



UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ

Facultad de Ciencias e Ingeniería

Escuela Profesional de Ecología

TESIS

**Influencia del nitrato en el nivel de expresión del
gen Acetil CoA Carboxilasa y la producción de
lípidos en microalgas oleaginosas de la Amazonía
Peruana**

Presentado por:

SEGUNDO LEVI ESTELA MORENO

Tesis para optar el Título Profesional de:

LICENCIADO EN ECOLOGÍA

IQUITOS - PERÚ

2017

DEDICATORIA

A Dios, porque me da la vida, las fuerzas y su amor, Él hace las cosas siempre perfectas.

A mis padres Levi Estela Rodríguez y Ruth Moreno Luca, Por su amor y apoyo incondicional

A mis hermanos Daniel Estela y Tabita Estela, por ser mi soporte y ayuda en todo este tiempo

AGRADECIMIENTO

Al proyecto de investigación “Secuenciamiento y anotación del transcriptoma de microalgas oleaginosas de la amazonía peruana promisorias para la producción sustentable de biodiésel: 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.

A mi asesora, la Dra. Marianela Cobos Ruiz por brindarme la oportunidad de realizar la presente tesis a través del proyecto ya mencionado y su paciencia, dedicación y conocimiento que me brindó durante todo el proceso. A usted mis más sinceros agradecimientos.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú por permitirnos el uso de sus equipos, materiales y reactivos además de proporcionarnos las microalgas oleaginosas que fueron utilizadas en el proceso de experimentación.

Al Dr. Jorge Luis 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 que a través del investigador el Dr. Juan Carlos Castro Gómez me facilitaron el uso de equipos necesarios para el proceso de extracción de lípidos totales.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio, Diana Paredes, María Casuso, Sheyla Pérez, Napoleón Rodríguez, Brucee Jiu, Joe Petterman, Diego Flores, Piere Manzur, Carlos Tenorio, por el apoyo brindado durante el proceso de realización de la tesis en el laboratorio,

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

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



Dr. Álvaro Benjamín Tresierra Ayala
PRESIDENTE



Dr. Jorge Luis Marapara del Águila
MIEMBRO DEL JURADO



Dr. Juan Carlos Castro Gómez
MIEMBRO DEL JURADO



Dra. Mariamela Cobos Ruiz
ASESORA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Iquitos, a las 11:00 horas del día viernes 30 de junio del año 2017, se reunió el Jurado Examinador, que firma al final del presente documento, para evaluar la Sustentación del bachiller en Ecología:

SEGUNDO LEVI ESTELA MORENO

En la modalidad de: **SUSTENTACIÓN DE TESIS**

"Influencia del nitrato en el nivel de expresión del gen Acetil CoA Carboxilasa y la producción de lípidos en microalgas oleaginosas de la amazonía peruana"

Después de las deliberaciones correspondientes, se procedió a evaluar:

Indicador	Examinador 1	Examinador 2	Examinador 3	Promedio
A) Dominio del Tema	18	18	19	18
B) Calidad de Redacción de la Tesis	18	18	18	18
C) Competencia Expositiva (Claridad conceptual, argumentación y coherencia)	18	18	18	18
D) Calidad de Respuestas	18	18	18	18
E) Uso de Terminología Especializada	18	18	18	18
Calificación Final:				18

Aprobado Por: Excelencia

Calificación Final (en letras): Dieciocho

Presidente: Dr. Álvaro Tresierra Ayala
Miembro: Dr. Jorge Marapara Del Águila
Miembro: Dr. Juan Carlos Castro Gómez

INDICADOR	PUNTAJE
Desaprobado	Menos de 13 puntos
Aprobado por Mayoría	De 14 a 15 puntos
Aprobado por Unanimidad	De 16 a 17 puntos
Aprobado por Excelencia	De 18 a más puntos

