y su liberación a través de la descomposición de materias orgánicas por bacterias o por combustión. En estado combinado, el nitrógeno se presenta en diversas formas. Es constituyente de todas las proteínas (vegetales y animales), así como también de muchos materiales orgánicos. Su principal fuente mineral es el nitrato de sodio.

Gran parte del interés industrial en el nitrógeno se debe a la importancia de los compuestos nitrogenados en la agricultura y en la industria química; de ahí la importancia de los procesos para convertirlo en otros compuestos. El nitrógeno también se usa para llenar los bulbos de las lámparas incandescentes y cuando se requiere una atmósfera relativamente inerte. (Lenntech, 2017)

Secuenciamiento

En términos científicos, la secuenciación es la determinación del orden de los nucleótidos en una molécula de ADN o ARN o del orden de los aminoácidos en una proteína. En concreto, la secuencia del ADN constituye la información genética que se puede heredar y que es la base de los programas de desarrollo de los seres vivos. El hecho de poder determinarla es útil para ciertas aplicaciones como la investigación forense o el estudio de los principales procesos biológicos. Por su parte, la secuenciación del ARN es más fácil de llevarse a cabo que la del ADN, por razones técnicas. En la actualidad se distinguen varios métodos de secuenciación: amplificación clonal in vitro, illumina (Solexa), Ion Torrent semiconductor, secuenciación de alto rendimiento o "next-generation", secuenciación por ligación, o secuenciación paralelizada. (Torres, V., 2017)

Síntesis

La síntesis en la parte de la biología la podemos encontrar como biosíntesis pero también conocida como anabolismo, que es el desarrollo del metabolismo que tiene como consecuencia la síntesis de componentes celulares a partir de los antepasados de baja masa nuclear y la biosíntesis

proteica es el desarrollo anabólico durante el cual se crean las proteínas, esta evolución consta de dos fase, la traducciones del “ARN” mensajero, durante el cual los aminoácidos del polipeptidos son estructurados de una forma determinada a partir de la información obtenida en la consecuencia de nucleótidos del “ADN” y las modificaciones postproducción que sufren los polipeptidos que es el nombre que usan para designar un péptido de tamaño suficientemente grande, como orientación que se puede hablar de más de 10 aminoácidos. Cuando ese poli péptido es muy grande y tiene una estructura tridimensional única y estable, se estaría conversando de una proteína. (Laboratorio Mettler Toledo, 2017)

Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento es la tasa a la que está aumentando (o disminuyendo) una población durante un año determinado a causa de aumentos naturales y migración neta, que se expresa como un porcentaje de la población base. La tasa de crecimiento toma en cuenta todos los componentes de crecimiento de la población: nacimientos, muertes y migración. Nunca debe confundirse con la tasa de natalidad, pero ello sucede algunas veces. (INEGI.ORG, 2017)

Transcriptoma

Es el conjunto de genes que se están expresando en un momento dado en una célula. La expresión de un gen supone que éste ha sido transcrito a ARN mensajero. Células de un mismo organismo y con un mismo genoma pueden llegar a ser tipos celulares muy dispares dependiendo de la combinación de genes que exprese cada una, lo que es lo mismo, dependiendo de su transcriptoma. En un organismo pluricelular el genoma codifica toda la información necesaria para producir los diferentes tipos celulares que componen el organismo adulto. Dependiendo del tipo celular y el estado fisiológico en el que se encuentre la célula encontraremos un patrón de genes activos que difieren según el tipo celular y/o estado fisiológico. (FIBAO, 2017)

Triacilgliceroles

Los triacilgliceroles son acilgliceroles con tres moléculas de ácido graso, en general de cadena larga, que pueden ser iguales o diferentes; se habla de triacilgliceroles simples cuando hay el mismo ácido graso en las tres posiciones del glicerol, pero la mayoría son triacilgliceroles mixtos, con, al menos, dos ácidos grasos diferentes. Las propiedades de los triacilgliceroles van a depender del tipo de ácidos grasos que contengan. (Carrero, I. y Herráez, A., 2017)

2.2. DEFINICIONES OPERACIONALES

Variables	Definición de la variable	Indicadores	Índices
Variable Independiente: Tres especies de microalgas	Son las microalgas <i>Ankistrodermus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp identificadas en la amazonía peruana, que son productoras de lípidos	Contenido de lípidos totales	µg lípidos/mg de biomasa microalgal seca
Variable Dependiente: Catálogo de Genes.	Es el conjunto de genes que intervienen en el metabolismo de lípidos y están presentes en las microalgas de estudio.	Secuencias de genes ensambladas y anotadas	Número de genes identificados

2.3. HIPÓTESIS

La producción de lípidos totales en tres especies de microalgas; *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. se debe a genes del

metabolismo de lípidos. La identificación y elaboración de un catálogo de estos genes nos permitirá establecer en un futuro inmediato programas de ingeniería genética para generar cepas microalgales mejoradas.

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. Método de investigación

Descriptivo: porque se evaluó el contenido de lípidos totales y los genes del metabolismo de los lípidos de *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp.

3.2. Diseño de investigación

Experimental: Porque se cultivó las microalgas bajo dos condiciones: en medio CHU-10 con y sin nitrógeno.

3.3. Población y muestra

La población estuvo conformada por todas las microalgas del Banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú.

La muestra estuvo constituida por las microalgas, *Ankistrodesmus* sp. *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. cultivadas en el laboratorio de bioenergética de la Universidad Científica del Perú.

3.4. Técnicas e instrumentos

Para la recolección de datos se empleó la observación directa y registro de la información de la cantidad de lípidos totales acumulados por las tres especies de microalgas cultivadas en medio CHU-10 con y sin nitrógeno (Barclay et al., 1986). Los instrumentos para la recolección de datos que se utilizaron fueron los siguientes:

- a). Fichas o guías de observación. Se utilizaron para registrar la información obtenida de la cantidad de lípidos microalgales por peso seco de biomasa.
- b) Mediante análisis bioinformáticos se determinaron los genes involucrados en la biosíntesis de triglicéridos en cada una de las microalgas cultivadas en medio CHU-10 con y sin nitrógeno.
- c). Los Equipos que se utilizaron para obtener directamente el registro de datos fueron microcentrifuga universal refrigerada, espectrofotómetro, sistema de electroforesis, y computadoras con programas bioinformáticos.

3.5. Procedimientos de recolección de datos

3.5.1 Cultivo de las microalgas

Se seleccionaron las microalgas *Ankistrodesmus* sp. *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., porque en ensayos previos estas especies tuvieron mayor capacidad de producción de lípidos totales cuando fueron cultivadas bajo estrés fisiológico (Paredes, 2014). Para obtener la biomasa microalgal necesaria para los experimentos se inoculó 1×10^6 de células microalgales en fase de crecimiento exponencial en un erlenmeyer que contenía un litro de medio CHU-10 (Chu, 1942; Richmond y Hu, 2013). Las cepas fueron cultivadas en este medio por cuatro semanas en un agitador orbital a 200 rpm, a 28°C y con una intensidad de luz de $100 \mu\text{mol. fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3.5.2 Cosecha de microalgas

El cultivo microalgal se cosechó mediante centrifugación. Para ello, se distribuyó 200 ml del cultivo en cuatro tubos para centrifuga para 50ml. (Corning®) y centrifugó a $1700 \times g$ a 10°C por 10 minutos. Se

descartó el sobrenadante e inmediatamente se añadió más cultivo en los mismos tubos, se centrifugó bajo las condiciones indicadas. Estos pasos se repitieron hasta obtener toda la biomasa microalgal de 1 litro de cultivo. Luego, el precipitado de microalgas de los 4 tubos fueron transferidas a un solo tubo; el que se centrifugó a 1700xg a 10°C por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado de la microalga se resuspendió con 30ml de agua ultrapura esteril.

3.5.3 Experimentos de inducción de la producción de lípidos

Se inocularon 5 ml de la resuspensión microalgal por triplicado en frascos Erlenmeyer que contenían 150 ml de medio CHU-10 completo (con nitrógeno) y del mismo modo en tres frascos de Erlenmeyer que contienen 150 ml de medio CHU-10 incompleto (sin nitrógeno). Las microalgas fueron cultivadas en estos medios por siete días en agitación permanente (110 rpm), a 28°C y con una intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol.fotones m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para ambos tratamientos se evaluó la tasa de crecimiento microalgal y acumulación de lípidos intracelulares. Al término de siete días de cultivo se cosecharon las microalgas, de cada frasco se destinó 200 mg de biomasa para la obtención de lípidos totales. Asimismo, de 100 mg de biomasa se purificó primero el ARN total y después el ARNm para secuenciar los transcriptomas de las tres especies cultivadas en ambos medios de cultivo.

3.5.4 Análisis microscópicos de las microalgas evaluadas

Los triacilglicéridos intracelulares de las microalgas fueron detectados por la fluorescencia que emiten al actuar con el rojo de nilo (Greenspan *et al.*, 1985) (disuelto en acetona) por 15 minutos y fue fotografiado empleando un microscopio trinocular de epifluorescencia Carl Zeiss-Axiolab.A1 y una cámara digital AxioCam ERc 5s en tiempo real. Las imágenes fueron obtenidas con una magnificación de

1000X con luz visible y epifluorescencia (Excitación 510-560: emisión 590).

3.5.5 Extracción de lípidos totales

Se realizó de acuerdo a Yu *et al.*(2012), consistió en los siguientes pasos 1) sacar la biomasa microalgal en una estufa a 50°C por 48 horas, 2) transferir 50 mg de biomasa microalgal seca a un mortero para su trituración con 8 ml de solución extractora de lípidos (cloroformo: metanol [2:1]), 3) transferir el extracto lipídico a un microtubo de 2ml y añadir 100µl de NaCl 0,9% por cada 1000 µl de extracto, 4) homogenizar en un vortex por 30 segundos y centrifugar a 23000xg a 4°C por 5 minutos, 5) eliminar la fase acuosa y filtrar la fase cloroformica (con filtros para jeringas de 0,25 µm) y transferir el filtrado a vasos de precipitado de peso conocido. Los componentes lipídicos retenidos en la fase intermedia (entre fase acuosa y fase clorofórmica) serán tratados varias veces con solución extractora de lípidos como se indicó previamente. Todos los extractos lipídicos obtenidos serán transferido al mismo vaso de precipitado, 6) la solución extractora de lípidos será evaporada poniendo el vaso de precipitado en un hotplate a 50°C por 4 horas, 7) los componentes lipídicos retenidos en el vaso de precipitado será secado a 50°C por 4 horas adicionales. Finalmente, el vaso de precipitado será atemperado a 25°C y determinará su peso. Por diferencia de peso del vaso de precipitado con y sin los lípidos se determinará la cantidad de lípidos obtenidos. El contenido de lípidos se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de lípidos totales} = \frac{\text{PsLT}}{\text{PsBM}} \times 100$$

Donde:

PsLT: peso seco de los lípidos

PsBM: peso seco de la biomasa microalgal

3.5.6 Purificación de ARN, construcción de librerías de ADNc y secuenciamiento del transcriptoma

El ARN total fue purificado por separado de ambos tratamientos (tres cultivos con medio CHU-10 completo y tres cultivos con medio CHU-10 sin nitrógeno) empleando el Purelink[®] RNAmini kid (Ambion[®]). La calidad del ARN purificado se analizó por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa denaturante (Sambrook y Russell, 2001). El ARNm fue aislado del ARN total empleando un Dynabeads[®] ARNm purification Kit (Ambion[®]) Alicuotas de ARNm fueron empleados para la construcción de las librerías de ADNc y secuenciamiento con Illumina HiSeq 100 bp paired end por la empresa Macrogen. Las secuencias obtenidas en esta investigación fueron depositadas y están disponibles en el secuece Read Archive del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

3.6. Tecnicas de procesamiento y análisis de datos

Para el ensamblado y anotación del transcriptoma se hizo un control de calidad de las secuencias obtenidas con las herramientas FastQC tools v0.10.0 (Andrews, 2014) y las lecturas de baja calidad con un *score phred* menor de 13 removidos utilizando el paquete SolexaQA v2.5(Cox *et al.*, 2010). El ensamblado de novo del transcriptoma se realizó con los programas Velvet v1.2.10 (Zerbino y Birney, 2008; Zerbino, 2010) y Oases v0.2.08(Schulz *et al.*, 2012) empleando una estrategia basada en algoritmo de ensamblado con multi-k con diferentes longitudes (p.ej. 23, 33, 63 y 83 pb) esta estrategia nos permitió capturar los diversos ensamblados con mayor especificidad y sensibilidad (Surget y Montoya, 2010). El agrupamiento final de los transcritos se realizó con el paquete LCS-HIT v0.5.3 (Namiki *et al.*, 2013; LCS-HIT, 2014) y se generaron los contigs no redundantes.

