



UNAP



FACULTAD DE AGRONOMÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL

**RECONSTRUCCIÓN DEL METABOLISMO DE TRIGLICÉRIDOS
DE TRES ESPECIES DE MICROALGAS OLEAGINOSAS
PROMISORIAS PARA LA PRODUCCIÓN
SUSTENTABLE DE BIODIESEL
EN LA AMAZONÍA PERUANA**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL

AUTORA : Blga. ROSANA GONZÁLES ARZUBIALDES

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° 0348-2017-EPG-UNAP**, se autoriza la sustentación de la tesis: **“RECONSTRUCCIÓN DEL METABOLISMO DE TRIGLICÉRIDOS DE TRES ESPECIES DE MICROALGAS OLEAGINOSAS PROMISORIAS PARA LA PRODUCCIÓN SUSTENTABLE DE BIODIESEL EN LA AMAZONIA PERUANA”** designando como jurados a los siguientes profesionales:

Dr. Jorge Marapara del Águila	Presidente
Dr. Juan Carlos Castro Gómez	Miembro
MSc. Pedro Marcelino Adrianzen Julca	Miembro

A los quince días del mes de Mayo del 2017, a horas 09:00 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: **“RECONSTRUCCIÓN DEL METABOLISMO DE TRIGLICÉRIDOS DE TRES ESPECIES DE MICROALGAS OLEAGINOSAS PROMISORIAS PARA LA PRODUCCIÓN SUSTENTABLE DE BIODIESEL EN LA AMAZONIA PERUANA”**, presentado por la egresada: **ROSANA GONZALES ARZUBIALDES**, como requisito para optar el Grado Académico de **MAGISTER EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL**, 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:

ABSUELTAS

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 *10:30* a.m. del día quince de Mayo del 2017; con lo cual, se le declara a la sustentante *APTA* para recibir el Grado Académico de **MAGISTER EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL**.

[Signature]
Dr. Jorge Marapara del Águila
Presidente

[Signature]
Dr. Juan Carlos Castro Gómez
Miembro

[Signature]
MSc. Pedro Marcelino Adrianzen Julca
Miembro

TESIS APROBADA EN SUSTENTACIÓN PÚBLICA DEL DÍA 15 DEL MES DE MAYO DEL AÑO 2017. EN EL AUDITORIO DE LA ESCUELA DE POSTGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, EN LA CIUDAD DE IQUITOS-PERÚ.

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR

.....
Dr. JORGE MARAPARA DEL ÁGUILA
PRESIDENTE

.....
Dr. JUAN CARLOS CASTRO GOMEZ
MIEMBRO

.....
Blgo. PEDRO MARCELINO ADRIANZEN JULCA M.Sc.
MIEMBRO

.....
Dra. MARIANELA COBOS RUIZ
ASESORA

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, salud, amor, una familia unida y la oportunidad de seguir avanzando.

A mis padres Agustín y Gloria por el amor incondicional y paciencia.

A mis hijas, Avril Del Rosario y Elba Ryana, por ser mi gran motivación de vida y superación.

A mi compañero de vida y gran amor Roy Patt por su paciencia, tolerancia, fortaleza, comprensión y sobre todo por su amor.

A mi hermano Agustín y su esposa Katia por el apoyo incondicional, junto a mis queridos sobrinos Ximena Sophia y Agustín Antonio.

RECONOCIMIENTO

- A la Universidad Científica del Perú por la oportunidad brindada en la realización de la tesis.
- Al Proyecto “Secuenciamiento y anotación del transcriptoma de microalgas oleaginosas de la Amazonía peruana para la producción sustentable de biodiesel: Descubrimiento de genes y descripción de vías metabólicas”. Subvenionado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (PNICP) Convenio 383-PIBA-2-PO31-14.
- Al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Científica del Perú, por las instalaciones, materiales, equipos y reactivos utilizados en la ejecución de la tesis.
- A la Dra. Marianela Cobos Ruiz, un agradecimiento especial por la confianza depositada en mi persona para formar parte del proyecto que ella dirige y brindarme su asesoría durante el desarrollo de la tesis de maestría. Agradezco de manera incondicional su apoyo, comprensión, tolerancia, amistad y complicidad como colega y compañera de trabajo en la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Científica del Perú.
- Al Dr. Juan Carlos Castro Gómez por ilustrarme con sus conocimientos sobre el tema durante el desarrollo de la tesis, por su paciencia, comprensión, tolerancia y amistad.
- A todas las personas que de una u otra manera han contribuido en la ejecución y culminación del presente trabajo de investigación, a todos ellos, muchas gracias.

RECONSTRUCCIÓN DEL METABOLISMO DE TRIGLICÉRIDOS DE TRES ESPECIES DE MICROALGAS OLEAGINOSAS PROMISORIAS PARA LA PRODUCCIÓN SUSTENTABLE DE BIODIESEL EN LA AMAZONÍA PERUANA

Rosana Gonzáles-Arzubialdes

RESUMEN

Las microalgas tienen un gran potencial como materia prima para producir biocombustibles de próxima generación. La escasez de información a nivel genómico, sin embargo, previene el diseño racional *de novo* de cepas microalgales. El objetivo principal de esta investigación fue reconstruir el metabolismo de triglicéridos de tres especies de microalgas oleaginosas (*Ankistrodesmus sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Chlorella sp.*) promisorias para la producción sustentable de biodiesel en la Amazonía Peruana. En total se ha generado de 5,11 a 5,52 Gb de información genética y de $5,0 \times 10^7$ a $5,4 \times 10^7$ secuencias de 100 pb. Después del ensamblado, se ha producido un total de 38,414 unigenes para *Ankistrodesmus sp.*, 61,171 unigenes para *Scenedesmus sp.* y 86,927 unigenes para *Chlorella sp.* En base a los asignamientos de las vías del KEGG, las vías de biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos fueron reconstruídos. Los resultados demuestran que la sinergia entre las tecnologías de secuenciamiento masivo y las herramientas bioinformáticas apropiadas proporcionan una estrategia apropiada para generar información genómica invaluable en especies no modelos de microalgas, como las microalgas oleaginosas de la Amazonía peruana.

Palabras claves: Biodiesel, secuenciamiento de alto rendimiento, biosíntesis de lípidos, microalgas oleaginosas, análisis del transcriptoma.

RECONSTRUCTION OF TRIACYLGLYCERIDES METABOLISM OF THREE OLEAGINOUS MICROALGAE SPECIES PROMISORY FOR SUSTAINABLE PRODUCTION OF BIODIESEL IN THE PERUVIAN AMAZON

Rosana Gonzáles-Arzubialdes

ABSTRACT

Microalgae have great potential as feedstock to produce next-generation biofuels. The scarceness of genomic level information, however, prevents the rational *de novo* microalgae strain design. The principal objective of this research was the reconstruction of triacylglycerides metabolism of three oleaginous microalgae species (*Ankistrodesmus sp.*, *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.*) promisory for sustainable production of biodiesel in the Peruvian Amazon. In total from 5.11 to 5.52 Gb of genetic information and from 5.0×10^7 to 5.4×10^7 sequences of 100 bp were generated. After assembly, a total of 38,414 unigenes for *Ankistrodesmus sp.*, 61,171 unigenes for *Scenedesmus sp.* and 86,927 unigenes for *Chlorella sp.* were produced. Based on the KEGG pathway assignment, the fatty acids and the triacylglycerol biosynthesis pathways were reconstructed. Our results demonstrate that the synergy among high-throughput sequencing technologies and appropriate bioinformatic tools provides a fast, low-cost, and effective approach to generate invaluable functional genomic information in non-model microalgae species, like oleaginous microalgae from the Peruvian Amazon.

Keywords: Biodiesel, high-throughput sequencing, lipid biosynthesis, oleaginous microalgae, transcriptome analysis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Hoja de aprobación	i
2. Dedicatoria	ii
3. Reconocimiento	iii
4. Resumen	iv
5. Abstract	v
6. Índice de contenido	vi
7. Índice de tablas	viii
8. Índice de ilustraciones	viii
Capítulo I	
1.1 Introducción	01
1.2 Problema de Investigación	03
1.3 Objetivos: General y Específicos	04
Capítulo II	
2.1.Marco Teórico	05
2.1.1 Antecedentes	05
2.1.2 Bases Teóricas	07
2.1.3 Marco Conceptual	10
2.2 Definiciones Operacionales	14
2.3 Hipótesis	14
Capítulo III	
3.Metodología	15
3.1 Método de Investigación	15
3.2 Diseños de investigación	15
3.3 Población y Muestra	15
3.4 Técnicas e Instrumentos	16
3.5 Procedimiento de Recolección de Datos	16
3.6 Técnicas de Procedimiento y Análisis de Datos	16
3.7 Protección de los Derechos Humanos	17

Capítulo IV	
4. Resultados	18
4.1 Secuenciamiento, ensamblado de novo y anotación	18
4.2 Reconstrucción de vías metabólicas para la biosíntesis de lípidos	22
Capítulo V	
5. Discusión	25
Capítulo VI	
6. Propuesta	28
Capítulo VII	
7. Conclusiones	30
Capítulo VIII	
8. Recomendaciones	31
Capítulo IX	
9. Referencias bibliográficas	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Resultados estadísticos del secuenciamiento masivo con la tecnología Illumina de los transcriptomas de las tres especies de microalgas oleaginosas.	18
Tabla N°2. Resultados estadísticos del ensamblado de novo de los Transcriptomas de las tres especies de microalgas oleaginosas.	19