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	iv
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS	v
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	13
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO II	15
OBJETIVOS	15
CAPÍTULO III	16
MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL	15
3.1 Marco teórico	16
3.1.2 Generalidades de las microalgas	16
3.1.3 Clasificación de las microalgas	17
3.1.3.1 Cyanophyta	17
3.1.3.2 Chlorophyta	17
3.1.3.3 Cryptophyta	17
3.1.3.4 Chrysophyta	17
3.1.3.5 Pyrrophyta	18
3.1.3.6 Euglenophyta	18
3.1.4. Microalgas oleaginosas	18
3.1.5 Aceites vegetales de microalgas	20
3.1.6 Lípidos en microalgas	21
3.1.7 Ácidos grasos: Biosíntesis y factores que inducen a la acumulación	22
3.2 Definición de términos básicos	27
CAPÍTULO IV	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Lugar y desarrollo de la investigación	29
4.2 Recursos utilizados	29
4.2.1 Materiales	29
4.2.2 Equipos	30

4.2.3	Reactivos	30
4.2.4	Programas	32
4.3	Diseño de la investigación	32
4.4	Población y muestra	34
4.4.1	Población	34
4.4.2	Muestra	34
4.5	Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos	34
4.5.1	Técnica de recolección de datos	34
4.5.2	Instrumento de recolección de datos	34
4.5.3	Procedimiento Experimental	35
4.5.3.1	Experimentos de la inducción de la producción de lípidos	35
4.5.3.2	Extracción y análisis de lípidos totales	35
4.6	Purificación del ARN total	36
4.6.1	Análisis electroforético y espectrofotométrico del ARN	37
4.6.2	Búsqueda de secuencias homologas de la sub unidad alfa del gen Acetil CoA carboxilasa	37
4.6.3	Diseño de cebadores para qPCR	38
4.6.4	Transcripción Reversa	38
4.6.5	PCR en tiempo real	39
4.6.6	Análisis e interpretación de datos	39
CAPÍTULO V		41
RESULTADOS		41
5.1	Purificación del ARN total	41
5.1.1	Extracción y cuantificación del ARN	41
5.2	Nivel de expresión del gen Acetil CoA carboxilasa en las microalgas <i>Ankistrodesmus</i> sp, <i>Chlorella</i> sp y <i>Scenedesmus</i> sp. cultivadas en medio Chu-10 con y sin nitrógeno	42
5.2.1	Expresión del gen $Acc\alpha$ en las tres especies microalgales	42
5.3	Relación entre el nivel de expresión del gen $Acc\alpha$ con la producción de lípidos en las tres especies de microalgas	43
5.3.1	Producción de lípidos	43
5.3.2.	Expresión de genes y producción de lípidos totales	43

CAPÍTULO VI	45
DISCUSIÓN	45
CAPÍTULO VII	47
CONCLUSIONES	47
CAPÍTULO VIII	48
RECOMENDACIONES	48
CAPÍTULO IX	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	Título	Pág.
1	Principales ácidos grasos descritos en microalgas	23
2	Valores de producción de lípidos totales y expresión de genes	44
3	Características de los cebadores diseñados para los genes de estudio	56
4	Resultados del ANOVA de la expresión del gen <i>Accα</i> y <i>GAPH</i> en microalgas.	56
5	Resultados de Anova de un factor de las microalgas oleaginosas	56
6	Resultados de las comparaciones múltiples (Prueba HSD de Tukey) para determinar diferencias significativas en la expresión de los genes <i>Accα</i> y <i>GADPH</i> .	57
7	Resultados de prueba de HSD de Tukey de los subconjuntos homogéneos de las tres especies de microalgas.	58
8	Resultados de prueba T de <i>Ankistrodesmus</i> Sp.	58
9	Resultados de prueba T de muestras independientes de <i>Ankistrodesmus</i> Sp.	58
10	Resultados de prueba T de <i>Chlorella</i> Sp.	59
11	Resultados de prueba de muestras independientes de <i>Chlorella</i> Sp.	59
12	Resultados de prueba T de <i>Scenedesmus</i> Sp.	59
13	Resultados de prueba de muestras independientes de <i>Scenedesmus</i> Sp .	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Título	Pág.
1	Estructura y componentes de los TAG.	22
2	Ruta de biosíntesis de ácidos grasos y TAG (<i>Kennedy pathway</i>). Reacciones enzimáticas:	24
3	Flujograma metodológico empleado en la investigación	33
4	Gel de agarosa al 1% mostrando bandas de ARN de las tres especies de microalgas estudiadas.	41
5	Expresión relativa de los genes en las especies de microalgas evaluadas. En ella se muestra las veces de incremento por especie	42
6	Contenido de lípidos totales (%) de las tres especies microalgas	43
7	Extracción de lípidos totales	54
8	Sembrado de muestras en geles de agarosa	54
9	Procesamiento de muestras para PCR en tiempo real (qPCR)	54
10	Condiciones del RT – PCR	55
11	Condiciones del PCR en tiempo real (qPCR)	55
12	Perfiles de fluorescencia de la amplificación del PCR en tiempo real (qPCR) del gen de referencia GADPH, de las tres especies de microalgas estudiadas	55