Para la anotación del transcriptoma, los contigs fueron investigados contra la base de datos del NCBI tales como proteínas no redundantes (nr) y secuencias de referencia de plantas (plant refseq) (Pruitt *et al.*, 2007; Pruitt *et al.*, 2012) usando el algoritmo Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005). Anotaciones adicionales fueron realizadas a través de las bases de datos de familias de genes y proteínas del Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) a través del servidor de anotación automática de KEGG KAAS v1.69x (Moriya *et al.*, 2007; Aoki y Kanehisa, 2007). Los términos asociados de ontología de genes (GO) y los números de la comisión de enzimas (EC) fueron obtenidos y se asignaron las vías metabólicas del KEGG (Kanehisa *et al.*, 2004; Aoki y Kanehisa, 2007). En base a toda esta información se procedió a elaborar el catálogo de genes del metabolismo de lípidos de las tres especies microalgales.

3.7. Protección de los derechos humanos

Este trabajo de investigación, se realizó respetando los cuatro principios éticos básicos: la autonomía, la beneficencia, la no maleficencia y la justicia. La participación fue voluntaria, así como el derecho a solicitar toda información relacionada con la investigación y teniéndose en cuenta el anonimato.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Contenido de Lípidos totales y producción de biomasa de *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. cultivados en medio CHU con (N+) y sin nitrógeno (N-)

En general, el contenido de lípidos en las tres especies de microalgas evaluadas mostraron mayor porcentaje en medio de cultivo Chu Nro. 10 con nitrógeno en comparación al medio sin nitrógeno. Siendo *Ankistrodesmus* sp., la microalga que bajo condiciones sin nitrógeno presentó el máximo porcentaje de lípidos totales (22.94%) en comparación a las otras especies evaluadas, tal como se observa en la Tabla 01. Asimismo, *Scenedesmus* sp, obtuvo una menor producción de lípidos en el tratamiento sin nitrógeno y *Chlorella* sp. mostró una mejor producción de lípidos en este tratamiento con respecto a los otros tratamientos a los que fue sometida. Sin embargo, en cuanto a la producción de biomasa se determinó que la especie que obtuvo la mayor producción de biomasa fue *Scenedesmus* sp, seguido de *Chlorella* sp. En medio de cultivo con nitrato, mientras que *Ankistrodesmus* sp., obtuvo la menor producción de biomasa en medio de cultivo sin nitrógeno (N-).

Tabla 01. Acumulación de lípidos totales y producción de biomasa en *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp, *Chlorella* sp. Cultivadas en diferentes concentraciones de nitrógeno.

	Lípidos totales (%)		Productividad de Biomasa (gL-1d-1)	
	N+	N-	N+	N-
<i>Ankistrodesmus</i> sp	18.03±0.3	22.94±0.48	0.16±0.17	0.06±0.00
<i>Chlorella</i> sp	9.54±0.21	13.18±0.03	4.94±1.78	2.36±0.69
<i>Scenedesmus</i> sp	13.18±0.03	15.24±0.06	5.68±0.72	5.23±2.17

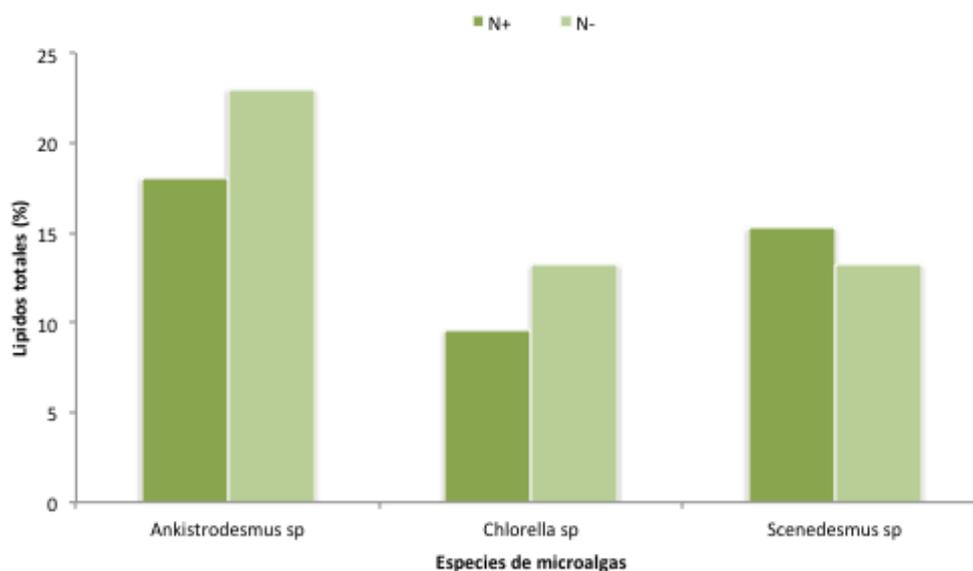


Figura 09. Contenido de lípidos totales de tres especies de microalgas cultivadas en medio con y sin nitrógeno.

En la presente figura se evidencia que *Ankistrodesmus* sp. en medio de cultivo sin nitrógeno mostró diferencias estadísticas altamente significativas ($P=0.00$) en comparación con *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., mientras que con *Scenedesmus* sp., se observó diferencias altamente significativas con *Chlorella* sp. ($P=0.00$) y diferencias significativas con *Ankistrodesmus* sp. ($P=0.024$) en el medio de cultivo con nitrógeno. Cabe resaltar que la especie *Ankistrodesmus* sp. mostró una diferencia altamente significativa entre los tratamientos y especies evaluadas.

También, al observar a las microalgas teñidas con rojo de nilo en microscopio de epifluorescencia se evidencia que aquellas que fueron cultivadas en medio sin nitrógeno mostraron una mayor intensidad de cuerpos lipídicos (gránulos amarillos) en todo el citoplasma de la célula, tal como se observa en la figura 10.

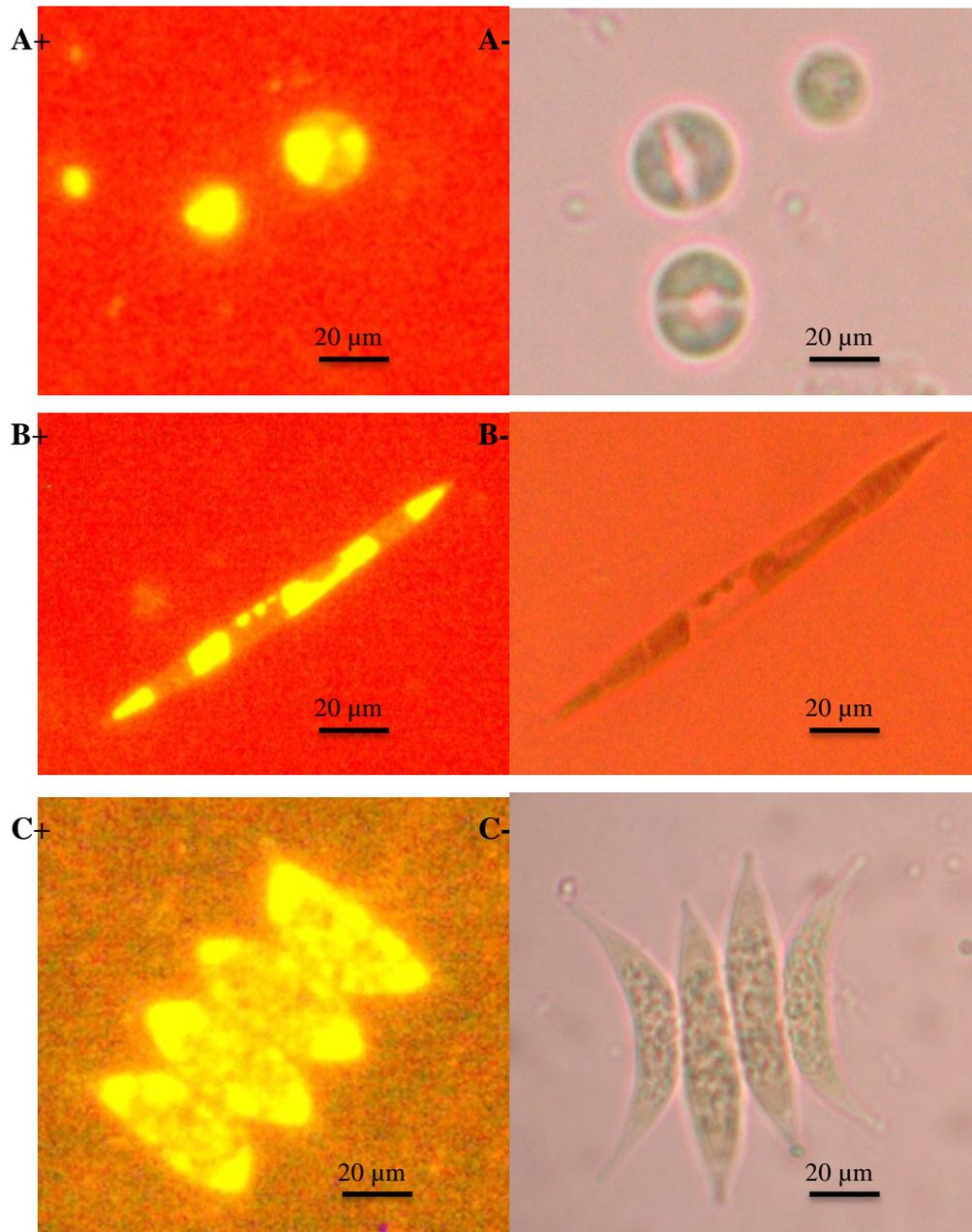


Figura 10. Contenido de lípidos totales de tres especies de microalgas cultivadas en medio con (+) y sin nitrógeno (-). A (*Chlorella* sp.) B (*Ankistrodesmus* sp.) y C (*Scenedesmus* sp.)