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura N° 1. Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de triglicéridos en microalgas.	09
Figura N° 2. Síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto de las plantas superiores.	12
Figura N° 3. Frecuencia de las longitudes de las unigenes después del ensamblado de <i>novo</i> de los transcriptomas de las tres especies de microalgas oleaginosas.	19
Figura N° 4. Categorías de Ontología génica identificados en los unigenes ensamblados de los transcriptomas de las tres especies de microalgas.	21
Figura N° 5. Vías metabólicas para la biosíntesis de ácidos grasos (A) y ácidos grasos poliinsaturados (B) reconstruidas en base al ensamblado y anotación de los unigenes de las microalgas <i>Ankistrodesmus</i> sp., <i>Chlorella</i> sp., y <i>Scenedesmus</i> .	22
Figura N° 6. Vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de triglicéridos reconstruidas en base al ensamblado y anotación de los unigenes de las microalgas <i>Ankistrodesmus</i> sp., <i>Chlorella</i> sp., y <i>Scenedesmus</i> sp.	24

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

El cambio climático, la creciente demanda energética mundial, el aumento del costo y agotamiento de los combustibles fósiles son problemas que requieren soluciones a mediano y largo plazo. Para atenuar estos problemas en nuestro país, actualmente disponemos de varios dispositivos legales con el propósito de promover y diversificar nuestra matriz energética en base a fuentes renovables como los biocombustibles (Ministerio de Energía 2014). Sin embargo, debido a los bajos volúmenes de producción nacional (~20% de la demanda), estas medidas nos están forzando a realizar la importación de biocombustibles (particularmente de biodiesel) desde otros países, que como en nuestro país, su producción depende fundamentalmente del cultivo de grandes extensiones de plantas oleaginosas como la palma aceitera, el piñón blanco y de otras especies (Arévalo *et al.*, 2009) (Matsoglou *et al.*, 2013). Pero este cambio en el uso de la tierra, por la extensiva deforestación de bosques primarios, pone en riesgo la seguridad alimentaria y la disposición de agua (De Fraiture *et al.*, 2008). Además, en otras partes del mundo donde han sido implementados estas prácticas culturales, se está provocando una pérdida significativa de la biodiversidad y la disminución de la calidad de los servicios ecosistémicos (Delucchi, 2010).

Por tanto, para minimizar estos impactos negativos en nuestro país, necesitamos con urgencia disponer de otras fuentes alternativas de biocombustibles más apropiadas. Una excelente alternativa nos ofrecen las microalgas oleaginosas por varias razones. Primero, por su rápido crecimiento y gran eficiencia fotobiosintética de triglicéridos, que son la materia prima para obtener el biodiesel. Segundo, porque pueden proporcionar productividades mayores de 10 a 100 veces que los cultivos de plantas oleaginosas. Tercero, debido a que actúan como sumideros de CO₂ pueden contribuir a disminuir el calentamiento global. Cuarto, porque demandan menos área que los cultivos de oleaginosas y pueden usar aguas servidas para generar biocombustibles como biodiesel, bioetanol y biometanol. También, en biorefinerías microalgales es posible la producción de diversas sustancias de valor farmacéutico, nutracéutico, entre otros (Rosenberg *et al.*, 2008; Stephens *et al.*, 2010; Singh y Gu, 2010).

Pero aún existen varias limitaciones tecnológicas, económicas y en el conocimiento científico básico que necesitan ser resueltos. Por ejemplo, respecto a las limitaciones tecnológicas y económicas hasta el momento no se han desarrollado sistemas de producción masiva de biomasa microalgal que operen a bajos costos y sean rentables los procesos de cultivo y cosecha de las microalgas. Asimismo, las tecnologías para realizar la biorefinería y aprovechar al máximo la biomasa microalgal están en etapas iniciales de su desarrollo (Hariskos y Posten, 2014). También, en cuanto al conocimiento científico básico, solo se han estudiado a nivel bioquímico y molecular algunas especies de microalgas, como la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* (Harris 2001). Asimismo, existen numerosos estudios referente a los efectos de factores fisicoquímicos (p.ej. temperatura, intensidad de luz, concentración de nitrógeno, etc) en la acumulación de triglicéridos microalgales (Jiang *et al.*, 2012; Breuer *et al.*, 2012; Ruangsomboon, 2012; Liu *et al.*, 2012).

Sin embargo, aún no se entiende por completo los mecanismo moleculares implicados en la acumulación de los triglicéridos en las microalgas. Una alternativa para generar información al respecto es mediante el análisis de los transcriptomas de especies de microalgas oleaginosas. Por este motivo, el objetivo principal de este trabajo de investigación fue reconstruir el metabolismo de triglicéridos de tres especies de microalgas oleaginosas (*Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp.) promisorias para la producción sustentable de biodiesel en la Amazonía peruana.

1.2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La producción sustentable de biodiesel a partir de microalgas se ha visto obstaculizada por presentar varias limitaciones tecnológicas, económicas y en el conocimiento científico básico que necesitan ser resueltos.

Investigaciones realizadas en la Universidad Científica del Perú, en donde se realizaron experimentos independientes cultivando las microalgas oleaginosas (con contenido de lípidos totales > 20%) en medio Chu-10 completo y medio Chu-10 sin nitrógeno (estrés fisiológico) y los resultados mostraron que las especies *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. son promisorias, porque bajo estrés fisiológico incrementan su producción de lípidos totales (Paredes *et al.*, 2016).

Sin embargo, existen vacíos en el conocimiento básico de los mecanismos moleculares involucrados en la acumulación de triglicéridos microalgales, ya que sólo se conocen algunos aspectos de respuestas al estrés fisiológico a nivel molecular de la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* (Lee *et al.*, 2012). Asimismo, sólo de algunas especies de microalgas marinas se han secuenciado, ensamblado y anotado sus genomas y transcriptomas (Radakovits *et al.*, 2012); (Blanc *et al.*, 2012). En consecuencia, los conocimientos científicos básicos requeridos para mejorar la producción de lípidos microalgales, particularmente de especies amazónicas, son inexistentes.

Es por este motivo que nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: **¿Es posible reconstruir el metabolismo de triglicéridos de tres especies de microalgas oleaginosas (*Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp.) promisorias para la producción sustentable de biodiesel en la amazonía peruana?**

1.3. OBJETIVOS

General:

Reconstruir el metabolismo de triglicéridos de tres especies de microalgas oleaginosas (*Ankistrodesmus sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Chlorella sp.*) promisorias para la producción sustentable de biodiesel en la amazonía peruana.

Específicos:

- Ensamblar los transcriptomas de las microalgas oleaginosas *Ankistrodesmus sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Chlorella sp.*
- Anotar los transcriptomas de las microalgas oleaginosas *Ankistrodesmus sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Chlorella sp.*
- Identificar los genes involucrados en el metabolismo de triglicéridos de las microalgas oleaginosas *Ankistrodesmus sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Chlorella sp.*

CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 Antecedentes

Se han estudiado diferentes especies de microalgas con elevado contenido lipídico, principalmente con la capacidad de acumular triglicéridos en su estructura celular. Entre las especies de mayor interés se encuentra *Neochloris oleoabundans* cuyo porcentaje lipídico alcanza hasta el 65% del peso seco y tiene la capacidad de acumular triglicéridos (TGs) en condiciones de limitación de nitrógeno. Li *et al.*, (2008) y Pruvost *et al.*, (2009) observaron que la fuente de nitrógeno más favorable para el crecimiento celular y producción de lípidos en *N. oleoabundans* es nitrato de sodio, mostrando mejores rendimientos que urea y bicarbonato de amonio. También, observaron un aumento en la concentración de TGs conforme disminuye la concentración de nitrato de sodio en el medio de cultivo en el rango de 20 a 3 mM. Además, Griffiths y Harrison, (2009), establecieron que la limitación de nutrientes especialmente nitrógeno y silicio es considerada la estrategia más eficiente para incrementar el contenido de TGs en microalgas, después de examinar el contenido lipídico para algas verdes (*Chlorophyta*) y algas verde – azules bajo condiciones de suficiencia y limitación de estos dos nutrientes. Por esta razón, el nitrógeno ha sido demostrado como el principal regulador en el crecimiento y acumulación de lípidos microalgales (Yeh y Chang, 2012).

Las investigaciones realizadas para inducir la síntesis de lípidos a pequeña escala, concuerdan que bajo condiciones limitantes de nitrógeno se reduce el crecimiento, mientras que existe una gran variación en el contenido de lípidos y su perfil de ácidos grasos. Algunas especies del género *Chlorella* acumulan almidón en condiciones de deficiencia de nitrógeno, mientras que otras acumulan TGs (Illman *et al.*, 2000). Las microalgas son capaces de crecer y sintetizar lípidos empleando diversas fuentes de nitrógeno y se ha reportado al nitrato como la mejor fuente de nitrógeno para *Chlorella protothecoides* (Shen *et al.*, 2010), *Dunaliella tertiolecta* (Chen *et al.*, 2011) y *Neochloris oleoabundans* (Verma, *et al.*, 2010). Mientras que *Scenedesmus dimorphus*

y *Scenedesmus rubescens* presentan mayor predisposición por urea y amonio, respectivamente (Lin y Lin, 2011), En contraste, en *Chlorella saccharophila* se observa mejor crecimiento empleando peptona como fuente de nitrógeno que con nitrato y amonio (Isleten *et al.*, 2012).