RESUMEN

Actualmente las microalgas se han convertido en la alternativa más viable para la producción de biocombustibles debido a que presentan 30 veces más lípidos por hectárea que las mismas plantas terrestres usados con tales fines. Además, como una enzima clave, la comprensión crítica de ACCase en la síntesis de lípidos es un requisito indispensable para obtener más eficiencia en el uso de microalgas como bioproductos derivados de lípidos. El objetivo de esta investigación fue determinar la influencia del nitrato en el nivel de expresión del gen Acetil-CoA Carboxilasa y la producción de lípidos en microalgas oleaginosas de la Amazonía Peruana. La biomasa microalgal fue proporcionado por el laboratorio de biotecnología y bioenergética de la universidad científica del Perú, con las cuales se realizó la extracción y análisis de lípidos totales además se purificó y cuantificó el ARN total de alta calidad, lo cual nos permitió desarrollar diversas pruebas moleculares, tales como la expresión de los genes, obteniendo niveles de expresión relativa de hasta ~16 veces más copias de ARNm en tratamientos sin nitrógeno. En conclusión, en las tres especies de microalgas *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. cultivadas sin nitrógeno, muestran una mayor producción de lípidos totales y expresión relativa de los genes.

Palabras clave: Microalgas, Lípidos, ARN Total, expresión de genes, Acetil CoA carboxilasa.

ABSTRACT

Microalgae have now become the most viable alternative for the production of biofuels because it has high levels of lipid content, 30 times more lipids per hectare than the same terrestrial plants used for such purposes. In addition, as a key enzyme, the critical understanding of ACCase in lipid synthesis is an indispensable requirement to obtain more efficiency in the use of microalgae as lipid-derived bioproducts. The objective of this research was to determine the influence of nitrate on the level of expression of the Acetyl-CoA Carboxylase gene and the production of lipids in oil microalgae of the Peruvian Amazon. The microalgal biomass was provided by the biotechnology and bioenergetics laboratory of the Peruvian scientific university, with which the extraction and analysis of total lipids was carried out. In addition, high total RNA was purified and quantified, which allowed us to develop various tests Such as expression of genes, obtaining relative expression levels of up to ~ 16 times more copies of mRNA in treatments without nitrogen. In conclusion, in the three species of microalgae *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. And *Scenedesmus* sp. Cultured without nitrogen, show a higher production of total lipids and relative expression of the genes.

Key words: Microalgae, Lipids, Total RNA, gene expression, Acetyl CoA carboxylase.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Uno de los retos más importantes que enfrentará la sociedad en las próximas décadas será cubrir la creciente demanda de energías de forma segura, sustentables, renovables y amigables con el ambiente, que además posibiliten la captura de CO₂ (1). Una excelente alternativa nos ofrece las microalgas oleaginosas por varias razones. Primero, por su rápido crecimiento y gran eficiencia fotobiosintética de triglicéridos (2,3), que son la materia prima para obtener el biodiésel. Segundo, porque pueden proporcionar productividades mayores de 10 a 100 veces que los cultivos de plantas oleaginosas (4). Tercero, debido a que actúan como sumideros de CO₂ pueden contribuir a disminuir el calentamiento global (5,6). Cuarto, porque demandan menos áreas que los cultivos de oleaginosas (7) y pueden usar aguas servidas para generar biocombustibles como biodiésel, bioetanol y biometanol (8,9). También, en biorefinerías microalgales es posible la producción de diversas sustancias de valor farmacéutico, nutracéutico, entre otros (10,11).