4.2 Purificación de ARN total de *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. cultivados en medio CHU con y sin nitrógeno.

La purificación del ARN total de las tres especies de microalgas oleaginosas de la Amazonía Peruana se realizó utilizando un protocolo que presenta las siguientes características: a) que está basado en el uso del detergente CTAB y precipitación selectiva del ARN total con altas concentraciones de cloruro de litio, b) no es necesario usar nitrógeno líquido ni agentes caotrópicos tóxicos tales como el tiocianato de guanidina y el fenol que comúnmente son empleados.

En ese sentido, con el protocolo empleado, la purificación de ARN total fue óptimo, ya que permitió obtener un material genético de excelente calidad y cantidad, lo cual es un factor comúnmente evaluado para verificar la integridad del ARN obtenido. (tal como se indica en la Tabla 02).

Tabla 02: Ratios de calidad, Cuantificación de ARN total purificado, de tres microalgas Amazónicas

Muestra	Ratios de Calidad		
	260/ 280	260/ 230	ng/ μ L
Ankistrodesmus sp	2,06 \pm 0,03	2,06 \pm 0,11	205,5 \pm 73,98
Chlorella sp	2,04 \pm 0,07	1,91 \pm 0,19	206,47 \pm 57,25
Scenedesmus sp	1,97 \pm 0,09	1,88 \pm 0,11	343,58 \pm 176,46

Los valores representan el promedio \pm desviación estándar ng/ μ L. Los ratios de calidad de ARN total a A260/A280 fueron entre 1,97 y 2,06 con una desviación estándar entre 0,03 y 0,09 lo que indica que el ARN total obtenido con la combinación de dos buffers y el protocolo modificado utilizado no fue contaminado por proteínas, ya que un ratio $>1,8$ o más indica pureza. Menos de 1,6 indica presencia de proteínas contaminantes o trozos de fenol. Mientras que los ratios de A260/A230 oscilaron entre 1,88 y

2,06 con una desviación estándar entre 0,11 y 0,19 y las concentraciones variaron entre 205,5 y 343, 58 con una desviación estándar entre 57,25 y 176,46 mostrando que el total de ARN aislado no fue contaminada por polisacáridos y polifenoles (Tabla 02)

Para verificar la pureza del material genético obtenido se hizo un análisis electroforético del ARN total, lo cual nos indica que está íntegro y no tiene contaminantes como polisacáridos ni proteínas (Figura 10). Es evidente que el ARN total, no está degradado, por lo que, se observa una banda única e intensa, aunque las intensidades son variables debido a diferencias en la concentración del ARN total obtenido de las muestras. El ARN purificado de buena calidad y cantidad fue enviado a la empresa Macrogen en Korea del Sur para los análisis de secuenciación correspondientes.

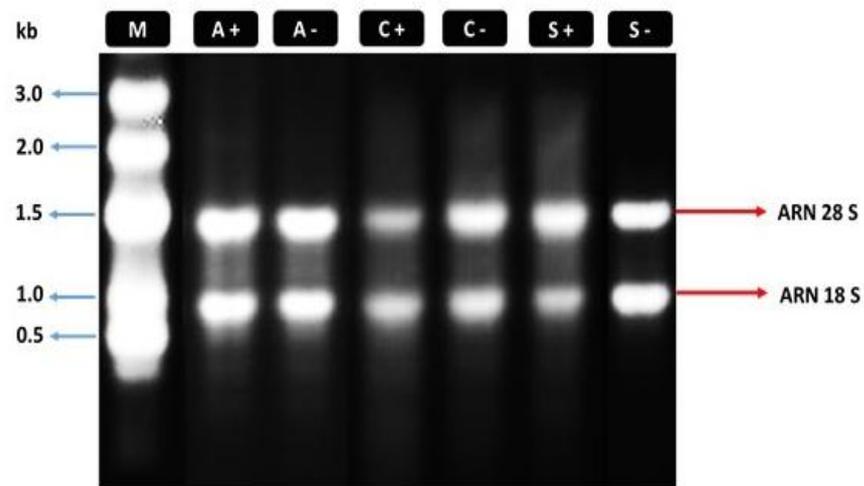


Figura. 11. Gel de agarosa al 1% con muestras de ARN total obtenidos de *Ankistrodesmus* sp., (A) *Chlorella* sp., (C) y *Scenedesmus* sp. (S) con (+) y sin nitrógeno (-)

4.3 Identificación de enzimas que codifican genes del metabolismo de lípidos en *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp cultivadas en medio con nitrógeno.

Para la identificación de las enzimas que codifican el metabolismo de lípidos fue necesario realizar en primer lugar el ensamblado de novo de las secuencias microalgales obtenidas, utilizando para ello diversos programas bioinformáticos tales como K-mers, Velvet v1.2.10 (Zerbino y Birney, 2008) y Oases v0.2.08 (Schulz, et al., 2012). Una vez ensamblados los transcriptomas se procedió a realizar su anotación funcional de las tres especies con el programa bioinformático Blast2Go. Y finalmente se pudo identificar las enzimas que codifican los genes relacionados con las vías metabólicas de lípidos en cada una de las especies, tal como se detalla en las tablas 03, 04 y 05.

En estas tablas se puede evidenciar que por lo general, las tres especies de microalgas evaluadas presentaron seis clases de enzimas (Clase I, II, III, IV, V y VI) que codifican varias vías metabólicas, tal como es el caso de *Ankistrodesmus* sp., que presentan enzimas cuyos genes regulan las vías metabólicas relacionados con la Biosíntesis y degradación de ácidos grasos, metabolismo de ácido araquidónico, metabolismo de glicerofosfolípido, metabolismo de glicerolípido y metabolismo de éter lipídico. Asimismo, en *Chlorella* sp., se puede notar que con respecto a las otras especies evaluadas, existe un mayor número de enzimas que codifican a un mayor número de vías metabólicas relacionados con el metabolismo de lípidos, principalmente con el metabolismo de glicerofosfolípidos y glicerolípidos. Y en *Scenedesmus* sp., se evidencia que las enzimas que codifican genes relacionados con el metabolismo de lípidos están agrupados en aquellos que corresponden a las vías metabólicas de glicerofosfolípidos, metabolismo de glicerolípidos y metabolismo de ácido araquidónico. Todas las vías metabólicas indicadas participan para la producción de lípidos en las microalgas.

Tabla 03. Relación de enzimas que codifican los genes de las vías metabólicas de lípidos en *Ankistrodesmus* sp.

Código enzima	Nombre de la enzima	Vía metabólica
1.1.1.100	3-oxoacil reductasa	Biosíntesis de ácidos grasos y de ácidos grasos insaturados,
1.1.1.184	Carbonil reductasa (NADPH).	Metabolismo ácido araquidónico
1.1.1.2	Alcohol dehidrogenasa (NADP(+))	Metabolismo glicerolípido
1.1.1.21	Aldehído reductasa	Metabolismo de glicerolípido
1.1.1.211	Hydroxiacil-CoA dehidrogenasa.	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados, elongación de ácidos grasos
1.1.1.6	Glicerol dehidrogenasa	Metabolismo de glicerolípidos, metabolismo propanoate
1.1.1.8	Glicerol-3-fosfato dehidrogenasa (NAD(+))	Metabolismo de glicerofosfolípido
1.1.1.94	Glicerol-3-fosfato dehidrogenasa (NAD(P)(+))	Metabolismo de glicerofosfolípido
1.1.5.3	Glicerol-3-fosfato dehidrogenasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
1.11.1.9	glutation peroxidasa	Metabolismo de glutation, metabolismo del ácido araquidónico
1.14.15.3	Alkano 1-monooxigenasa.	Degradación de ácidos grasos, metabolismo de ácido araquidónico,
1.14.19.1	Estearoil-CoA 9-desaturasa	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados
1.14.19.2	Estearoil-[acyl-carrier-protein] 9-desaturasa.	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados y biosíntesis de ácidos grasos
1.14.99.1	prostaglandina sintetasa	Metabolismo del ácido araquidónico
1.2.1.48	Cadena larga alhído dehidrogenasa	Degradación de ácidos grasos
1.3.1.38	Trans-2-enoil-CoA reductasa (NADPH)	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados y elongación de ácidos grasos
1.3.3.6	Acyl-CoA oxidasa	Biosíntesis de ácidos grasos, degradación de ácidos grasos
2.1.1.103	Fosfoetanolamina N-metiltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.15	Glicerol-3-fosfato 1-O-aciltransferasa	Metabolismo de glicerolípido, metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.158	Fosfolípido: diacilglicerol aciltransferasa	Metabolismo de glicerolípido
2.3.1.179	Beta-ketoacil-[acyl-carrier-protein] syntase II.	Metabolismo de biotina, biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.20	Diacilglicerol O-aciltransferasa.	Metabolismo de glicerolípidos
2.3.1.21	Carnitina O-palmitoiltransferasa.	Degradación de ácidos grasos
2.3.1.22	2-acilglycerol O-aciltransferasa.	Metabolismo de glicerolípido
2.3.1.23	1-acilglicerofosfocolina O-aciltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.25	Plasmalogen sintasa.	Metabolismo éter lípido
2.3.1.39	[Acyl-carrier-protein] S-maloniltransferasa	Biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.41	Beta-ketoacil-[acyl-carrier-protein] sintasa I.	Metabolismo de biotina, biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.42	Glicerona-fosfato O-	Metabolismo de glicerofosfolípido