Recientemente, Rodolfi *et al.*, (2009), investigaron 30 especies para seleccionar aquellas con alta productividad en biomasa y alto contenido de lípidos, encontrando que *Nannochloropsis sp.*, una especie marina, es particularmente promisorio para la producción de aceite. De igual manera, Gouveia y Oliveira (2009), investigaron 6 especies de microalgas tanto marinas como dulceacuícolas para elegir en términos de cantidad y calidad de aceite la mejor materia prima para la producción de biocombustibles. *Neochloris oleoabundans* (dulceacuícola) y *Nannochloropsis sp.* (marina) fueron las que mostraron mayor contenido de lípidos (29 y 28,7%, respectivamente), lo cual las sitúa como adecuadas para tal fin. Además, Paredes *et al.*, (2016), reportaron que la tasa de crecimiento en cinco especies de microalgas evaluadas fue mayor en medio de cultivo con nitrógeno con respecto a aquellas cultivadas en medios sin nitrógeno a excepción de *Ankistrodesmus nannoselene* que mostró un resultado diferente. *Chlorella sp.*, fue la que mostró una mayor tasa de crecimiento en medio con nitrógeno, sin embargo, el perfil de crecimiento tuvo un comportamiento contrario a aquellas que fueron cultivadas sin nitrógeno y mostraron una mayor densidad celular. Asimismo, la biomasa y el contenido de lípidos totales en las cinco especies de microalgas evaluadas fue variable. Así, en *Ankistrodesmus sp.*, *Ankistrodesmus nannoselene* y *Scenedesmus sp.*, se observó que a menor biomasa en condiciones sin nitrógeno hubo un mayor porcentaje de lípidos totales durante el período de evaluación (07 días), observándose un comportamiento diferente en el caso de *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella sp.*

Asimismo, Lv *et al.*, (2013) analizaron el transcriptoma de *Chlamydomonas reinhardtii* durante el proceso de biosíntesis y acumulación de TGs, utilizando la tecnología de Illumina y muestran que más de 2500 genes aumentan sus niveles de expresión durante la acumulación de TGs. También, el análisis del transcriptoma de la microalga oleaginosa *Neochloris oleoabundans*, revelaron el metabolismo de la acumulación de TGs. Después de un crecimiento con nitrógeno y sin nitrógeno, se

cuantificaron el contenido celular de principales biomoléculas incluyendo lípidos totales, TGs, almidón, proteínas y clorofila (Rismani *et al.*, 2012). Adicionalmente, estudios sobre el metabolismo de los lípidos en *Monoraphidium neglectum* y su secuencia del genoma revelan 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 (Bogen *et al.*, 2013). Asimismo, Koid *et al.*, (2014) han analizado, comparado y reconstruido las vías metabólicas de las microalgas *Parvum prymnesium*, *Chrysochromulina brevifilum*, *Chrysochromulina ericina* y *Phaeocystis antártida*. Finalmente, el estudio del transcriptoma y la reconstrucción de vías metabólicas proporcionan las bases que servirán para dirigir esfuerzos de la ingeniería metabólica que buscan mejorar la cantidad y calidad de lípidos de microalgas y producir biocombustibles. Asimismo, de acuerdo a Rismani *et al.*, (2011) y Fan *et al.*, (2014) la reconstrucción de las vías metabólicas permite identificar los genes claves del metabolismo de lípidos y estos podrían ser explotados como genes diana para la modificación genética.

2.1.2 Bases teóricas

Las microalgas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares que comprenden organismos eucariotas y a cianofíceas procariotas (Subrahmanyam y Cronan, 1998). En un sentido amplio y desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga hace referencia a aquellos microorganismos que contienen clorofila a y otros pigmentos fotosintéticos similares. Por tanto, son capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica. En este contexto, las cianobacterias o algas verde-azules se han considerado tradicionalmente dentro del grupo de las microalgas. Asimismo, según esta definición quedan excluidas las bacterias fotosintéticas, ya que no contienen clorofila a y realizan fotosíntesis anoxigénica. Consecuentemente, el término microalga no tiene sentido taxonómico alguno y dentro del mismo, se incluyen organismos con dos tipos celulares distintos: algas verde-azules que tienen estructura celular procariota y las restantes microalgas con estructura celular eucariota (Camargo y Alonso, 2006).

A pesar de las grandes diferencias estructurales, fisiológicamente ambos tipos de microalgas, procariotas y eucariotas, son similares y poseen un metabolismo fotosintético como de las plantas superiores. Las microalgas son muy variadas en tamaño y forma, existen en casi todos los hábitats conocidos. La mayor parte pertenece a hábitats acuáticos, tanto marinos como dulceacuícolas, aunque algunas viven en el suelo (Arredondo y Vázquez, 1991). Estas especies contienen ácidos grasos como componentes de su membrana, productos de almacenamiento, metabolitos y fuente de energía (Demirbas y Demirbas, 2010) y representan una opción viable como materia prima para producir biodiesel, debido a la mayor productividad de biomasa y mayor velocidad de replicación con respecto a plantas cultivables (Chisti, 2007). Algunas especies pueden acumular de 20 a 80% de triglicéridos (TGs) de su peso seco (Chisti, 2011), y no requieren terrenos cultivables para su producción masiva, consecuentemente no compiten con áreas destinadas a la producción de cultivos agronómicos empleados en la alimentación humana (Amaro *et al.*, 2011).

Respecto al estrés metabólico y síntesis de lípidos, las microalgas buscan adaptarse a sus condiciones ambientales con el fin de almacenar o incrementar la eficiencia en la utilización de los recursos disponibles. En general el crecimiento de biomasa microalgal (que consiste en un 40% de carbono) depende del suministro suficiente de una fuente de carbono y luz para realizar la fotosíntesis (Lin y Lin, 2011). Sin embargo, se puede ajustar o cambiar su estructura interna, cuando en el exterior se realiza variaciones o se modifican los nutrientes disponibles (Liu *et al.*, 2008). La producción y composición de lípidos en las microalgas, depende en primera medida de la especie y de su constitución genética, sin embargo, ellos se pueden ver afectados por diversas condiciones físicas y químicas de cultivo, como la fase de crecimiento en que se encuentre la célula, la disponibilidad y la clase de nutrientes, la salinidad del medio, el tipo y la intensidad de luz, temperatura, el pH, e incluso, la asociación con otros microorganismos. La limitación de nutrientes y la adecuación a diferentes condiciones de su entorno hacen que se evidencien diversas respuestas en las células como cambios morfológicos, alteración en la permeabilidad de las membranas, acumulación de lípidos y/o polisacáridos, reducción de la actividad fotosintética y modificación de proceso metabólicos (Gouveia y Oliveira, 2009).

Para las eucariotas, la formación de TGs, se lleva a cabo en organelos especializados como la mitocondria y plastidios (solo en plantas). En las células procariontas, la síntesis se lleva a cabo en el citoplasma de las células (Figura 1). La biosíntesis de los TGs en microalgas ha sido propuesta por la vía directa del glicerol (Madigan *et al.*, 1999).

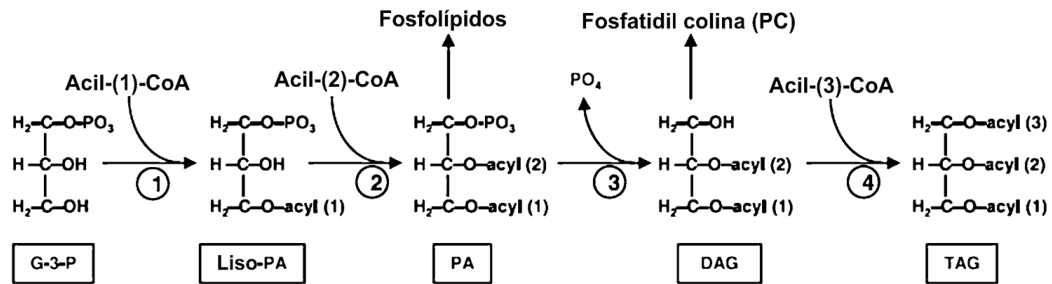


Figura 1. Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de triglicéridos en microalgas. Fuente: (Madigan *et al.*, 1999)

El primer paso para la síntesis de TGs es la condensación (acilación) del glicerol-3-fosfato (G-3_P, por sus siglas en inglés) con una acil-CoA para formar lisofosfatidato (Lyso-PA, por sus siglas en inglés), la cual es catalizada por la acetil-CoA-glicerol-sn-3-fosfato acil transferasa (GPAT, por sus siglas en inglés). Esta enzima exhibe la actividad específica más baja de la ruta de síntesis de TGs y ha sido sugerida como potencialmente limitante de la velocidad de síntesis en este paso (Brennan y Owende, 2010). Asimismo, el lisofosfatidato es condensando, catalizado por la GPAT con otro acil-CoA para producir fosfatidato (PA, por sus siglas en inglés), posteriormente, el PA puede ser fosforilado por la fosfatasa ácido fosfátidica (PAP, por sus siglas en inglés) para producir diacilglicerol. Por último, la síntesis de TGs es catalizada por la acetil-CoA-diacilglicerol-transferasa, que incorpora el tercer acil-CoA en la molécula de diacilglicerol. Esta enzima es también conocida como un importante regulador de la ruta metabólica. Los TGs finalmente son almacenados como cuerpos lipídicos (Courchesne *et al.*, 2009).

2.1.3 Marco Conceptual

Microalgas como fuente para la producción de biodiesel

Para la producción exitosa de biodiesel empleando microalgas como sistemas biológicos para la acumulación de biomasa y TGs, el primer punto crítico es buscar e identificar cepas híper productoras de TGs (Mutanda *et al.*, 2010). A pesar de que el intervalo del contenido de lípidos totales en microalgas oscila de 1 a 75% de su peso seco, algunas especies, bajo condiciones específicas de cultivo, pueden alcanzar hasta el 90% (Camargo y Alonso, 2006). Para elegir una cepa se debe emplear una estrategia de selección en base a diversos criterios como: a) velocidad de crecimiento, cuantificado normalmente por biomasa total acumulada por unidad de tiempo y unidad de volumen; b) cantidad y calidad lipídica; c) respuesta a alteraciones del ambiente, se consideran variaciones de temperatura, entrada de nutrientes y fuente lumínica, así como competencia con otras especies de microalgas o bacterianas; d) velocidad de absorción y afinidad por nutrientes, particularmente CO₂, nitrógeno y fósforo; e) cultivo de biomasa sencillo para su posterior procesamiento (Illman *et al.*, 2000).

Estrategias para incrementar la acumulación de Triglicéridos (TGs)

Con el fin de lograr una mayor rentabilidad en los procesos de producción de TGs por las microalgas, se ha empleado diferentes estrategias para mejorar la acumulación de TGs en las microalgas. Uno de los más usados es el cultivo en medios deficientes de ciertos nutrientes. Estudios en diferentes géneros de microalgas tales como *Botryococcus*, *Chlorella*, *Monodus* y *Neochloris*, revelan que cambios nutricionales direccionan el metabolismo hacia biosíntesis y acumulación de TGs (Verma *et al.*, 2010). Por ejemplo, la deficiencia de nitrógeno y fósforo son considerados importantes para la acumulación de TGs en diferentes comunidades microalgales (Takagi *et al.*, 2006).