Pero aún existen varias limitaciones tecnológicas, económicas y en el conocimiento científico básico que necesitan ser resueltos (12,13). Por ejemplo, numerosos estudios referente a los efectos de factores fisicoquímicos (p.ej. temperatura, intensidad de luz, concentración de nitrógeno, etc.) en la acumulación de lípidos microalgales han sido documentados en la literatura científica (14,15). Sin embargo, debido a los vacíos en el conocimiento científico básico nuestra comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el control metabólico (anabolismo y catabolismo) de la acumulación de lípidos microalgales es limitado, porque sólo se conocen algunos aspectos de respuestas al estrés fisiológico a nivel molecular de la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* (16, 17). Asimismo, sólo de algunas especies de microalgas marinas se han secuenciado,

ensamblado y anotado sus genomas (18,19) y transcriptomas (20,21). En consecuencia, los conocimientos científicos básicos requeridos para mejorar la producción de lípidos microalgales, particularmente de especies amazónicas, son inexistentes.

Consecuentemente, al demostrar que el gen que codifica la enzima acetil-CoA carboxilasa es responsable de la acumulación de triglicéridos, se podrá establecer las bases científicas para la mejora genética de estas especies. Además, toda esta información aportará significativamente al estado del arte y en el futuro permitirá el incremento en la producción de biodiésel y la mejora del nivel socioeconómico local regional y nacional.

Por lo que el objetivo de la presente tesis fue determinar la influencia del nitrato en el nivel de expresión del gen Acetil-CoA Carboxilasa y la producción de lípidos en microalgas oleaginosas de la amazonía peruana; partiendo de la siguiente hipótesis: ¿El nitrato influye en el nivel de expresión del gen Acetil- CoA carboxilasa y por ende en la producción de lípidos?

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. General

- Determinar la influencia del nitrato en el nivel de expresión del gen Acetil-CoA Carboxilasa y la producción de lípidos en microalgas oleaginosas de la amazonía peruana

2.2. Específicos

- Evaluar el nivel de expresión del gen Acetil-CoA Carboxilasa en las microalgas *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. cultivadas en medio Chu N° 10 con y sin nitrógeno
- Conocer la relación entre el nivel de expresión del gen Acetil-CoA Carboxilasa en las microalgas *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. y la producción de lípidos

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

3.1. Marco teórico

3.1.2 Generalidades de las microalgas.

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes (cianobacterias) y eucariontes, que se localizan en hábitats diversos como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo. Los grupos que las conforman presentan individuos con notables similitudes morfológicas, pero versátiles en términos de tamaño, forma y función ecológica las cuales surgen como respuestas adaptativas convergentes al medio físico en el que habitan tales como el rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (22) se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta (23).

Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 especies, aunque se estima que existen más de 100,000, muchas de ellas se desconoce su composición bioquímica y metabolismo. Las microalgas se clasifican de acuerdo a varios parámetros: pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular; solo las formas más pequeñas tienden a ser redondeadas; las medianas y las grandes muestran algún grado de alargamiento o poseen apéndices, prolongaciones, cuernos, espinas y otras estructuras que aumentan tanto la fricción con el agua como la relación superficie/volumen para la absorción de nutrientes. Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verdes y a las diatomeas (24, 25,26).

Los ciclos de vida son cortos e incluyen la formación de esporas de resistencia o de células de reposo, con lo cual sobreviven en situaciones desfavorables, su nutrición es por absorción iónica de Carbono (C), Hidrógeno (H), Oxígeno (O), Nitrógeno (N), Fósforo (P), Azufre (S), Potasio (K), Calcio (Ca), Hierro (Fe), Magnesio (Mg), así como de cantidades traza de Manganeseo (Mn), Boro (B), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Zinc (Zn) y Molibdeno (Mo); si bien,

para algunas especies son necesarias otras moléculas inorgánicas y orgánicas complejas. De los grupos que las conforman, las cianofitas, clorofitas, crisófitas, euglenofitas y diatomeas pennales son más comunes en las aguas dulces.

3.1.3 Clasificación de las microalgas.

Los primeros intentos por clasificar los grupos de microalgas se basaron en la pigmentación, cuya importancia todavía no se reconoce cuando se hablan de los distintos grupos de microalgas. Hoy en día, se consideran también las siguientes características importantes para definir los principales grupos de microalgas: morfología (presencia o ausencia de flagelos), características del flagelo (numero, longitud, punto de intersección, presencia o ausencia de pelos o escamas), composición de la pared celular y tipos de productos fotosintéticos almacenados. Hasta hoy en día, existen muchas variables que son temas de discusión para la clasificación de las microalgas; se dice que existen casi tantos esquemas de clasificación como autores sobre el tema. Las clases son agrupadas de acuerdo con el esquema de Canell (27).