	aciltransferasa	
2.3.1.51	1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa	Metabolismo de glicerolípido, metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.6	Colina O-acetiltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.63	1-alkilglicerofosfocolina O-aciltransferasa	Metabolismo éter lípido
2.3.1.67	1-alkilglicerofosfocolina O-acetiltransferasa	Metabolismo éter lípido
2.3.1.86	Graso-aicil-CoA sintase	Biosíntesis de ácidos grasos
2.4.1.184	Galactolípido galactosiltransferasa	Metabolismo de glicerolípido
2.4.1.241	Digalactosildiacylglicerol sintasa	Metabolismo de glicerolípido
2.4.1.46	Monogalactosildiacylglycerol sintasa	Metabolismo de glicerolípido
2.5.1.26	Alkilglicerona-fosfato sintasa	Metabolismo éter lípido
2.7.1.30	Glicerol kinasa.	Metabolismo de glicerolípido
2.7.1.31	Glicerato 3-kinasa	Metabolismo de glicerolípido
2.7.8.5	CDP-diacilglicerol--glicerol-3-fosfato 1-fosfatidiltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.7.8.8	CDP-diacilglicerol--serina O-fosfatidiltransferasa	Metabolismo de glicina y serina, metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.1.23	Acilglicerol lipasa.	Metabolismo de glicerolípido
3.1.1.26	Galactolipasa	Metabolismo de glicerolípido
3.1.1.3	triacilglicerol lipasa	Metabolismo de glicerolípido
3.1.1.32	Fosfolipasa A1	Metabolismo del ácido alfa-linolénico, metabolismo glicerofosfolípidos
3.1.1.34	Lipoproteína lipasa	Metabolismo de glicerolípido
3.1.1.5	Isofosfolipasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.1.7	Acetilcolinesterasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.2.14	Oleoil-[acyl-carrier-protein] hidrolasa.	Biosíntesis de ácidos grasos
3.1.2.2	Palmitoil-CoA hidrolasa.	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados y elongación de ácidos grasos
3.1.2.22	Palmitoil-proteína hidrolasa.	Elongación de ácidos grasos
3.1.3.75	Fosfoetanolamina/fosfocolina fosfatasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.4.2	Glicerofosfocolina fosfodiesterasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.4.39	Alkilglicerofosfoetanolamina fosfodiesterasa	Metabolismo éter lípido
3.1.4.4	Fosfolipasa D	Metabolismo éter lípido, metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.4.46	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.13.1.1	UDP-sulfoquinovosa sintasa	Metabolismo de glicerolípido
3.3.2.6	Leukotrieno-A4 hidrolasa	Metabolismo del ácido araquidónico
4.1.1.65	Fosfatidilserina decarboxilasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
4.2.1.59	3-hidroxiacil-[acyl-carrier-protein] deshidratasa.	Metabolismo de biotina, biosíntesis de ácidos grasos
4.2.1.74	Enoil -CoA hidratasa	Elongación de ácidos grasos, degradación de ácidos grasos
4.2.3.2	Etanolamina-fosfato fosfo-liasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
5.1.2.3	3-hidroxi-butiril-CoA epimerasa.	Metabolismo Butanol, degradación de ácidos grasos
5.3.3.8	Dodecenoil-CoA isomerasa.	Degradación de ácidos grasos
6.2.1.20	Degradación de ácido graso	Degradación de ácidos grasos
6.2.1.3	Ácido graso- CoA ligasa	Biosíntesis de ácidos grasos, degradación de ácidos grasos

Tabla 04. Relación de enzimas que codifican los genes de las vías metabólicas de triglicéridos en *Chlorella* sp.

Código enzima	Nombre de la enzima	Vía metabólica
1.1.1.100	3 - oxoacilo reductasa	Biosíntesis de ácidos grasos y de ácidos grasos insaturados
1.1.1.188	Prostaglandina F-sintasa	Metabolismo del ácido araquidónico
1.1.1.189	La prostaglandina - E (2) 9 - reductasa.	Metabolismo del ácido araquidónico
1.1.1.196	15-hidroxi prostaglandina-D deshidrogenasa (NADP +)	Metabolismo del ácido araquidónico
1.1.1.202	1,3-propanodiol deshidrogenasa	Metabolismo de Glicerolípido
1.1.1.21	Aldehído reductasa	Metabolismo de Glicerolípido
1.1.1.211	3-hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa de cadena larga	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados, elongación de ácidos grasos, degradación de ácidos grasos
1.1.1.6	Glicerol deshidrogenasa	Metabolismo de Glicerolípido, metabolismo de Propanoato
1.1.1.8	deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato (NAD +)	Metabolismo de glicerofosfolípido
1.1.1.94	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD (P) +];	Metabolismo de glicerofosfolípido
1.1.5.3	Glicerol - 3 - fosfato deshidrogenasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
1.11.1.9	Peróxido de glutation.	Metabolismo de Glutation, metabolism de ácido Araquidónico
1.13.11.12	Linoleato 13S-lipoxigenasa	Metabolismo del ácido alfa-linolénico, metabolismo ácido linoleico
1.13.11.33	Araquidonato 15-lipoxigenasa	Metabolismo de ácido araquidónico, metabolismo ácido linoleico
1.14.13.30	El leucotrieno-B (4) 20-monooxigenasa	Metabolismo del ácido araquidónico
1.14.15.3	Alcano-monooxigenasa 1	Metabolismo de ácido araquidónico, degradación de ácidos grasos
1.14.19.1	stearoil-CoA 9-desaturasa	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados
1.14.19.2	Estearoil 9 - desaturasa	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados, biosíntesis de ácidos grasos
1.14.19.3	Acil - CoA 6 - desaturasa.	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados, metabolismo ácidos linoléico
1.14.99.1	La prostaglandina-endoperóxido sintasa	Metabolismo del ácido araquidónico
1.18.1.3	Ferredoxina --- NAD + reductasa	Degradación de ácidos grasos
1.2.1.48	-Cadena larga-aldehído deshidrogenasa.	Degradación de ácidos grasos
1.3.1.38	Trans - 2 - enoil - CoA reductasa (NADPH)	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados, elongación de ácidos grasos
1.3.1.9)	Reductasa Enoyl- (NADH).	Biosíntesis de ácidos grasos
1.3.3.6	Acil-CoA oxidasa	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados, metabolismo de ácido alfa-linolénico, degradación de ácidos grasos
2.1.1.103	Fosfoetanolamina N-metiltransferasa.	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.1.1.71	Fosfatidil-N-metiletanolamina N-metiltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.15	El glicerol-3-fosfato 1-O-aciltransferasa.	Metabolismo de Glicerolípido, metabolismo de Glicerofosfolípido
2.3.1.158	Fosfolípido: diacilglicerol aciltransferasa	Metabolismo de glicerolípido
2.3.1.16	Acetil - CoA C - aciltransferasa	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados, metabolismo de ácido alfa-linolénico, Elongación de ácidos grasos

2.3.1.179	Beta-cetoacilo sintasa II	Biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.181	Lipoyl (octanoil) transferasa	Metabolismo de ácido lipoico
2.3.1.20	Diacylglicerol O-aciltransferasa	Metabolismo de Glicerolípido,
2.3.1.21	Carnitina O-palmitoiltransferasa	Degradación de ácidos grasos
2.3.1.22	2-O-acilglicerol aciltransferasa.	Metabolismo de glicerolípido
2.3.1.23	1-acil glicerofosfocolina OF-aciltransferasa.	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.25	Sintasa plasmalógeno	Metabolismo lípido éter
2.3.1.39	[Acil-carrier-proteína] S-malonyltransferase.	Biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.41	Beta-cetoacilo- [acil-portador-proteína] sintasa I	Biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.42	Glicerona-fosfato O-aciltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.43	Fosfatidilcolina - esterol O-aciltransferasa.	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.51	1 - acilglicerol - 3 - fosfato O - aciltransferasa	Metabolismo de Glicerolípido, metabolismo de Glicerofosfolípido
2.3.1.52	2 - acilglicerol - 3 - fosfato O - aciltransferasa.	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.6	La colina O-acetiltransferasa.	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.63	1-O-aciltransferasa alquilglicerofosfocolina	Metabolismo lípido éter
2.3.1.67	1 - alquilglicerofosfocolina O - acetiltransferasa.	Metabolismo lípido éter
2.3.1.85	Ácidos grasos sintasa	Biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.86	Fatty-acil-CoA sintasa.	Biosíntesis de ácidos grasos
2.4.1.184	galactosiltransferasa galactolípido.	Metabolismo de glicerolípido
2.4.1.241	digalactosildiacylglicerol sintasa.	Metabolismo de glicerolípido
2.4.1.46	Monogalactosildiacylglicerol sintasa	Metabolismo de glicerolípido
2.5.1.26	Alquilglicerona-fosfato sintasa;	Metabolismo lípido éter
2.5.1.42	Geranilgeraniltransferasa geranilgeranilglicerol fosfato	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.7.1.107	Diacylglicerol quinasa (ATP)	Metabolismo de Glicerolípido, metabolismo de Glicerofosfolípido,
2.7.1.30	Glicerol quinasa	Metabolismo de glicerolípido
2.7.1.32	Quinasa de colina	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.7.1.82	Quinasa etanolamina	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.7.7.14	Etanolamina-fosfato citidyltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido, metabolismo de fosfonato y fosfinato
2.7.7.15	Choline-phosphate cytidyltransferase	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.7.7.41	Fosfatidato citidyltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.7.8.1	Etanolamina fosfotransferasa	Metabolismo lípido éter, metabolismo de Glicerofosfolípido, metabolismo fosfonato y fosfinato
2.7.8.11	DP - diacylglicerol - inositol 3 - fosfatidiltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.7.8.2	colinafosfotransferasa diacylglicerol.	Metabolismo lípido éter, metabolismo de Glicerofosfolípido, metabolismo fosfonato y fosfinato
2.7.8.5	DP - diacylglicerol: --- glicerol - 3 - fosfato 1 - fosfatidiltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.8.1.8	Lipoil sintasa	Metabolismo de ácido lipoico
3.1.1.23	acylglicerol lipasa.	Metabolismo de glicerolípido
3.1.1.26	Galactolipasa.	Metabolismo de glicerolípido
3.1.1.3	Triacylglicerol lipasa	Metabolismo de glicerolípido
3.1.1.32	Fosfolipasa A1	Metabolismo del ácido alfa-linolénico,

		metabolismo glicerofosfolípidos
3.1.1.34	lipoproteína lipasa	Metabolismo de glicerolípido
3.1.1.4	Fosfolipasa A2	Metabolismo lípido éter, metabolismo de ácido alfa-Linolénico, metabolismo Glicerofosfolípido
3.1.1.5	Lisofosfolipasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.1.7	Acetilcolinesterasa.	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.2.14	Oleoil- [portadora-proteína acilo] hidrolasa.	Biosíntesis de ácidos grasos
3.1.2.22	Palmitoil [proteína] hidrolasa	Elongación de ácidos grasos
3.1.3.27	Fosfatidilglicerofosfatasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.3.4	fosfatasa fosfatidato.	Metabolismo de Glicerolípido, de lípido éter, de esfingolípidos
3.1.3.75	Fosfoetanolamina fosfatasa / fosfocina.	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.4.2	glicerofosfocolina fosfodiesterasa.	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.4.39	Alquilglicerofosfoetanolamina fosfodiesterasa.	Metabolismo lípido éter
3.1.4.4	Fosfolipasa D	Metabolismo lípido éter, metabolismo de Glicerofosfolípido
3.1.4.46	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.13.1.1	Sintasa UDP-sulfoquinovosa.	Metabolismo de Glicerolípido,
3.2.1.22	Alfa-galactosidasa	Metabolismo de Glicerolípido, esfingolípido, Biosíntesis Glicoesfingolípidos
3.3.2.6	El leucotrieno-A (4) hidrolasa	Metabolismo del ácido araquidónico
3.6.1.16	Fosfatasa CDP-glicerol	Metabolismo de glicerofosfolípido
4.1.1.65	Fosfatidilserina descarboxilasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
4.2.1.59	3-hidroxiacil deshidratasa	Biosíntesis de ácidos grasos
4.2.1.74	cadena larga-CoA hidratasa enoil-	Elongación de ácidos grasos, Degradación de ácidos grasos
4.2.3.2	Etanolamina-fosfato fosfo-liasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
5.1.2.3	3-hydroxybutyryl-CoA epimerase	Metabolismo Butanoato, degradación de ácidos grasos
5.3.3.8	Dodecenoyl-CoA isomerasa	Degradación de ácidos grasos
5.3.99.2	La prostaglandina-D sintasa	Metabolismo del ácido araquidónico
5.3.99.5	El tromboxano-A sintasa.	Metabolismo del ácido araquidónico
6.2.1.20	Ácido graso ligasa	Degradación de ácidos grasos
6.2.1.3	Ácido graso de cadena larga --- CoA ligasa	Biosíntesis de ácidos grasos, degradación de ácidos grasos

Tabla 05. Relación de enzimas que codifican los genes de las vías metabólicas de triglicéridos en *Scenedesmus* sp.