Metabolismo de TGs

El metabolismo de los triglicéridos y de los lípidos en general en las microalgas no ha sido tan estudiado en comparación con el de las plantas superiores (Figura 2). Sin embargo, se cree que la biosíntesis de ácidos grasos y TGs se llevan a cabo de manera análoga al de las plantas, puesto que se han encontrado similitudes en ciertos genes y enzimas de origen vegetal y microalgal involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos y TGs.

De esta forma se establece que los ácidos grasos y la formación de TGs y de otros lípidos celulares, son sintetizados en el cloroplasto usando un conjunto de enzimas de las cuales la Acetil-CoA carboxilasa es la que regula la tasa de síntesis de ácidos grasos (Garibay-Hernández *et al.*, 2009).

La ruta metabólica produce ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono. Estos ácidos grasos obtenidos son usados como precursores para la formación de membranas de los cloroplastos y otras membranas celulares, así como para la síntesis de TGs, los cuales pueden acumularse bajo condiciones ambientales adversas o de crecimiento sub-óptimo (Albarracín, 2007). En la figura 2; La acetil CoA entra en la ruta como sustrato para la acetil CoA carboxilasa (Reacción 1), así como para sustrato para la reacción de la condensación inicial (reacción 3).

La reacción 2, que es catalizada por la malonil-ACP transferasa, transfiere malonil a la Coenzima A para formar malonil-ACP en el donador de carbono para las reacciones subsecuentes de elongación. Después de condensaciones subsecuentes el producto 3-cetoacil-ACP es reducido (reacción 4), deshidratado (reacción 5) y reducido nuevamente (reacción 6) por la 3-cetoacil-ACP reductasa, la 3-hidroxil-ACP deshidrasa y enoil-ACP reductasa, respectivamente.

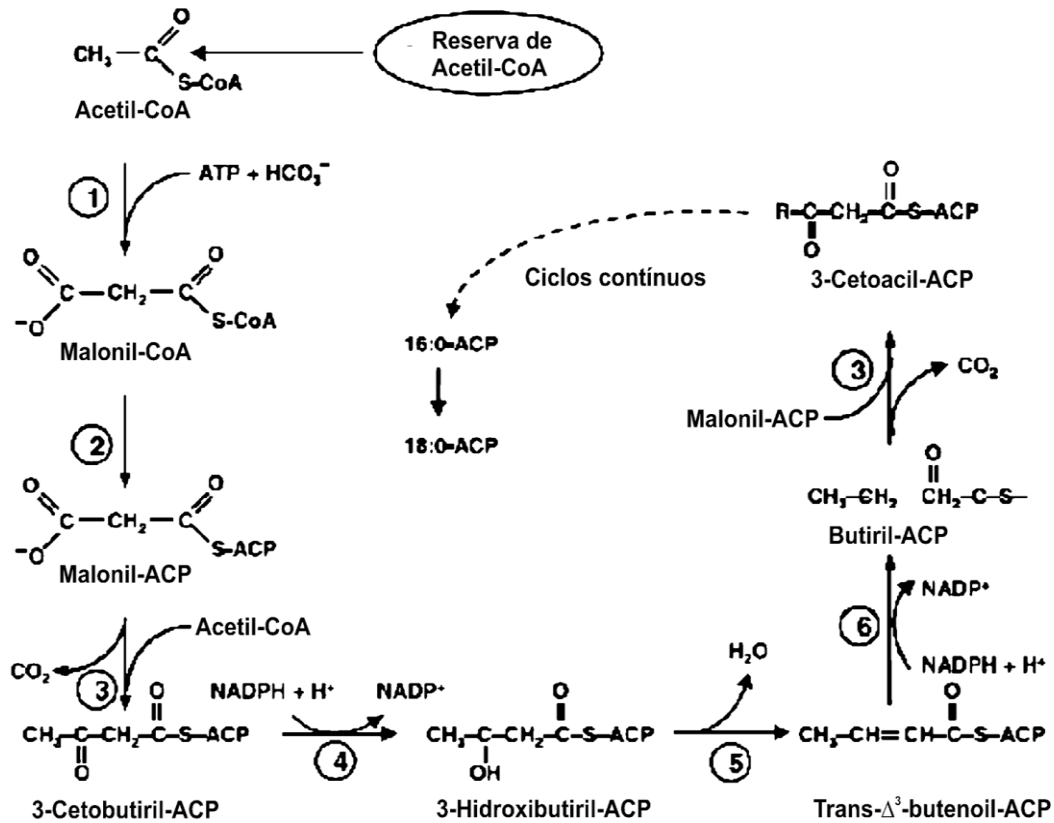


Figura 2. Síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto de las plantas superiores.
Fuente: (Subrahmanyam y Cronan 1998).

En el cloroplasto, la fotosíntesis proporciona una fuente endógena de acetil CoA y más de una ruta puede contribuir al mantenimiento de la fuente de acetil CoA (Albarracín, 2007). Una vez que el malonil-CoA es sintetizado, este es transferido por la CoA-ACP transacetilasa a la proteína-transportadora de acilos (ACP, por sus siglas en inglés) del complejo muti-enzimático ácido-graso sintasa (FAS, por sus siglas en inglés). Las bacterias y plantas tienen FAS tipo II, que es una proteína con múltiples subunidades en la cual cada polipéptido es dissociable y puede catalizar una reacción enzimática, lo opuesto al FAS tipo I encontrada en la levadura y vertebrados, constituida por una proteína multifuncional. FAS cataliza la elongación de ácidos grasos al condensar las moléculas de malonil-CoA y acetil-CoA. ACP, una de las subunidades del FAS, contiene un grupo tiol que puede formar malonil-ACP vía la formación de tioésteres con la malonil-CoA y posteriormente con el crecimiento de la cadena acilo para de esta forma asegurar su transporte. ACP puede también fijar al acetil formando acetil-

ACP. A continuación, el grupo acetil es transferido a otra subunidad del FAS, la cetoacil-ACP sintasa (KAS), la cual cataliza la condensación del malonil-ACP o el crecimiento de la cadena acilo para formar cetobutiril-ACP o cetoacil-ACP. Este compuesto resultante es primero transformado vía tres reacciones sucesivas, reducción, deshidratación y reducción, y luego condensando con otra malonil-CoA. El ciclo se repite hasta que la cadena saturada de ácido palmítico (16:0) o ácido esteárico (18:0) es formada. Por último, la ACP-tioesterasa rompe la cadena y libera el ácido graso (Garibay-Hernández *et al.*, 2009). Para obtener cadenas largas o insaturadas de ácido grasos, son requeridas enzimas como elongasas y desaturasas, las cuales actúan sobre el palmitato o estearato. Estas enzimas se encuentran localizadas en la membrana del retículo endoplasmático y mitocondrias. Muchos experimentos se han llevado a cabo para modificar el contenido de lípidos en las plantas transgénicas con estas enzimas, como por ejemplo el aumento de la producción de ácidos grasos omega-3 (Courchesne *et al.*, 2009).

Reconstrucción de vías metabólicas de microalgas

Investigaciones recientes han mostrado que mediante el secuenciamiento, ensamblado y anotación del transcriptoma se pueden reconstruir las vías metabólicas que están activas en los organismos. Esto es factible porque todos los genes codantes de enzimas que participan en estas vías metabólicas se están expresando y pueden detectarse sus ARN mensajeros. Así análisis de los transcriptomas de microalgas mediante la identificación y secuenciamiento *de novo* del transcriptoma de *Dunaliella tertiolecta*, se ha podido identificar los genes que codifican las enzimas que participan en la vía metabólica de biosíntesis de ácidos grasos y TGs (Khozin y Cohen, 2011). Estudios similares, mediante el análisis del transcriptoma de *Chlorella vulgaris* bajo condiciones de acumulación de TGs, demostraron la utilidad de este tipo de análisis en la reconstrucción de vías metabólicas de lípidos en general y TGs en particular aún de especies microalgales que no cuentan con genomas secuenciados (Guarnieri *et al.*, 2011).

2.2 DEFINICIONES OPERACIONALES

Variables	Indicadores	Índices
	Genes	
Independiente	ensamblados,	30000 a 50000
Ensamblado, anotación e identificación de genes del transcriptoma	anotados e identificados del transcriptoma	genes
Dependiente	Vías metabólicas de	3 vías
Reconstrucción del metabolismo de triglicéridos de las microalgas oleaginosas <i>Ankistrodesmus sp.</i> , <i>Scenedesmus sp.</i> y <i>Chlorella sp.</i>	triglicéridos reconstruídas	metabólicas reconstruídas

2.3 HIPÓTESIS

Mediante el ensamblado, anotación e identificación de genes del transcriptoma se puede realizar la reconstrucción del metabolismo de triglicéridos de las microalgas oleaginosas *Ankistrodesmus sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Chlorella sp.*

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1 Método de investigación

La investigación es Descriptiva porque consistió en la reconstrucción de vías metabólicas del metabolismo de triglicéridos en base a los genes identificados en el transcriptoma de las especies *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Este proceso se hizo en base a los genes identificados después de ensamblar y anotarlos.

3.2 Diseño de investigación

La investigación es no experimental, porque no se manipuló variables para ver un determinado efecto, sólo se reconstruyó las vías metabólicas con herramientas bioinformáticas en base a las secuencias ensambladas y anotadas del transcriptoma de las tres especies de microalgas.

3.3 Población y muestra

Población:

Está constituida por el conjunto de vías metabólicas relacionadas al metabolismo de triglicéridos de todas las especies de microalgas oleaginosas de la amazonía peruana

Muestra:

Está representadas por las vías metabólicas relacionadas al metabolismo de triglicéridos de las especies *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp.