Las microalgas se dividen en los siguientes grupos:

3.1.3.1 Cyanophyta

Conocidas comúnmente como algas verdes azuladas. Al igual que las bacterias, son organismos procariotas, cuyas células no presentan sistemas de membranas internas que aislen los organelos del citoplasma.

3.1.3.2 Chlorophyta

Son las conocidas como algas verdes, con cloroplastos de este color muy bien definidos, con formas y localizaciones celulares diferentes.

3.1.3.3 Cryptophyta.

Las células son a menudo unicelulares y flageladas, con plastos generalmente de color marrón, aunque los hay verdes, amarillos o verde azulados. Las células presentan una forma particular, con frecuencia aplanada, y dos flagelos casi iguales.

3.1.3.4 Chrysophyta.

Individuos unicelulares o coloniales, raramente filamentosos. Presentan plastos de color amarillo o marrón, a menudo verdosos, por lo que se conocen vulgarmente como algas de color dorado. Existen multitud de formas diversas. Las células se encuentran impregnadas en sílice formando valvas que suelen situarse a modo de caja, y que pueden presentar una ornamentación característica de cada especie.

3.1.3.5 Pyrrophyta.

En general son células flageladas móviles, aunque hay especies cocoides inmóviles. Las células suelen presentar una hendidura ecuatorial en la que se insertan dos flagelos, uno transversal y otro longitudinalmente.

3.1.3.6 Euglenophyta.

Incluye todas las formas unicelulares, solitarias, desnudas o loricadas (cubierta formada por escamas), que nadan libremente, provistas de 1, 2, 3 ó 7 flagelos dispuestos de forma variada.

3.1.4 Microalgas oleaginosas.

Son microalgas que poseen ácidos grasos como componentes de su membrana, productos de almacenamiento, metabolitos y fuente de energía (28). Es por esa razón que estos microorganismos representan una opción como materia prima para producir biodiésel, debido a la mayor productividad de biomasa y mayor velocidad de replicación con respecto a plantas cultivables (29), algunas especies de microalgas pueden acumular entre 20-80% (peso seco) de triglicéridos (30), y no requieren terrenos cultivables para el crecimiento celular no compitiendo por alimento humano (31).

Para la producción exitosa de biodiésel empleando microalgas como sistemas biológicos para la acumulación de biomasa y lípidos, el primer punto crítico es buscar e identificar cepas híper productoras de lípidos (32). A pesar de que el intervalo de lípidos contenidos en microalgas oscila entre 1-75% (peso seco), algunas especies pueden alcanzar hasta el 90% (peso seco) bajo condiciones específicas de cultivo (29).

Para elegir una cepa se debe considerar una estrategia de selección en base a diversos criterios que sean prácticos a los siguientes problemas: 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 (33).

Las microalgas con elevadas productividades lipídicas son deseables para la elaboración de biodiésel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica y la robustez del microorganismo, son parámetros relevantes para su selección. La determinación del contenido oleaginoso de las microalgas resulta complicada a causa de su variación ante condiciones distintas de cultivo; el crecimiento en ambientes desfavorables o bajo situaciones de estrés, frecuentemente conlleva al incremento de la fracción lipídica, aunque en detrimento de la productividad lipídica del cultivo. Los lípidos comprendidos en las microalgas por lo general constituyen del 20 al 50 % de su peso seco, sin embargo, se han reportado valores en un rango del 1 al 80 %, o incluso superiores. Las especies que producen más de un 30 % de materias grasas se denominan ‘oleaginosas’ (25).