Código	Nombre de la enzima	Vía metabólica
1.1.1.100	3 - oxoacilo reductasa	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados, biosíntesis de ácidos grasos
1.1.1.184	La carbonil reductasa (NADPH)	Metabolismo de ácido araquidónico
1.1.1.188	Prostaglandina - F sintasa	Metabolismo de ácido araquidónico
1.1.1.189	Prostaglandina - E (2) 9 - reductasa	Metabolismo de ácido araquidónico
1.1.1.211	Deshidrogenasa 3 - hidroxiaxil - CoA	Elongación y degradación de ácidos grasos, Biosíntesis de ácidos grasos insaturados.
1.1.1.8	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD (+))	Metabolismo de glicerofosfolípido
1.1.1.94	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD (P) +]	Metabolismo de glicerofosfolípido
1.1.5.3	Glicerol - 3 - fosfato deshidrogenasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
1.11.1.9	Peróxido de glutation	Metabolismo de ácido araquidónico, metabolismo de glutation
1.14.13.30	Leucotrieno - B4 20 - monooxigenasa	Metabolismo de ácido araquidónico
1.14.14.1	Monooxigenasa inespecífica	Metabolismo de ácido araquidónico, degradación de ácidos grasos
1.14.15.3	Alcano 1 - monooxigenasa	Metabolismo de ácido araquidónico, degradación de ácidos grasos
1.14.19.3	Acil - CoA 6 - desaturasa.	Biosíntesis of ácidos grasos insaturados, metabolismo de ácido Linoléico
1.14.99.1	Prostaglandina-endoperoxido sintasa	Metabolismo de ácido araquidónico
1.18.1.3	Ferredoxina --- NAD + reductasa	Biosíntesis de ácidos grasos
1.2.1.48	Aldehído-deshidrogenasa de cadena larga	Biosíntesis de ácidos grasos
1.3.1.38	Trans - 2 - enoil - CoA reductasa (NADPH)	Elongación de ácidos grasos, Biosíntesis de ácidos grasos insaturados
1.3.1.42	12 - oxofitodienoato reductasa	Metabolismo de ácido alfa Linolenico
1.3.1.9	Enoil- [acil-portador-proteína] reductasa (NADH)	Biosíntesis de ácidos grasos
1.3.3.6	Cyl-CoA oxidasa	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados, degrad ácidos grasos, metabolismo de ácido alfa-Linolénico
1.3.8.1	Acil-CoA-deshidrogenasa	Degradación de ácidos grasos
2.1.1.103	N-metiltransferasa de fosfoetanolamina	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.15	Glicerol - 3 - fosfato 1 - O - aciltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido, metabolismo de glicerolípido
2.3.1.179	Beta-cetoacilo- sintasa II	Metabolismo de Biotina, Biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.180	Beta-cetoacilo- sintasa III	Biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.21	Carnitina O-palmitoiltransferasa	Biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.22	2 - acilglicerol O - aciltransferasa	Metabolismo de glicerolípidos
2.3.1.23	1-acilglicerofosfocolina O- aciltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.25	Plasmalógeno sintasa	Metabolismo lípido éter
2.3.1.39	S - maloniltransferasa	Biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.40	Acil- - fosfolípido O-aciltransferasa;	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.41	Beta-cetoacilo- [acil-portador-proteína] sintasa I	Metabolismo de Biotina, Biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.43	Fosfatidilcolina - esterol O - aciltransferasa.	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.51	1-acilglicerol-3-fosfato O- aciltransferasa.	Metabolismo de glicerofosfolípido, metabolismo de glicerolípido

2.3.1.52	2 - acilglicerol - 3 - fosfato O - aciltransferasa;	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.6	Colina O-acetiltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.3.1.63	1 - alquilglicerofosfocolina O - aciltransferasa	Metabolismo lípido éter
2.3.1.67	1-alquilglicerofosfocolina O-acetiltransferasa	Metabolismo lípido éter
2.3.1.85	Ácido graso sintasa	Biosíntesis de ácidos grasos
2.3.1.86	Graso-acil-CoA sintetasa	Biosíntesis de ácidos grasos
2.4.1.184	Galactolípido galactosiltransferasa	Metabolismo de glicerolípidos
2.4.1.241	Digalactosildiacylglicerol sintasa	Metabolismo de glicerolípidos
2.4.1.46	Monogalactosildiacylglicerol sintasa	Metabolismo de glicerolípidos
2.5.1.26	Alquilglicerona-fosfato sintasa	Metabolismo lípido éter
2.7.1.30	Glicerol quinasa	Metabolismo de glicerolípidos
2.7.1.32	Colina quinasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.7.1.82	Etanolamina quinasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
2.7.8.5	CDP - diacylglicerol: --- glicerol - 3 - fosfato 1 - fosfatidiltransferasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.1.23	Acilglicerol lipasa	Metabolismo de glicerolípidos
3.1.1.26	Galactolípasa	Metabolismo de glicerolípidos
3.1.1.3	Triacylglicerol lipasa	Metabolismo de glicerolípidos
3.1.1.32	Fosfolipasa A1	Metabolismo de glicerofosfolípido, metabolismo de ácido alfa-Linolénico
3.1.1.34	Lipoproteína lipasa	Metabolismo de glicerolípidos
3.1.1.4	Fosfolipasa A2	Metabolismo de ácido araquidónico, linoleico, alfa-Linolenico, de lípido éter,glicerofosfolípido
3.1.1.5	Lisofosfolipasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.2.14	Oleil - hidrolasa	Biosíntesis de ácidos grasos
3.1.2.2	Palmitoil - CoA hidrolasa	Elongación de ácidos grasos, Biosíntesis de ácidos grasos insaturados
3.1.2.22	Palmitoil [proteína] hidrolasa	Elongación de ácidos grasos
3.1.4.2	Glicerofosfosfocolina fosfodiesterasa.	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.1.4.39	Alkilglicerofosfoetanolamina fosfodiesterasa	Metabolismo lípido éter
3.1.4.4	Fosfolipasa D	Metabolismo lípido éter, metabolismo Glicerofosfolípido
3.1.4.46	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
3.13.1.1	UDP-sulfoquinovosa sintasa	Metabolismo de glicerolípidos
3.3.2.10	Hidróxido soluble de epóxido	Metabolismo de ácido araquidónico, cloroalkano, degradación cloroalkano
3.3.2.6	Leucotrieno - A (4) hidrolasa	Metabolismo de ácido araquidónico
4.1.1.65	Fosfatidilserina descarboxilasa	Metabolismo de glicerofosfolípido
4.2.1.59	3 - hidroxiaxil - deshidratasa	Metabolismo de Biotina, Biosíntesis de ácidos grasos
4.2.1.74	Cadena larga-enoil-CoA hidratasa	Elongación de ácidos grasos, degradación de ácidos grasos
4.2.3.2	Etanolamina-fosfato fosfo-liasa.	Metabolismo de glicerofosfolípido
5.1.2.3	3-hidroxi-butiril-CoA epimerasa	Degradación de ácidos grasos, metabolismo de butanoato
5.3.3.8	Dodecenoyl-CoA isomerasa	Biosíntesis de ácidos grasos
5.3.99.2	Prostaglandina - D sintasa	Metabolismo de ácido araquidónico
5.3.99.3	Prostaglandina - E sintasa.	Metabolismo de ácido araquidónico
6.2.1.20	Ácido graso ligasa	Biosíntesis de ácidos grasos
6.2.1.3	Ácido graso de cadena larga --- CoA ligasa	Degradación de ácidos grasos, biosíntesis de ácidos grasos

CAPITULO V

DISCUSIÓN

La amazonía Peruana puede proporcionar cepas de microalgas nativas excepcionales con potencial para la producción de biodiesel, nutraceuticos, productos químicos bioactivos y otros productos de alto valor (Brennan y Owende, 2010; Raja et al., 2008; Mata et al., 2010). Además, las cepas de microalgas nativas pueden tener aplicaciones potenciales para el secuestro biológico eficiente de CO₂, tratamiento de aguas residuales y otras aplicaciones ambientalmente amigables (Mata et al., 2010; De Wilt et al., 2015; Li et al., 2015). Por lo que, existe un gran reto cuando se trata de maximizar la producción de aceite en microalgas, es un hecho que una alta concentración de aceite es alcanzado cuando las microalgas se someten a estrés, en particular dado a las restricciones de nutrientes. Sin embargo, se ha observado que mientras la concentración de lípidos puede llegar a incrementar significativamente en condiciones de limitación de nitrógeno, la producción de biomasa es reducida lo cual no es rentable cuando se pretende tener una alta productividad de aceite (Yessang y Cheirsilp, 2011).

Los resultados obtenidos en la presente investigación resaltan que en la fase logarítmica de crecimiento, *Ankistrodesmus* sp., fue la microalga que bajo condiciones sin nitrógeno presentó el máximo porcentaje de lípidos totales (22.94%) en comparación a *Chlorella* sp., que presentó un 13.18% y *Scenedesmus* sp., con 15.24%. Además, el contenido de lípidos totales en porcentaje del peso seco de biomasa de microalgas mostró diferencias altamente significativas ($p < 0,000$) y varió de 9.54 ± 0.21 (*Chlorella* sp) a 22.94 ± 0.48 (*Ankistrodesmus* sp). Estos valores porcentuales en el contenido de lípidos totales son similares a varias especies de microalgas de otros géneros aislados y caracterizados por otros investigadores en todo el mundo (Kaur et al., 2012; Abou-Shanab et al., 2011; Do Nascimento et al., 2012; Zou et al., 2011). Además, es importante enfatizar que el contenido de lípidos depende de las

diferentes fases de crecimiento. Comúnmente, en varios taxones de microalgas el contenido de lípidos aumenta paulatinamente desde fases logarítmicas a fases de crecimiento estacionarias (Chiu et al., 2009; Huerlimann et al., 2010; Liang et al., 2009) Por ejemplo, Kaur et al., 2012 informó que el contenido total de lípidos de *Scenedesmus* sp. DRLMA9 demostró valores de 20,7% en fase exponencial tardía y 39,7% en fase estacionaria; Y *Desmodesmas elegans* DRLMA13 mostraron valores de 10,3% en fase exponencial tardía y 16,9% en fase estacionaria. Asimismo, Chiu et al., (2009) encontraron que el contenido lipídico total de *Nannochloropsis oculata* fue de 30,8% en la fase logarítmica, 39,7% en la fase estacionaria temprana y 50,4% en fase estacionaria. Estos cambios en el contenido de lípidos con el tiempo del cultivo se ha asociado con el agotamiento de nitratos (Chiu et al., 2009) lo que provoca una canalización de fotosíntesis ATP a los carbohidratos y la biosíntesis de lípidos (Liang et al., 2009).