3.4 Técnicas e instrumentos

Variable	Técnica /método	Instrumento
Independiente Ensamblado, anotación e identificación de genes del transcriptoma	Análisis bioinformáticos para el ensamblado, anotación e identificación de genes	Programas computacionales (Trimmomatic v0,36, Trinity v20140717, Blast2GO) y computadoras
Dependiente Reconstrucción del metabolismo de triglicéridos de las microalgas oleaginosas <i>Ankistrodesmus</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp.	Análisis bioinformáticos para la reconstrucción de vías metabólicas de triglicéridos	Programas computacionales (Blast2GO, KAAS v1.69x) y computadoras

3.5 Procedimientos de recolección de datos

La base de datos con las secuencias fueron proporcionadas por el Proyecto PIBA-2-P-031-14: “Secuenciamiento y anotación del transcriptoma de microalgas oleaginosas de la amazonía peruana para la producción sustentable de biodiesel: Descubrimiento de genes y descripción de vías metabólicas”. Financiado por el FINCyT-UCP. Cabe indicar que las secuencias del transcriptoma de las tres especies de microalgas bajo estudio fueron obtenidas con la tecnología de secuenciamiento masivo de illumina, la cual generó varios millones de secuencias cortas de 100 pb.

3.6 Tecnicas de procesamiento y análisis de datos

Las secuencias fueron sometidas a control de calidad con la herramienta Trimmomatic v 0,36 y los transcriptomas de las tres especies de microalgas fueron ensamblados *de*

novo con el programa Trinity. Para la anotación funcional de los transcriptomas, los unigenes (secuencias ensambladas) fueron investigados por sus homólogos en las bases de datos biológicas con la plataforma Blast2GO. Anotaciones adicionales y la reconstrucción de las vías metabólicas 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). Los términos asociados de Ontología de genes (GO) y los números de la comisión de enzimas (EC) fueron obtenidos y se asignaron a las vías metabólicas del KEGG.

3.7 Protección de los derechos humanos

Durante la realización de este trabajo de investigación se siguieron los protocolos de bioseguridad establecidos en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética, de tal modo que no hubo riesgos para la salud de las personas directa o indirectamente involucradas con el desarrollo de la tesis.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Secuenciamiento, ensamblado *de novo* y anotación

El secuenciamiento con la tecnología de Illumina de las tres librerías de ADNc con insertos de 200 pb permitió leer de 5,11 a 5,52 Gb de información genética y generó de $5,0 \times 10^7$ a $5,4 \times 10^7$ secuencias de 100 pb (Tabla 1). El contenido de guaninas mas citosinas (GC%) fue menor en *Scenedesmus* sp. (55,63%) y mayor en *Ankistrodesmus* sp. (64,45%).

Tabla 1. Resultados estadísticos del secuenciamiento masivo con la tecnología de Illumina de los transcriptomas de las tres especies de microalgas oleaginosas.

Especie de Microalga	Total de bases leídas (Gb)	Total de lecturas de 100 pb	GC (%)	AT (%)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	5,16	51,116,978	64,45	35,55
<i>Chlorella</i> sp.	5,52	54,690,814	58,73	41,27
<i>Scenedesmus</i> sp.	5,11	50,581,034	55,63	44,37

Las secuencias de alta calidad (>95%) fueron ensamblados *de novo* y produjeron un gran número de ARN mensajeros ensamblados (unigenes). Por ejemplo, el número de unigenes con longitudes >200 pb variaron de 38,414 (*Ankistrodesmus* sp.) a 86,927 (*Chlorella* sp.). En cuanto a los unigenes con longitudes mayores de 1000 pb, estos fluctuaron de 3,731 a 7,550 en *Ankistrodesmus* sp. y *Chlorella* sp., respectivamente. Respecto a los promedios de las longitudes de los unigenes, se observa que *Ankistrodesmus* sp. mostró el valor más bajo ($1,463 \pm 922$ pb), mientras que *Scenedesmus* sp. el valor más alto ($1,987 \pm 1338$ pb). Finalmente, el parámetro de ensamblado N50 fue similar en *Ankistrodesmus* sp. y *Chlorella* sp., pero fue más alto en *Scenedesmus* sp. (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados estadísticos del ensamblado *de novo* de los transcriptomas de las tres especies de microalgas oleaginosas

Especie de Microalga	Total de unigenes >200 pb	Total de unigenes >1000 pb	Tamaño promedio de los unigenes (pb)	N50
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	38,414	3,731	1,463 ± 922	1,038
<i>Chlorella</i> sp.	86,927	7,550	1,840 ± 1291	1,061
<i>Scenedesmus</i> sp.	61,171	5,930	1,987 ± 1338	1,276

Los resultados del ensamblado *de novo*, en base a las frecuencias de las secuencias ensambladas y longitud de los unigenes en diferentes categorías se observan en la Figura 3. Es evidente, que en las tres especies de microalgas los unigenes ensamblados más frecuentes son los que tienen longitudes de 201 a 499 pb y estas frecuencias disminuyen gradualmente en mayores rangos de longitudes. También se muestra que los unigenes de *Chlorella* sp. son más frecuentes en casi todas las categorías de longitudes, excepto en la categoría de 2000 a 8481 pb.

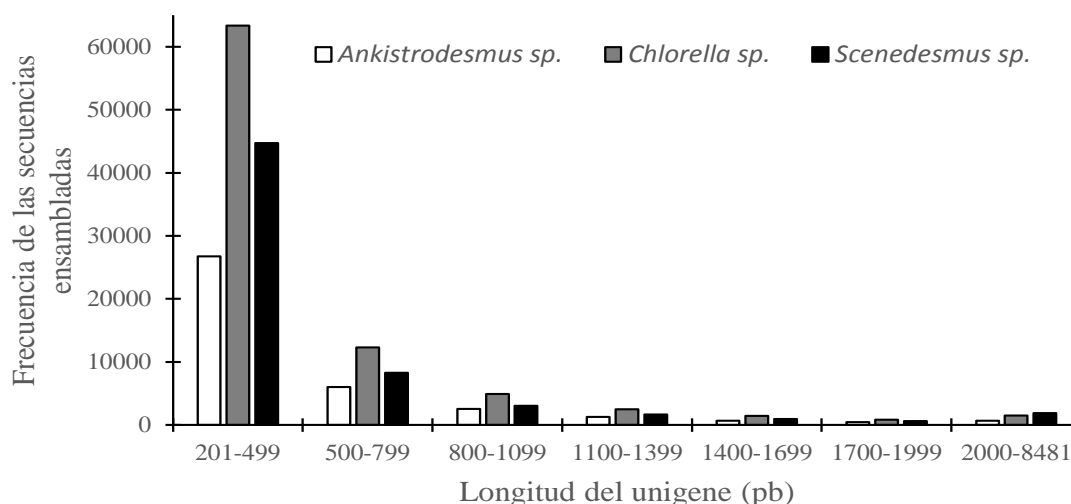


Figura 3. Frecuencia de las longitudes de los unigenes después del ensamblado *de novo* de los transcriptomas de las tres especies de microalgas oleaginosas.

Los resultados de la búsqueda de secuencias homólogas de los unigenes en las distintas bases de datos biológicas (UniProtKB, MGI, TAIR, SGD, WB, FB, ZFIN, GR_protein, RGD, CGD, AspGD, GeneDB, etc) con el programa BLASTX, mostraron que se logró anotar el 69,09, 64,77 y 65,59% de los unigenes de

Ankistrodesmus sp., *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., respectivamente. Asimismo, se muestra que las tres categorías de anotación de ontología génica (GO) tales como procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares fueron identificadas en estas especies de microalgas oleaginosas, aunque mostraron diferencias en el número de unigenes en las distintas categorías de GO (Figura 4). En general, *Chlorella* sp. presentó el mayor número de unigenes en las tres categorías GO.

En la categoría de procesos biológicos, los cinco términos GO más frecuentes en las tres especies de microalgas fueron procesos celulares, procesos de organismos celulares, procesos metabólicos, respuesta a estímulos y regulación biológica.

En tanto, en la categoría componentes celulares los cinco términos GO más comunes fueron célula, parte celular, organelo, parte de organelo y membrana.

Finalmente, en la categoría funciones moleculares los cinco términos más frecuentes fueron unión, actividad catalítica, actividad de transportadores, actividad de componentes estructurales y regulador de función molecular. En todos los casos indicados *Chlorella* sp. mostró el mayor número de términos GO, seguido por *Ankistrodesmus* sp.