Con respecto a la productividad de la biomasa, las microalgas evaluadas mostraron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.000$) y oscilaron entre $0.06 \pm 0.00 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (*Ankistrodesmus* sp) a $5.68 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (*Scenedesmus* sp). Estas productividades de lípidos fueron bajas en comparación con otros informes, que informaron valores de 19.0 a 43.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Abou-Shanab et al., 2011). Asimismo, productividades similares se informó para especies de microalgas de agua dulce y marinas (Paredes, 2014, cobos 2016). Sin embargo otras investigaciones muestran importantes productividades de la biomasa (que van de 30 a 120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) en el mismo y otros géneros de microalgas (Abou-Shanab et al., 2011; Chaichalerm et al., 2012). Estas discrepancias pueden atribuirse a diferencias en las condiciones de cultivo, en la composición de los medios de cultivo y en los genotipos de microalgas.

Respecto a la purificación de ARN microalgal utilizando un único método estandarizado es insuficiente. En consecuencia, se han descrito numerosos métodos para el aislamiento del ARN total, que se desarrollaron específicamente para tipos de especies o tejidos particulares (Almarza et al., 2006, Bastard et al., 2002, Bird, 2005, Kansal et al., 2008; Rio et al., 2010, Walker y Lorsch, 2013). El

presente estudio describe un método simple, eficiente y de bajo costo que permite el aislamiento de ARN total de alta calidad de tres especies de microalgas oleaginosas. El ARN total obtenido por este método se caracterizó por su calidad apropiada y alto rendimiento de ARN, tal como se reveló mediante análisis espectrofotométrico (Tabla 02). En primer lugar, las proporciones A260 / A280 oscilaron entre $1,97 \pm 0,09$ (*Scenedesmus* sp.) y $2,06 \pm 0,03$ (*Ankistrodesmus* sp.) e indican que las muestras están libres de proteínas contaminantes (25). Análogamente, las proporciones de A260 / A230 oscilaron entre 1.88 ± 0.11 (*Scenedesmus* sp.) y 2.06 ± 0.11 (*Chlorella* sp.). Estos valores son mayores en comparación con los obtenidos con los otros métodos e indican la ausencia y/o contenido más bajo de contaminantes de polisacáridos y polifenoles en las muestras (Bugos et al., 1995, John, 1992, Kansal et al., 2008). Además, el rendimiento total de ARN (μg de ARN por gramo de peso fresco de biomasa de microalgas) obtenido con nuestro método ha sido significativamente superior en comparación con los otros métodos evaluados.

Además, el análisis electroforético del ARN total obtenido fue consistentemente de alta calidad e integridad de las tres especies de microalgas. Sin embargo, con *Ankistrodesmus* sp., y *Chlorella* sp., es evidente la menor cantidad obtenida, esto puede atribuirse a la alta resistencia a la alteración celular, porque la pared celular multicapa de esta microalga es rica en biopolímeros insolubles resistentes a la esporopolenina (Bisalputra y Weier, 1963; Popper et al., 2011) , que los hace refractarios a interrupciones mecánicas durante la molienda en mortero.

Respecto al catálogo de genes de las tres especies de microalgas evaluadas, se logró identificar varias de estas enzimas, que muestran toda la maquinaria biosintética que poseen estas microalgas oleaginosas amazónicas para poder sintetizar varios ácidos grasos nutricionalmente esenciales como EPA y DHA. Estas vías permiten convertir los ácidos grasos, generados por la hidrólisis de los triglicéridos por acción de lipasas, en acetyl-CoA. Todas las enzimas responsables de este proceso metabólico fundamental han sido identificadas en las tres especies de microalgas oleaginosas. Con aproximaciones metodológicas similares descritas

en este estudio, otros investigadores han logrado también hacer la identificación de estos genes para regular ciertas vías metabólicas relacionados con el metabolismo de lípidos en otras especies de microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii* (Lv et al., 2013), *Neochloris oleoabundans* (Rismani, 2011), *Chlorella minutissima* (Yu et al., 2016), *Dunaliella parva* (Shang et al., 2016), y *Dunaliella tertiolecta* (Rismani, 2011).

CAPITULO VI

PROPUESTA

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación se propone desarrollar sistemas abiertos, cerrados o híbridos para la producción a gran escala de biomasa de cepas de microalgas nativas seleccionadas y / o cepas de microalgas de novo diseñadas para producir biocombustibles y habilidades para sintetizar compuestos bioactivos útiles para ser explotados eficientemente usando enfoques de biorefinería. Para cumplir con esta propuesta será necesario realizar una búsqueda de nuevos fondos financieros y diálogos con inversionistas interesados en la temática. De igual manera se deberá generar mesas de diálogo con las autoridades locales, regionales y nacionales colocándo a las microalgas como una alternativa viable ante a explotación petrolera que viene decreciendo en la actualidad.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

Se cultivaron tres especies de microalgas, basadas en elevadas productividades de biomasa y lípidos, bajo condiciones de suficiente nitrógeno y un medio deficiente en nitrógeno para aumentar la acumulación de lípidos. Bajo estas condiciones de cultivo todas las cepas mostraron notable incremento en el contenido total de lípidos y disminución de productividad de biomasa en cultivos sin nitrógeno.

Los resultados de esta investigación sugieren que las microalgas estudiadas podrían ser materias primas renovables adecuadas para la producción de biodiesel y bioetanol, lo que podría contribuir al desarrollo sostenible a nivel local, regional y nacional como una alternativa viable a explotación petrolera

En esta investigación informamos un método para el aislamiento de ARN total de tres microalgas oleaginosas nativas de la Amazonía peruana. El método descrito es eficaz y fiable para producir ARN total de alta calidad y cantidad que es adecuado para la síntesis de cDNA y la reacción en cadena de la polimerasa.

Con las herramientas moleculares y bioinformáticas empleadas se ha logrado mapear exitosamente las secuencias del transcriptoma de las tres especies de microalgas oleaginosas analizadas en esta investigación. Porque las múltiples vías metabólicas relacionadas con el metabolismo lipídico fueron reconstruidas e identificado los genes que codifican las enzimas de estas vías metabólicas.

CAPITULO VIII

RECOMENDACIONES

Los cultivos deberán ser unialgales para garantizar los resultados de buena calidad del contenido lipídico e identificación de enzimas y evitar la competencia por los nutrientes entre microorganismos.

Se sugiere continuar con investigaciones de bioprospección de nuevas cepas de microalgas con mayores capacidades de acumular triglicéridos y producción de nutraceuticos en cantidades comercialmente viables.

CAPITULO IX

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Andrews S. 2014. FastQC vO.11.2 Aquality control application for high throughput sequence data. [internet] 17 de enero: <http://www.bioinformatics.brabraham.ac.uk/projects/download.html>.
- Aoky K.F, Kanehisa M. 2007. Gene annotation and pathway maping in KEGG Methods; Mol Biol, Clifton NJ. **396** : 71-79.
- Almarza, J., Morales, S., Rincon, L., Brito, F. 2006. Urea as the only inactivator of RNase for extraction of total RNA from plant and animal tissues. Anal. Biochem. **358**:143–145.
- Abou-Shanab, R.A.I.; Matter, I.A.; Kim, S.-N.; Oh, Y.-K.; Choi, J.; Jeon, B.-H. Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. *Biomass Bioenergy* **2011**, *35*, 3079–3085.
- Aprile F. y Mera P. 2007. Fitoplâncton e fitoperifíton de um rio de aguas pretas da Amazônia periférica do Norte BRASIL; Rev. Aquat. Sci. Technol, **11(2)**:1-14.
- Arévalo B, Facio B, Jiménez A, Rogel E, Espinoza H. 2008. The Production of Biodiesel from Blended Commercial Oil in Mexico: A Comparative Study; Rev. Mex. Chem. Soc, **52(2)**, 136-139.
- ATS Ingenieros. 2013. Aplicaciones de las microalgas: Estado de la técnica Malgas. 1 de Diciembre. Oportunidaddes empresariales España, 69 pags.
- Barclay W, Jhonsen J, Chelf P, Nagle N, Roessler R. Microalgae culture collection 1986 – 1987. Sol Energy Res Inst. Golden , Colorado. 1986; SERI / SP – 232 – 3079. 147.
- Bastard, J.P., Chambert, S., Ceppa, F., Coude, M., Grapez, E., Loric, S., Muzeau, F., Spyratos, F., Poirier, K., Copois, V., Tse, C., Bienvenu, T., Groupe de travail de la SFBC. 2002. RNA isolation and purification methods. Ann. Biol. Clin. (Paris) **60**:513–523.
- Bird, I.M. 2005. Extraction of RNA from cells and tissue. Methods Mol. Med. **108**:139–148.
- Bogen C, AL A, Albersmeier A, Wichmann J, Grundmann M, Rupp O, Lauersen K, Blifernez O, Kalinowski J, Goesmann A, Mussgnug J, Kruse O. 2013. Reconstruction of the lipid metabolism for the microalga *Monoraphidium*

neglectum from its genome sequence reveals characteristics suitable for biofuel production; J. BMC Genomics **14**: 926.

- Brennan, L.; Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energ Rev.* **14**, 557–577.
- Bisalputra, T., Weier, T.E. 1963. The Cell Wall of *Scenedesmus quadricauda*. *Am. J. Bot.* **50**:1011–1019.
- Biología. (17 de 02 de 2017). *Biblioteca del laboratorio*. Obtenido de Biblioteca del laboratorio: http://www.infobiologia.net/Botanical_online. (23 de 01 de 2017). Obtenido de Botanical online: <http://www.botanical-online.com/botanica2.htm>
- Bugos, R.C., Chiang, V.L., Zhang, X.H., Campbell, E.R., Podila, G.K., Campbell, W.H. 1995. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. *BioTechniques* **19**:734–737.
- Carbajal, A. (2012). *Manual de nutrición dietética*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Carrero, I. y Herráez, A. (17 de 02 de 2017). *El mundo de los lípidos*. Obtenido de el mundo de los lípidos: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/tag.htm>
- Clemente estable. (17 de 02 de 2017). *Instituto de investigaciones biológicas Clemente Estable*. Obtenido de Instituto de investigaciones biológicas Clemente Estable: <http://www.iibce.edu.uy/uas/biomolec/genoma.htm>
- Cobos M, Castro J, Cerdeira L. 2014. **Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de microalgas oleaginosas aisladas del río Itaya, Loreto, Perú; Rev. Ecol. Apl.** **13(2)** 169-175.
- Conesa A, Gotz S, Garcia J.M, Terol J, Talon M, Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research; *Bioinforma Oxf. Engl.* **21 (18)** 3674- 6.
- Cox M.P, Peterson D.A, Biggs P.J. 2010. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data; *BMC Bioinformatics* **11**:485.
- Chaichalerm, S.; Pokethitiyook, P.; Yuan, W.; Meetam, M.; Sritong, K.; Pugkaew, W.; Kungvansaichol, K.; Kruatrachue, M.; Damrongphol, P. Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Appl. Energy* **2012**, *89*, 296–302.