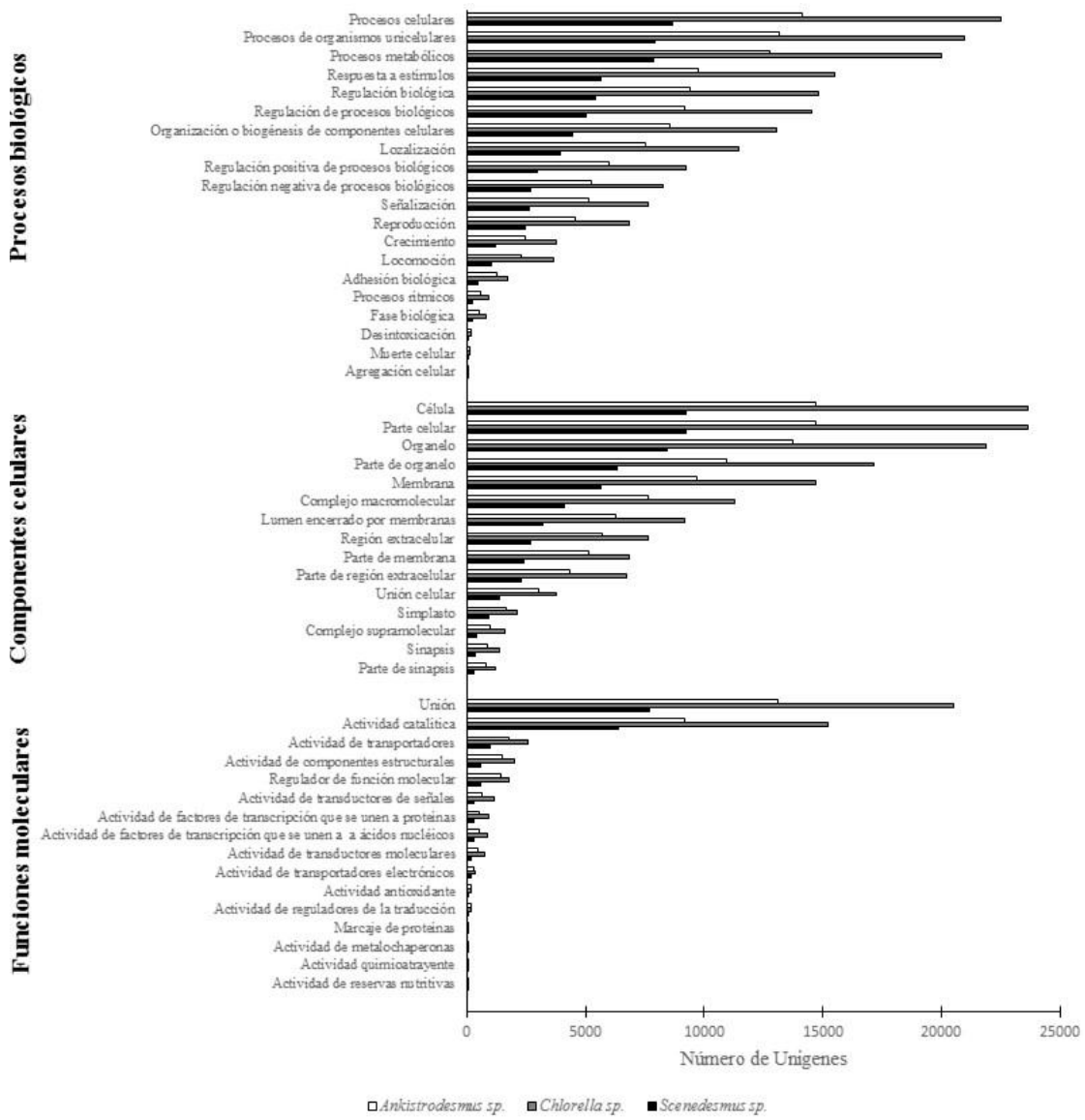


Figura 4. Categorías de Ontología génica identificados en los unigenes ensamblados de los transcriptomas de las tres especies de microalgas.

La biosíntesis de ácidos grasos consiste en la formación de ácidos grasos saturados de 16 y 18 carbonos (ácido palmítico y esteárico) a partir del intermediario metabólico Acetil-CoA (Figura 5A). Este compuesto puede ser generado a partir de acetato, piruvato o intermediarios del ciclo de Krebs. Posteriormente, el Acetil-CoA es carboxilado a Malonil-CoA por la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC). Después Malonil-CoA es unido covalentemente a la proteína transportadora de acilos (ACP) por acción de la enzima Malonil-CoA:ACP transacetilasa (MAT). Malonil-ACP es integrado al ciclo de biosíntesis de ácidos grasos por la β -cetoacilo-ACP sintasa (KAS). La biosíntesis es realizada posteriormente mediante reacciones enzimáticas secuenciales de reducción-deshidratación-reducción. Estas reacciones secuenciales y cíclicas son repetidas seis veces para obtener palmitoilo-ACP por acción de β -cetoacilo-ACP-reductasa (KAR), β -hidroxiacilo-ACP hidratasa y enoilo-ACP reductasa (EAR). A partir del ácido palmítico se pueden sintetizar otros ácidos grasos saturados e insaturados de 16 a 22 carbonos por la acción de diversas elongasas y desaturasas identificadas en los transcriptomas de las tres especies de microalgas oleaginosas (Figura 5B).

Asimismo, en base a los unigenes identificados en los transcriptomas ensamblados y anotados de las tres especies de microalgas se ha podido reconstruir las vías responsables para la biosíntesis *de novo* de los triglicéridos (Figura 6). En este proceso bioquímico tres moléculas de ácido graso activadas (acil-CoA) son ligadas covalentemente a una molécula de glicerol-3-fosfato.

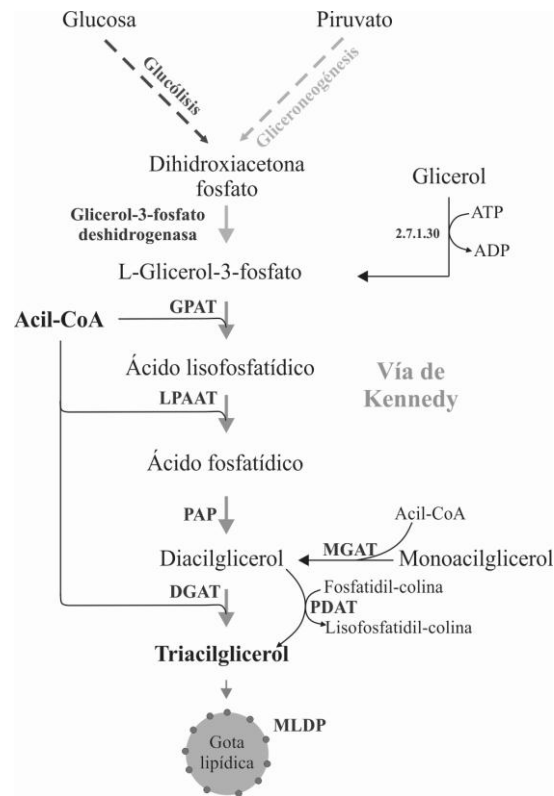


Figure 6. Vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de triglicéridos reconstruidas en base al ensamblado y anotación de los unigenes de las microalgas *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp

El glicerol-3-fosfato es producido hasta por tres procesos, es decir a partir de un intermediario de la glucólisis (dihidroxiacetona fosfato), por gliceroneogénesis a partir de piruvato y por fosforilación del glicerol. Para el ensamblado de los triglicéridos se han identificado hasta tres vías metabólicas activas en las tres especies de microalgas. La primera es la vía de Kennedy, en esta vía participan catalizando reacciones consecutivas las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT, EC:2.3.1.15), ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT, EC 2.3.1.51), ácido fosfatídico fosfatasa (PAP, EC 3.1.3.4) y la enzima acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa (DGAT, EC 2.3.1.20). La segunda es la vía del monoacilglicerol, en esta vía participa la enzima acil-CoA:monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT, EC 2.3.1.22). Finalmente, la tercera es la vía catalizada por la enzima fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa (PDAT).

CAPITULO V

DISCUSIÓN

El secuenciamiento masivo de los transcriptomas de *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. con la tecnología de Illumina, el ensamblado *de novo*, la anotación y reconstrucción de vías metabólicas con las herramientas bioinformáticas, ha generado abundante información genética para estas tres especies de microalgas oleaginosas de la Amazonía peruana. Estrategias similares han sido empleadas exitosamente en otras especies de microalgas tales como *Dunaliella tertiolecta* (Rismani-Yazdi *et al.*, 2011), *Chlorella vulgaris* (Guarnieri *et al.*, 2011), *Neochloris oleoabundans* (Rismani-Yazdi *et al.*, 2012), *Tisochrysis lutea* (Carrier *et al.*, 2014), *Chlorella protothecoides* (Gao *et al.*, 2014), *Botryococcus braunii* (Fang *et al.*, 2015), *Fistulifera solaris* (Tanaka *et al.*, 2015), *Dunaliella parva* (Shang *et al.*, 2016), *Chlorella minutissima* (Yu *et al.*, 2016) y *Chlorella sorokiniana* (Li *et al.*, 2016). En todos los casos indicados, los autores lograron reconstruir las mismas vías metabólicas para la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos que reportamos en este estudio. Estas similitudes nos indican que en principio estas vías metabólicas han sido conservadas en el proceso evolutivo, porque en plantas como *Arabidopsis thaliana* se observan similares procesos metabólicos (Ohlrogge y Browse, 1995). En conjunto, estos resultados exitosos nos indican que con las nuevas tecnologías de secuenciamiento masivo y las herramientas bioinformáticas disponibles se puede tener una gran cantidad de información genética y reconstruir vías metabólicas de interés biotecnológico de especies que carecen de recursos genómicos.

Con la información genética básica disponible de las tres especies de microalgas oleaginosas se podrá desarrollar investigaciones aplicadas con fines de mejorar las capacidades bioquímicas para sintetizar y acumular una mayor cantidad de triglicéridos, los cuales podrían estar constituidos por ácidos grasos apropiados para la producción de biodiesel de alta calidad. Asimismo, la información disponible nos permitirá mejorar la producción de otros bioproductos, ya que las microalgas son una fuente rica de varios nutraceuticos y diversos compuestos bioactivos (Borowitzka 1995; Singh *et al.*, 2005; Spolaore *et al.*, 2006; Sasso *et al.*, 2012).

La mejora de las capacidades genéticas mencionadas es posible mediante el diseño *de novo* de cepas microalgales. Actualmente, este proceso de mejora genética de las cepas microalgales para usos biotecnológicos puede ser acelerado significativamente empleando las herramientas de biología de sistemas y de biología sintética (Gimpel *et al.*, 2013; Reijnders *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Ng *et al.*, 2015; Hlavova *et al.*, 2015). El uso de estas herramientas del estado de arte en la mejora genética, solo estuvo disponible para un limitado número de especies microalgales, es decir para aquellas que tenemos un conocimiento profundo de sus recursos genómicos (Grossman *et al.*, 2003; Merchant *et al.*, 2007; May *et al.*, 2008; Gomes de Oliveira Dal'Molin *et al.*, 2011; Gargouri *et al.*, 2015; Barahimipour *et al.*, 2016),

Algunas de las experiencias más relevantes de mejora genética de microalgas se indican a continuación. El primer estudio conducido por Dunahay *et al.*, (1996) estuvo enfocado a la sobreexpresión del gen que codifica a la enzima acetil-CoA carboxilasa (*ACCasa*), una enzima que cataliza la formación de malonil-CoA, esta es considerada una etapa reguladora de la biosíntesis de ácidos grasos. Los mencionados investigadores aislaron el gen que codifica la enzima acetil-CoA carboxilasa de la microalga *Cyclotella cryptica* y fueron los primeros en construir vectores de expresión y desarrollar protocolos de transformación genética para esta especie de microalga. Aunque, lograron realizar la transformación genética de esta especie microalgal y verificaron la incorporación de copias adicionales del gen *ACCasa* en el genoma de *C. cryptica*, pero no observaron un incremento en la actividad de la enzima y no reportaron si hubo un aumento en el contenido de lípidos de las microalgas transformadas.