- Chiu, S.-Y.; Kao, C.-Y.; Tsai, M.-T.; Ong, S.-C.; Chen, C.-H.; Lin, C.-S. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 833–838.
- Chu S.P. 1942. The Influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae: Part I. Methods and culture media; *J. Ecol.* **30(2)** 284.
- Cubas, P. (2008). Net. Botánica. En P. Cubas, *Botánica*. Obtenido de Net. Botánica:
https://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Cyanophyta/3_Cyanophyta_texto.pdf
- De Wilt, A.; Butkovskiy, A.; Tuantet, K.; Leal, L.H.; Fernandes, T.V.; Langenhoff, A.; Zeeman, G. Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. *J. Hazard. Mater.* **2015**, *304*, 84–92.
- D'elia L, Keyser A, Young C. 2010. Algae Biodiesel. Worcester Polytechnic Institute. 14 de Octubre. UNITED STATES, 47 pags.
- Do Nascimento, M.; Ortiz-Marquez, J.C.F.; Sanchez-Rizza, L.; Echarte, M.M.; Curatti, L. 2012. Bioprospecting for fast growing and biomass characterization of oleaginous microalgae from South-Eastern Buenos Aires, Argentina. *Bioresour. Technol.* *125*, 283–290.
- Echenique O, Núñez M, Duque S. 2013. Chlorococcales de la Amazonia Colombiana. II; *Rev. Biol. Soc. Argent. Bot.* **48**: 3-4.
- EcuRed. (17 de 02 de 2017). *EcuRed: Conocimiento con todos y para todos*. Obtenido de EcuRed: Conocimiento con todos y para todos:
<https://www.ecured.cu/Cianobacterias>
- Equipos y laboratorio de Colombia. (15 de 02 de 2017). *Equipos y laboratorio de Colombia*. Obtenido de Equipos y laboratorio de Colombia:
http://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?c=216
- Fan J, Cui Y, Wan M, Wang W, Li Y. 2014. Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors; *J. Biotechnology for Biofuels* **7**: 7-17.
- Ferreira R. 2013. Estudo do Teor de Lipídios e Avaliação dos resíduos das Algas Marinhas: *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae*, *Gracilaria domingensis* para preparação de Biodiesel e Biofertilizante. Tesis –Mossoro; Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais – PPGCN. Mestrado em Ciências Naturais – MCN; 79 pags.

- Fernández L, Montiel J, Millán A, Badillo J. 2012. Producción de biocombustibles a partir de microalgas; *Rev. Ra Ximhai*, **8(3)**: 101-115.
- FIBAO. (14 de 02 de 2017). *Medicina molecular*. Obtenido de Una perspectiva molecular en medicina: http://medmol.es/quienes_somos.cfm.
- Fotografía y biodiversidad. (17 de 02 de 2017). *Biodiversidad virtual*. Obtenido de Biodiversidad virtual: <http://www.biodiversidadvirtual.org/taxofoto/glosario/1679>
- Garibay A, Vázquez R, Sánchez M, Serrano L, Martínez A. 2009. Biodiesel a Partir de Microalgas; *Rev. Biotecnología*, **13 (3)**: 38-61.
- Gonzalez D, Casero D, Cokus S, Pellegrini M, Sabeeha S, Merchant M., Grossman A. 2010. RNA-Seq Analysis of Sulfur-Deprived *Chlamydomonas* Cells Reveals Aspects of Acclimation Critical for Cell Survival; *J. The Plant Cell*, **22**: 2058–2084.
- Gonzales, J. (201). *Curso de Biomoléculas*. Vasco: Universidad Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Greenspan P, Mayer E.P, Fowler S.D. 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets; *J. Cell. Biol*, **100 (3)**: 73-965.
- Guarnieri M, Nag A, Smolinski S, Darzins A, Seibert M, Pienkos P. 2011. Examination of Triacylglycerol Biosynthetic Pathways via De Novo Transcriptomic and Proteomic Analyses in an Unsequenced Microalga; *Rev. Plos One*, **6(10)**: e25851.
- Ho S, Chang J, Lai Y, Chen C. 2014. Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga *Desmodesmus* sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions; *J. Bioresource Technology* **156**: 108–116.
- Huerlimann, R.; de Nys, R.; Heimann, K. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *107*, 245–257.
- INEGI.ORG. (17 de 02 de 2017). *Tasa de crecimiento*. Obtenido de Tasa de crecimiento: <http://cuentame.inegi.org.mx/glosario/t.aspx?tema=G>
- John, M.E. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* **20**:2381.
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hatori M. 2004. The KEGG resource for deciphering the genome; *Nucleic Acid*, **32** (database issue) D277- 280.

- Kalita N, Baruah G, Chandra R, Talukdar J, Chandra M. 2011. *Ankistrodesmus falcatus*: A promising candidate for lipid production, its biochemical analysis and strategies to enhance lipid productivity; *J. Microbiol. Biotech*, **1** (4): 148-157.
- Kansal, R., Kuhar, K., Verma, I., Gupta, R.N., Gupta, V.K., Koundal, K.R. 2008. Improved and convenient method of RNA isolation from polyphenols and polysaccharide rich plant tissues. *Indian J. Exp. Biol.* **46**:842–845.
- Kaur, S.; Sarkar, M.; Srivastava, R.B.; Gogoi, H.K.; Kalita, M.C. 2012. Fatty acid profiling and molecular characterization of some freshwater microalgae from India with potential for biodiesel production. *New Biotechnol.* **29**, 332–344.
- Khozin I, Cohen Z. 2011. Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification; *J. Biochimie* **93**: 91-100.
- Koid A, Liu Z, Terrado R, Jones A, Caron D, Heidelberg K. 2014. Comparative Transcriptome Analysis of Four Prymnesiophyte Algae; *Journal: Plos one*, **9** (6): e97801.
- Laboratorio Mettler Toledo. (17 de 02 de 2017). *Biblioteca del laboratorio Mettler Toledo*. Obtenido de Biblioteca del laboratorio Mettler Toledo: <http://conceptodefinicion.de/sintesis/>
- Ladero M, Calvo L. 2013. Obtención de biodiesel a partir de aceite de microalgas; *Revista: Seguridad y Ambiente* **130**: 46-130.
- Láñez Pareja Enrique. (16 de 02 de 2017). *Ingeniería metabólica*. Obtenido de Ingeniería metabólica: http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/ingmetabol.htm#_Toc30913196
- Lenntech. (17 de 02 de 2017). *Lenntech*. Obtenido de lenntech: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/n.htm#ixzz4Yx92voyh>
- Li, T.; Lin, G.; Podola, B.; Melkonian, M. 2015. Continuous removal of zinc from wastewater and mine dump leachate by a microalgal biofilm PSBR. *J. Hazard. Mater.* **297**, 112–118.
- Liang, Y.; Sarkany, N.; Cui, Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.*, **31**, 1043–1049.
- Llambí, S. (2001). *Manual práctico del curso de Genética (Área II, Plan 98) Facultad de Veterinaria*.
- Lusser A. 2014. Desempenho de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) KORSIKOV (CHLOROPHYTA) cultivada em três meios de cultura em laboratório;

- Tesis – Universidade Estadual Paulista – UNESP Centro de Aquicultura da UNESP. Brasil; 49 pags.
- Lv H, Qu G, Qi X, Lu L, Tian C, Ma Y. 2013. Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* during the process of lipid accumulation. *Genomics*. Abril, 101(4):229-37.
- Mata, T.M.; Martins, A.A.; Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 14, 217–232.
- Miller R, Wu G, Deshpande R, Vieler A, Gartner K, Li X, Moellering R, Zauner S, Cornish A, Liu B, Bullard B, Sears B, Kuo M, Hegg E, Hill Y, Shiu S, Benning C. 2010. Changes in Transcript Abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following Nitrogen Deprivation Predict Diversion of Metabolism; *Journal Plant Physiology*, **154**: 1737–1752.
- Mobin S. y Alam F. 2014. Biofuel production from algae utilizing wastewater, Fluid Mechanics Conference. 8 al 11 de Diciembre. Melbourne Australia 10 pags.
- Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa A.C, Kanehisa M. 2007. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server; *Nucleic Acid*, **35**(Wed sever issue) 182- 185.
- Nachon, H. (16 de 02 de 2017). *Ciencias biológicas y educación para la salud*. Obtenido de *Ciencias biológicas y educación para la salud*: <http://hnnbiol.blogspot.pe/>
- Namiky Y, Ishida T, Akiyama Y. 2013. Acceleration of sequence clustering using logest common subsequence filtering; *BMC Bioinformatics* **14** Suppl. 8: S7.
- Nalley J. 2014. Designing profitable algal biofuel ponds: Ecological Applications to a global problema. 11 de Marzo. España; 12 Pags.
- Nextfuel Argentina. (17 de febrero de 2017). *Biodiesel Argentina noticias sobre Biodiesel y energías renovables*. Obtenido de *Biodiesel Argentina noticias sobre Biodiesel y energías renovables*: <http://biodiesel.com.ar/>
- Okolodkov Y. y Blanco R. 2011. Ecología y productividad primaria de microalgas marinas y mixohalinas, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio). Estado de Veracruz, Universidad Veracruzana, Instituto de Ecología, A.C. México. 319- 327.
- Paredes J. 2014. Impacto de la eliminación de nitrógeno en la acumulación de lípidos totales en cinco especies de microalgas oleaginosas amazónicas; Tesis- Universidad Científica del Perú- Facultad de Ingeniería ambiental Perú. 67 Pags.

- Popper, Z.A., Michel, G., Hervé, C., Domozych, D.S., Willats, W.G.T., Tuohy, M.G., Kloareg, B., Stengel, D.B. 2011. Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**:567–590.
- Pruitt K.D, Tatusova T, Maglott D.R. 2007. NCBI reference sequences (Refseq): a curated non – redundant sequence database of genome, transcripts and proteins; *Nucleic. Acids.* **35**(database issue) D61-65.
- Pruitt K.D, Tatusova T, Brown G.R, Maglott D.R. 2012. NCBI reference sequences (Refseq): curred status, new features and genome annotation policy; *Nucleic. Acids.* **40** (database issue) D130-135.
- Raja, R.; Hemaiswarya, S.; Kumar, N.A.; Sridhar, S.; Rengasamy, R. 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit. Rev. Microbiol.*, **34**, 77–88.
- Rio, D.C., Ares, M., Hannon, G.J., Nilsen, T.W. 2010. Purification of RNA by SDS solubilization and phenol extraction. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010, pdb.prot5438.
- Richmond A, Hu Q. 2013. Handbook of microalgae culture: Applied Phycology and Biotechnology; 2da edición; John Wiley y Sons; Oxford, USA; 719 pags.
- Rismani H, Haznedaroglu B, Bibby K, Peccia J. 2011. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels; *J. BMC Genomics* **12**: 148.
- Rismani H, Haznedaroglu B, HSIN C, PECCIA J. 2012. Transcriptomic analysis of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* reveals metabolic insights into triacylglyceride accumulation; *J. Biotechnology for Biofuels* **5**:74.
- Rodríguez, P.; Sánchez, Y.; Zumalacárregui, M.; Pérez, O., Hernández, A; Echeveste, P. y Lombardi, A. (2014). *Obtención de biomasa de microalga Chlorella vulgaris en un banco d eprueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo*. Cuba: Universidad federal de Sao Carlos.
- Ruiz A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente; Tesis - Universidad Politécnica de Valencia – Ingeniería hidráulica y medio ambiente. España; 97pag.

- Salazar L. 2012. Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel; Tesis- Universidad de Piura, Facultad de ingeniería. Perú. 120 pags.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vols 1,2 and 3. 3rd edition. CHSL Press; 2344p.
- Schulz M. H, Zerbino D.R, Vingrow M, Birney E. 2012. Oases: robots of novo RNA-seq assembly across the dinamic range of expression levels;. *Bioinforma Oxf. Engl*, **28 (8)** : 1086-92.
- Shang C, Bi G, Yuan Z, Wang Z, Alam MA, Xie J. 2016. Discovery of genes for production of biofuels through transcriptome sequencing of *Dunaliella parva*. *Algal Res.*;13:318-26.
- Sipaúba L. y Pereira A. 2008. Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma biergei* Korinek, 1981 (Cladocera); *J. Braz. Biol.*, **68(4)**: 875-883.
- Surget Y, Montoya J. 2010. Optimization of novo transcriptome assembly from next-generation sequencing data; *J. Genome*, **20 (10)** : 1432-40.
- Takeshita T, Ota S, Yamazaki T, Hirata A, Zachleder V, Kawano S. 2014. Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions; *J. Bioresource Technology* **158**: 127–134.
- Torres M. y Trujillo J. 2012. Producción de biodiesel a partir de aceite de palma de moriche de *Mauritia flexuosa* Lf. en la altillanura colombiana. Puerto Rico Energy Center. 01 de Mayo, Puerto Rico, 16 pags.
- Torres, V. (17 de 02 de 2017). *Muy interesante*. Obtenido de Muy interesante: <http://www.muyinteresante.es/curiosidades/preguntas-respuestas/secuenciacion>
- Tsai C, Warakanontb J, Takeuchic T, Searsb B, Moelleringc E, Benning C. 2014. The protein Compromised Hydrolysis of Triacylglycerols 7 (CHT7) acts as a repressor of cellular quiescence in *Chlamydomonas*; *J. Synthetic Genomics, Inc.* **111 (44)** 15833–15838.
- Vásquez O, Paredes D, Casuso M, Pérez S, Castro J, Cobos M. 2015. Efecto de la intensidad luminosa en la Tasa de crecimiento, producción de biomasa y acumulación de lípidos totales en dos especies de microalgas oleaginosas amazónicas. Encuentro Científico Internacional de verano "François Piuzzi". Lima –Perú. 43-44 pags.
- Walker, S.E., Lorsch, J. 2013. RNA purification--precipitation methods. *Methods Enzymol.* **530**:337–343.

- Wang Z, Ullrich N, Joo S, Waffenschmidt S, Goodenough U. 2009. Algal Lipid Bodies: Stress Induction, Purification, and Biochemical Characterization in Wild-Type and Starchless *Chlamydomonas reinhardtii*; *J. Eukaryotic cell*, **8** (12)1856–1868.
- Yang S, Guarnieri M, Smolinski S, Ghirardi M, Pienkos P. 2013. De novo transcriptomic analysis of hydrogen production in the green alga *Chlamydomonas moewusii* through RNA-Seq.; *J. Biotechnology for Biofuels* **6**:118.
- Yeesang, C.; Cheirsilp, B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 3034–3040.
- Yu X, Zhao P, He C, Li C, Zhou J, Huang Z. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium sp.* and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresour Technol.* 2012;121:256-262.
- Yu M, Yang S, Lin X. De-novo assembly and characterization of *Chlorella minutissima* UTEX2341 transcriptome by paired-end sequencing and the identification of genes related to the biosynthesis of lipids for biodiesel. *Mar Genomics.* febrero de 2016;25:69-74.
- Zerbino D.R, Birney E. 2008. Velvet : Algorithms for of novo short read assembly using of bruijn graphs; *J Genome* **18** (5) : 821-9.
- Zerbino D.R. 2010. Usign the Velvet of novo assembler for short-read sequencing technologies; *Curr Protoc Bioinforma*; Boar Andreas Baxevanis; **Chapter I**, 11-5.
- Zhou, W.; Li, Y.; Min, M.; Hu, B.; Chen, P.; Ruan, R. Local bioprospecting for high-lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewater for biofuel production. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 6909–6919

ANEXOS

ANEXO N° 01: Matriz de consistencia

Título: Catálogo de genes del metabolismo de lípidos de microalgas oleaginosas amazónicas promisorias para la producción sustentable de biodiesel. Iquitos – 2016

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Es posible elaborar un catálogo de genes de <i>Ankistrodermus</i> sp. <i>Scenedesmus</i> sp. <i>Chlorella</i> sp. involucrados en el metabolismo de lípidos promisorios para la producción sustentable de biodiesel?	<p>General</p> <p>Elaborar un catálogo de genes del metabolismo de lípidos de las especies microalgales <i>Ankistrodermus</i> sp. <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp. promisorias para la producción sustentable de biodiesel.</p> <p>Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Determinar el contenido de lípidos totales de <i>Ankistrodermus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp. cultivados en medio CHU con y sin nitrógeno - Purificar el ARN total y ARNm de <i>Ankistrodermus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp. cultivados en medio CHU con y sin nitrógeno. - Secuenciar el transcriptoma de <i>Ankistrodermus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp. cultivados en medio CHU con y sin nitrógeno. - Ensamblar y anotar el transcriptoma de <i>Ankistrodermus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp. para identificar los genes del metabolismo de lípidos 	<p>La producción de lípidos totales en tres especies de microalgas; <i>Ankistrodermus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp. se debe a genes del metabolismo de lípidos. La identificación y elaboración de un catálogo de estos genes nos permitirá establecer en un futuro inmediato programas de ingeniería genética para generar cepas microalgales mejoradas.</p>	<p>INDEPENDIENTE</p> <p>Tres especies de microalgas</p> <p>DEPENDIENTE</p> <p>Catálogo de Genes</p>	<p>- Contenido de lípidos totales</p> <p>- Secuencias de genes ensambladas y anotadas</p>	<p>Método</p> <p>Descriptivo: porque se evaluará el contenido de lípidos totales y los genes del metabolismo de los lípidos de <i>Ankistrodermus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp.</p> <p>Diseño</p> <p>Experimental: Porque se cultivará las microalgas bajo dos condiciones: en medio CHU-10 con y sin nitrógeno.</p> <p>Muestra</p> <p>Microalgas, <i>Ankistrodermus</i> sp. <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp. cultivadas en el laboratorio de bioenergética de la Universidad Científica del Perú.</p>

ANEXO N° 02: Cultivos iniciales de las especies de microalgas amazónicas.



Stock de reactivos para la preparación del medio Chu N°10



Materiales para la preparación del medio Chu N°10 Para el cultivo inicial.



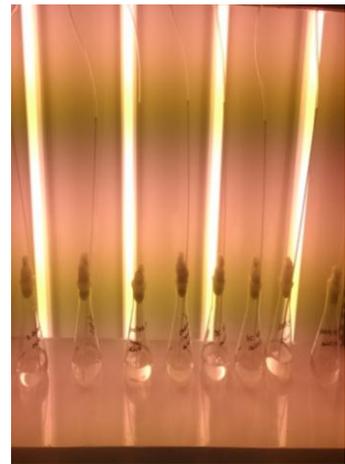
Medio CHU10 Para el cultivo inicial.



Inoculo de Cultivo inicial.



Adición de medio de cultivo



Cultivos iniciales establecidos.

ANEXO N° 03: Cosecha microalgal para ensayos.



Cosecha microalgal en tubos de 15ml.



Centrifugación del cultivo microalgal en tubos de 15ml.



Biomasa obtenida de la cosecha microalgal

ANEXO N° 04: Ensayos de Inducción



Preparación de medio de cultivo con diferentes concentraciones de nitrato para los ensayos.



Inserción de la biomasa para los ensayos



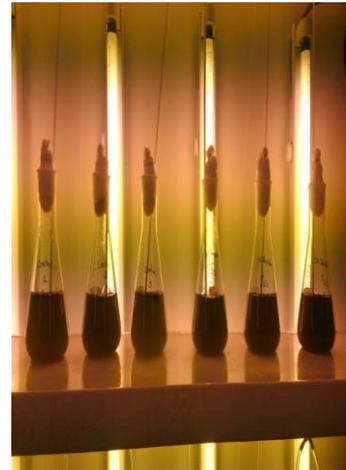
Cultivo de inducción con diferentes concentraciones de nitrato



Alícuota diaria de los cultivos en evaluación para su posterior lectura.



Lectura diaria del crecimiento microalgal en Nannodrop.

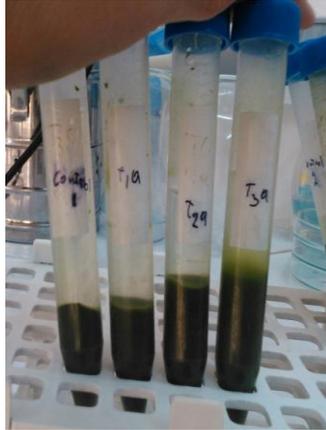


Cultivos de los ensayos instalados en las condiciones correspondientes.

ANEXO N° 05: Cosecha de microalgas sometidas a tratamiento (secado, raspado y pesado)



Centrifugación para la cosecha de los cultivos de ensayos.



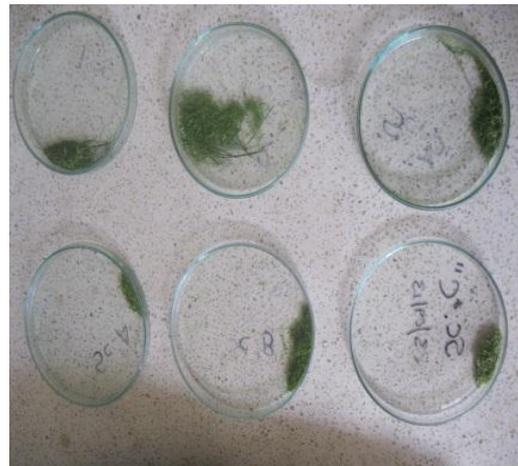
Biomasa obtenida de la cosecha de los ensayos.



Biomasa en placas Petri para el secado.



Raspado de biomasa seca.



Biomasa seca raspada.

ANEXO N° 06: Extracción de Lípidos totales



Trituración de la biomasa con la solución extractora cloroformo:metanol.



Biomasa triturada en tubos de 2ml para su centrifugación.

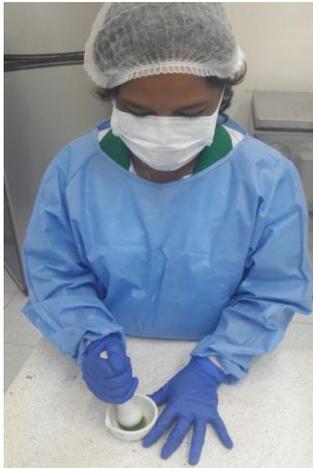


Fase cloroformica posterior a su centrifugación.



Contenido lipídico (fase cloroformica) En vasos precipitados con peso conocido.

ANEXO N° 07: Extracción de ARN y Corrida Electroforética



Trituración de la muestra microalgal con Buffer CTAB y Tris-SDS



Centrifugación a 13 500 rpm por 10 min



Lavado con etanol de 70% y secado.



Siembra en cámara y corrida electroforética en gel de Agarosa.



Verificación de la Corrida electroforética y fotoregistro.



Lectura en Espectrofotómetro Nannodrop.