Sin embargo, estudios mas recientes como por ejemplo de Li *et al.*, (2010) demostraron que la inactivación de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa en *C. reinhardtii* aumenta hasta 10 veces el contenido de triglicéridos. Estos resultados sugieren que la canalización de los carbohidratos fotosintéticos hacia la biosíntesis de triglicéridos en lugar de almidón, es una alternativa más efectiva que la manipulación directa de las vías metabólicas de biosíntesis de lípidos. En tanto, Radakovits *et al.*, (2011) mostraron que la sobreexpression heteróloga de dos tioesterasas permitió la acumulación e incorporación de los ácidos grasos láurico y mirístico en los

triglicéridos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum*, lo cual mejoraría significativamente la calidad y propiedades del biodiesel que se podría obtener de esta especie microalgal. Pero, Trentacoste *et al.*, (2013) mediante una estrategia de ingeniería metabólica, que consistió en el noqueo con ARN de interferencia de un gen que codifica una enzima multifuncional (lipasa/fosfolipasa/aciltransferasa) involucrada en el catabolismo de triglicéridos de la microalga *Thalassiosira pseudonana*, lograron incrementar de 2,4 a 4,1 veces la productividad de triglicéridos. En conjunto, estos estudios demuestran que para lograr la mejora genética de las microalgas es indispensable disponer de la información genética, construir los vectores de expresión y desarrollar protocolos de transformación genética.

CAPITULO VI

PROPUESTA

La mejora de las capacidades genéticas mencionadas es posible mediante el diseño *de novo* de cepas microalgales. Actualmente, este proceso de mejora genética de las cepas microalgales para usos biotecnológicos puede ser acelerado significativamente empleando las herramientas de biología de sistemas y de biología sintética

Con la disposición de los transcriptomas ensamblados, anotados funcionalmente y con las vías metabólicas reconstruidas de las tres especies de microalgas se podrán diseñar *de novo* cepas microalgales para ser usadas como plataformas biotecnológicas. Por ejemplo, para obtener cepas que estén orientadas a la producción de biodiesel, los esfuerzos de mejora genética deben enfocarse a la ingeniería metabólica de las vías para la biosíntesis y degradación de ácidos grasos y triglicéridos identificados en este estudio. Ya sea mediante la sobreexpresión de genes involucrados en la biosíntesis (incrementando el número de copias de los genes claves o induciendo su sobreexpresión). Paralelamente, como ha sido demostrado en otros estudios, la disminución o bloqueo de la expresión de los genes que codifican enzimas de las vías catabólicas (p.ej., lipólisis y betaoxidación) sería la otra opción. Alternativamente, se puede optar al bloqueo de vías para la biosíntesis de almidón y así poder canalizar los metabolitos fotosintéticos hacia la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos, lo que repercutirá en el incremento de la productividad de triglicéridos.

Otros usos biotecnológicos potenciales de estas especies microalgales es en la producción de nutraceuticos y/o ser empleados como plataformas biotecnológicas para la producción de proteínas recombinantes. Lo primero, puede lograrse mediante la manipulación de vías metabólicas responsables de la biosíntesis de vitaminas, de ácidos grasos poliinsaturados esenciales, de carotenoides, de antioxidantes, de polifenoles, etc., los cuales permitirán dar un valor agregado a la biomasa microalgal. La segunda alternativa, es que al disponer de las secuencias de los genomas cloroplásticos, mitocondriales y nucleares se podrán contruir vectores de expresión apropiados para la producción de proteínas recombinantes de interés industrial y

biomédico, en este último caso como la producción de vacunas para uso con fines veterinarios (para peces, aves de corral, etc.) y mejora de la salud humana, desarrollo de kits de diagnóstico, etc.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que haciendo la sinergia de las tecnologías de secuenciamiento masivo y las herramientas bioinformáticas apropiadas es una estrategia efectiva para generar abundante e invaluable información de genómica funcional (transcriptoma) en especies de microalgas oleaginosas de la Amazonía peruana tales como *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Con esta estrategia se ha reconstruido exitosamente las vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos. Esta información podrá ser usada para el diseño de novo de cepas microalgales con características deseables para la producción de biodiesel y con capacidades para la las industrias alimentarias y de cosméticos. biosíntesis de nutraceuticos y de otros compuestos bioactivos de interés farmacológico, para las industrias alimentarias y de cosméticos.

CAPITULO VIII

RECOMENDACIONES

1. Debe realizarse estudios de expresión génica a nivel transcriptómico de estas tres especies de microalgas y de otras con potencial para la producción de biodiesel y de compuestos bioactivos en las diferentes fases del crecimiento microalgal (exponencial, estacionaria, etc.) y bajo diferentes condiciones de cultivo (tipo de medio de cultivo, intensidad de luz, fotoperiodo, deficiencia de nutrientes, etc) a fin de identificar genes claves involucrados en la biosíntesis de los diversos compuestos de interés.
2. Es fundamental que se secuencie los genomas nucleares, cloroplastos y mitocondriales de estas especies de microalgas. Este tipo de información será indispensable para la construcción de vectores de expresión y al desarrollo de protocolos de transformación se podrá generar *de novo* cepas microalgales con mejores y/o nuevas capacidades para la producción de compuestos de interés biomédico e industrial.

CAPITULO IX

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALBARRACÍN, I. (2007). La producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. XV Simp Electrónico Int.;1- 16.
2. AMARO, H., GUEDES A., and MALCATA F. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy*; 88(10):3402-10.
3. ARÉVALO, B., FACIO, B., JIMÉNEZ, A., ROGEL, E. and ESPINOZA, H. (2008). The production of biodiesel from blended commercial oil in Mexico: A comparative study; *Rev. Mex. Chem. Soc*, 52(2), 136-139.
4. ARREDONDO, B.O., y VÁZQUEZ, R. (1991). Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo, CONACyT*.1991;27(98):99-111.
5. BARAHIMIPOUR, R., NEUPERT, J., and BOCK, R. (2016). Efficient expression of nuclear transgenes in the green alga *Chlamydomonas*: synthesis of an HIV antigen and development of a new selectable marker. *Plant Mol Biol* 90:403–418.
6. BLANC, G., AGARKOVA, I., GRIMWOOD, J., KUO A., BRUEGGEMAN, A., and DUNIGAN, D.D. (2012). The genome of the polar eukariotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. *Genome Biol.*;13(5):R39.
7. BOGEN, C., AI, A., ALBERSMEIER, A., WICHMANN, J., GRUNDMANN, M., RUPP, O., LAUERSEN, K., BLIFERNEZ, O., KALINOWSKI, J., GOESMANN, A., MUSSGNUM, J., and 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.
8. BOROWITZKA, M.A. (1995) Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J Appl Phycol* 7:3–15.
9. BRENNAN L., and OWENDE P. (2010). Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ Rev.*;14(2):557-77.
10. BREUER, G., LAMERS, P.P, MARTENS, D.E, DRAAISMA, R.B, and WIJFFELS, R.H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour Technol.* 124:217-26.
11. CAMARGO, J.A. and ALONSO A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environmental International*; 32: 831-849.

12. CARRIER, G., GARNIER, M., LE, CUNFF, L. (2014). Comparative transcriptome of wild type and selected strains of the microalgae *Tisochrysis lutea* provides insights into the genetic basis, lipid metabolism and the life cycle. *PLoS One* 9:e86889.
13. CHEN, M., TANG, H., MA, H., HOLLAND, TC., NG, S., K.Y. and SALLEY, S. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour Technol.*102(2):1649-55.
14. CHRISTI, Y., (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.*;25:294- 306.
15. CHRISTI, Y., (2011). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.*;26 (3):126-131.
16. COURCHESNE, M., PARISIEN, A., WANG, B., and LAN, Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J Biotechnol.* 141(1-2):31-41.
17. DE FRAITURE, C., GIORDANO, M., and LIAO, Y. (2008). Biofuels and implications for agricultural water use: blue impacts of green energy. *Water Policy*;10(Supplement 1):67-81.
18. DELUCCHI, M.A. (2010). Impacts of Biofuels on Climate Change, Water use, and Land Use. *AnnNYAcadSci.*;1195:28-45.
19. DEMIRBAS, A. and DEMIRBAS, M. (2010). *Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel*. Springer Lond Dordr Heidelb New York.; e-ISBN 978-1-84996-050-2.
20. DUNAHAY, TG., JARVIS, EE., DAIS, S.S. and ROESSLER, P.G. (1996). Manipulation of Microalgal Lipid Production Using Genetic Engineering. In: Wyman CE, Davison BH (eds) *Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press, pp 223–231
21. FAN, J., CUI, Y., WAN, M., WANG, W., and 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.
22. FANG, L., SUN, D., XU, Z. (2015). Transcriptomic analysis of a moderately growing subsolate *Botryococcus braunii* 779 (Chlorophyta) in response to nitrogen deprivation. *Biotechnol Biofuels* 8:130.
23. GAO, C., WANG, Y. and SHEN, Y. (2014). Oil accumulation mechanisms of the oleaginous microalga *Chlorella protothecoides* revealed through its genome, transcriptomes, and proteomes. *BMC Genomics* 15:582.

24. GARGOURI, M., PARK, J.J. and HOLGGUIN, FO. (2015). Identification of regulatory network hubs that control lipid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Exp Bot* 66:4551–4566.
25. GARIBAY-HERNÁNDEZ, A., VÁZQUEZ-DUHALT, R., SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M., y MARTÍNEZ-JIMENEZ, A. (2009). Biodiesel a partir de Microalgas. *Soc Mex Biotecnol Bioingeniería*.;13:38-61.
26. GIMPEL, J.A., SPECHT, E.A., GEORGIANNA, D.R. and MAYFIELD S.P. (2013). Advances in microalgae engineering and synthetic biology applications for biofuel production. *Curr Opin Chem Biol* 17:489–495.
27. GOMES DE OLIVEIRA, Dal’Molin C., QUEK, L.E., PALFREYMAN, RW. and NIELSEN, L.K. (2011). ALGA GEM – a genome-scale metabolic reconstruction of algae based on the *Chlamydomonas reinhardtii* genome. *BMC Genomics* 12:S5.
28. GOUVEIA, L. and OLIVEIRA, A. (2009). Microalgae as a raw material for biodiesel production. *J Ind Microbiol Biotechnol*.;36(2):269-74.
29. GRIFFITHS, M., and HARRISON, T. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycolgy*.;21(5):493 - 507.
30. GROSSMAN, A.R., HARRIS, E.E. and HAUSER, C. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* at the Crossroads of Genomics. *Eukaryot Cell* 2:1137–1150.
31. GUARNIERI, M., NAG, A., SMOLINSKI, S., DARZINS, A., SEIBERT, M. and 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.
32. GUARNIERI, M.T., NAG, A. and SMOLINSKI, S.L. (2011). Examination of triacylglycerol biosynthetic pathways via de novo transcriptomic and proteomic analyses in an unsequenced microalga. *PloS One* 6:e25851.
33. HARISKOS, I. and POSTEN, C. (2014). Biorefinery of microalgae - opportunities and constraints for different production scenarios. *Biotechnol J*. 9(6):739-752.
34. HARRIS, E.H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 52:363-406.
35. HLAVOVA, M., TUROCZY, Z. and BISOVA K. (2015). Improving microalgae for biotechnology — From genetics to synthetic biology. *Biotechnol Adv* 33:1194–1203.

36. ILLMAN, A.M., SCRAGG, A.H. and SHALES, S.W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Technol.*;27(8):631-5.
37. ISLETEN, M., GULTEPE, I. and ELIBOL, M. (2012). Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochem Eng J*;61:11-9.
38. JIANG, Y., YOSHIDA, T. and QUIGG, A. (2012). Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. *Plant Physiol*;54:70-7.
39. KHOZIN, I. and COHEN, Z. (2011). Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification; *J. Biochimie* 93: 91-100.
40. KOID, A., LIU, Z., TERRADO, R., JONES, A., CARON, D. and HEIDELBERG, K. (2014). Comparative Transcriptome Analysis of Four Prymnesiophyte Algae; *Journal: Plos one*, 9 (6): e97801.
41. LEE, D.Y., PARK, J.J., BARUPAL, D.K. and FIEHN, O. (2012). System response of metabolic networks in *Chlamydomonas reinhardtii* to total available ammonium. *Mol Cell Proteomics MCP.*;11(10):973-88.
42. LI, L., ZHANG, G. and WANG, Q. (2016). De novo transcriptomic analysis of *Chlorella sorokiniana* reveals differential genes expression in photosynthetic carbon fixation and lipid production. *BMC Microbiol* 16:223. doi: 10.1186/s12866-016-0839-8
43. LI, Q., Du, W. and LIU, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.*;80:749-56.
44. LI, Y., HAN, D. and HU, G. (2010). *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metab Eng* 12:387–391.
45. LIN, Q., and LIN, J. (2011). Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresour Technol.*;102(2):1615-21.
46. LIU, J., YUAN, C., HU, G., and LI, F. (2012). Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. *Appl Biochem Biotechnol.*;166(8):2127-37.
47. LIU, Y., SHIN, H., LI, J. and LIU, L. (2015). Toward metabolic engineering in the context of system biology and synthetic biology: advances and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:1109–1118.

48. LIU, Z.Y., WANG, G.C, and ZHOU, B.C. (2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol.*;99(11):4717-22.
49. LV, H., QU, G., QI, X., LU, L., TIAN, C. and MAHEXIN, Y. (2013). Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* during the process of lipid accumulation; *Genomics* 101: 229–237.
50. MADIGAN, M., MARTINKO, J., PARKER, J. y BROCK. (1999). *Biología de los microorganismos*. (8^a ed.). Madrid: Prentice Hall;
51. MATSOGLOU, I., KOIZUMI T. and FELIX, E. (2013). The status of bioenergy development in developing countries. *Glob Food Secur.*;2(2):104-9.
52. MAY, P., WIENKOOP, S. and KEMPA, S. (2008). Metabolomics- and Proteomics-Assisted Genome Annotation and Analysis of the Draft Metabolic Network of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 179:157–166.
53. MERCHANT, S.S., PROCHNIK, S.E. and VALLON, O. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318:245–250.
54. MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINAS. (2014). Base Legal - Biocombustibles [Internet]. [citado 20 de junio de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.minem.gob.pe/detalle.php?idSector=5&idTitular=4829&idMenu=ub550&idCateg=869>
55. MUTANDA, T., BUX F., RAMESH, D., KARTHIKEYAN, S., KUMARI, S. and ANANDRAJ, A. (2010). Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresour Techn.*;102 (1):57-70.
56. NG, C.Y., KHODAYARI, A., CHOWDHURY, A., MARANAS, C.D. (2015). Advances in de novo strain design using integrated systems and synthetic biology tools. *Curr Opin Chem Biol* 28:105–114.
57. OHLROGGE, J. and BROWSE, J. (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell*. 7(7):957-970.
58. PAREDES, J., COBOS, M., y CASTRO, J. (2016). Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. *Acta Biol. Colomb.*, 21(1):17-26.
59. PRUVOST, J., VAN, VOOREN, G., COGNE, G. and LEGRAND, J. (2009). Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresour Technol.*;100(23):598Bf8-5995.
60. RADAKOVITS, R., EDUAFO, P.M. and POSEWITZ, M.C. (2011). Genetic engineering of fatty acid chain length in *Phaeodactylum tricornutum*. *Metab Eng* 13:89–95.

61. RADAKOVITS, R., JINKERSON, R.E., FUERSTENBERG, S.I., TAE H., SETTLAGE, R.E. and BOORE, J.L. (2012). Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nat Commun.*;3:686.
62. REIJNDERS, MJMF, VAN, HECK, RGA, LAM and CMC. (2014). Green genes: bioinformatics and systems-biology innovations drive algal biotechnology. *Trends Biotechnol* 32:617–626.
63. RISMANI, H., HAZNEDAROGLU, B., BIBBY, K. and 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
64. RISMANI, H., HAZNEDAROGLU, B., HSIN, C. and PECCIA, J. (2012). Transcriptomic analysis of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* reveals metabolic insights into triacylglyceride accumulation; *J. Biotechnology for Biofuels* 5:74.
65. RISMANI-YAZDI, H., HAZNEDAROGLU, B.Z, BIBBY, K. and PECCIA, J. (2011). Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. *BMC Genomics* 12:148.
66. RISMANI-YAZDI, H., HAZNEDAROGLU, B.Z., HSIN, C. and PECCIA, J. (2012). Transcriptomic analysis of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* reveals metabolic insights into triacylglyceride accumulation. *Biotechnol Biofuels* 5:74.
67. RODOLFI, L., ZITELLI, C., BASSI, N., PADOVANI, G., BIONDI, N., BONINI, G., and TREDICI, M.R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.*;102(1):100-12.
68. ROSENBERG, J.N., OYLER, G.A., WILKINSON, L. and BETENBAUGH, M.J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution.;19:430-436.
69. RUANGSOMBOON, S. (2012). Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. *Bioresour Technol.*;109:261.
70. SASSO, S., POHNERT, G. and LOHR, M., (2012). Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. *FEMS Microbiol Rev* 36:761–785.
71. SHANG. C. BI, G. and YUAN, Z. (2016). Discovery of genes for production of biofuels through transcriptome sequencing of *Dunaliella parva*. *Algal Res* 13:318–326.

72. SHEN, Y., YUAN, W., PEI, Z. and MAO, E. (2010). Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. *Appl Biochem Biotechnol.*;160(6):1674-84.
73. SING, J. and GU, S. (2010). Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew Sustain Energy Rev.* 14(9):2596-610
74. SINGH, S., KATE, B.N. and BANERJEE, U.C. (2005). Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Crit Rev Biotechnol* 25:73–95.
75. SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C. DURAN, E. and ISAMBERT, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101:87–96.
76. STEPHENS, E., ROSS, IL., MUSSGNUG, J.H., WAGNER, L.D., BOROWITZKA, M.A. and POSTEN, C. (2010). Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends plant Sci.* 15(10):554-64.
77. SUBRAHMANYAN, S. and CRONAN JR., J.E. (1998). Overproduction of a functional fatty acid biosynthetic enzyme block fatty acid synthesis in *Escherichia coli*. *Journal Bacteriol.* (180(17)):4596-602.
78. TAKAGI, M., KARSENKO, and YOSHIDA, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cell. *J Biosci Bioeng.*101 (3):223 -226.
79. TANAKA, T., MAEDA, Y. and VELUCHAMY, A., (2015). Oil accumulation by the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* as revealed by the genome and transcriptome. *Plant Cell* 27:162–176.
80. TRENTACOSTE, E.M., SHRESTHA, R.P. and SMITH, S.R., (2013). Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth. *Proc Natl Acad Sci* 110:19748–19753.
81. VERMA, N., MEHROTRA, S., SHUKLA, A. and MISHRA, B. (2010). Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *Afr J Biotechnol.* 9(10):1402-11.
82. YEH, K.L. and CHANG, J.S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresour Technol.*105:120-7.
83. YU, M. YANG, S. and LIN, X. (2016). 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* 25:69–74.