Los grupos taxonómicos a los cuales pertenecen las microalgas oleaginosas son diversos. En los ejemplares eucariontes, el contenido lipídico es considerado como propio de la especie y no del género, de manera tal que este parámetro varía notablemente entre las especies individuales de cada grupo taxonómico. No obstante, es posible generalizar que microalgas oleaginosas eucariontes de grupos diversos (clorofitas, diatomeas, crisofitas, haptofitas, eustigmatofitas, dinofitas, xantofitas y rodofitas) presentan, bajo condiciones normales de

cultivo, una fracción lipídica promedio del 25.1 %, magnitud que es superior (45 %) en situaciones de estrés (26). Cabe destacar que la ubicuidad de las algas verdes (clorofitas) en hábitats diversos, además de la facilidad para su aislamiento y desarrollo en condiciones de laboratorio, ha favorecido la identificación de numerosas especies oleaginosas en este grupo, condición que no necesariamente es distintiva del mismo. Las cianobacterias por su parte presentan bajos contenidos lipídicos promedio (26), sin embargo, su aplicación en la producción de biodiésel ha sido sugerida a causa de la producción de lípidos paralela al crecimiento y la sencillez para la manipulación genética que ofrecen, en contraste con las especies eucariontes (34).

Químicamente los lípidos son sustancias de origen biológico que, siendo escasamente solubles en agua, pueden ser extraídas con solventes orgánicos de baja polaridad. Las estructuras de estas biomoléculas comprenden largas cadenas hidrocarbonadas, unidades de isopreno y grupos funcionales diversos (oxigenados principalmente). En las microalgas los principales componentes de la fracción lipídica son triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos (predominantes en membranas cloroplásticas), fosfolípidos (abundantes en plasmalema y diversos sistemas endomembranosos) y pigmentos (carotenoides, clorofilas, ficobilinas, etc.), aunque compuestos inusuales tales como ácidos grasos halogenados e hidroxilados, alquienonas de cadena larga, entre otros.

3.1.5 Aceites Vegetales de Microalgas

La mayoría de los aceites vegetales en las microalgas son triglicéridos. En donde, químicamente, los triglicéridos son los ésteres triacilglicéricos de varios ácidos grasos con glicerol. La composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono y algunas propiedades físicas de los ácidos grasos se mantienen constantes en aceites vegetales y grasas animales por igual. Pero, el problema de

los aceites vegetales a nivel de las microalgas es que estos no se encuentran en cantidades iguales, por lo que cada microalga posee un contenido característico de aceite (1).

No todos los lípidos microalgales son satisfactorios para la producción de biodiésel, sin embargo, los apropiados para ello (ácidos grasos, libres y unidos covalentemente al glicerol y sus derivados son producidos con frecuencia y constituyen la mayor fracción de los lípidos totales, usualmente del 20% al 40% (1). Un perfil de ácidos grasos de cadena larga con un bajo grado de insaturación es deseable para la elaboración de biocombustible de calidad (35).

3.1.6 Lípidos en Microalgas

Bajo el término lípido se incluyen, generalmente, moléculas de origen biológico insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos, como acetona, metanol, éter dietílico, hexano y cloroformo, entre otros. Las principales funciones biológicas de los lípidos incluyen su papel central en el almacenamiento de energía, como componentes estructurales de las membranas celulares, y como importantes moléculas de señalización.

Los lípidos denominados neutros incluyen los TAG (triacilglicéridos). Estos compuestos sirven principalmente como almacenamiento de energía y carbono orgánico. Aparecen en forma de cuerpos oleosos en las células de muchas especies de microalgas. En la mayoría de los casos, los TAG se acumulan en las microalgas cuando sus cultivos se someten a condiciones limitantes para el crecimiento, que suelen denominarse condiciones de estrés e incluyen variaciones en la temperatura, alta irradiación, carencias nutricionales o altas concentraciones de sal en el medio, entre otras. Por tanto, los TAG son una reserva relevante de carbono y energía para el crecimiento de los microorganismos después de estar sometidos a alguna condición de estrés (36, 37, 38). Por otra parte, los lípidos polares desempeñan un papel estructural en la membrana celular y en otros orgánulos, y junto a esta función estructural también pueden operar como moléculas señales o precursores de la biosíntesis de otras (39). Entre los lípidos polares se encuentran moléculas de naturaleza terpenoide que

realizan funciones colectoras de luz y antioxidante en plantas y microalgas, conocidas como pigmentos fotosintéticos.

3.1.7 Ácidos grasos: Biosíntesis y factores que inducen la acumulación

Los triacilglicéridos están formados por tres moléculas de ácidos grasos esterificados con los grupos hidroxilo de una molécula de glicerol. Los ácidos grasos son moléculas formadas por cadenas de carbono que poseen un grupo carboxilo como grupo funcional (Figura 1).

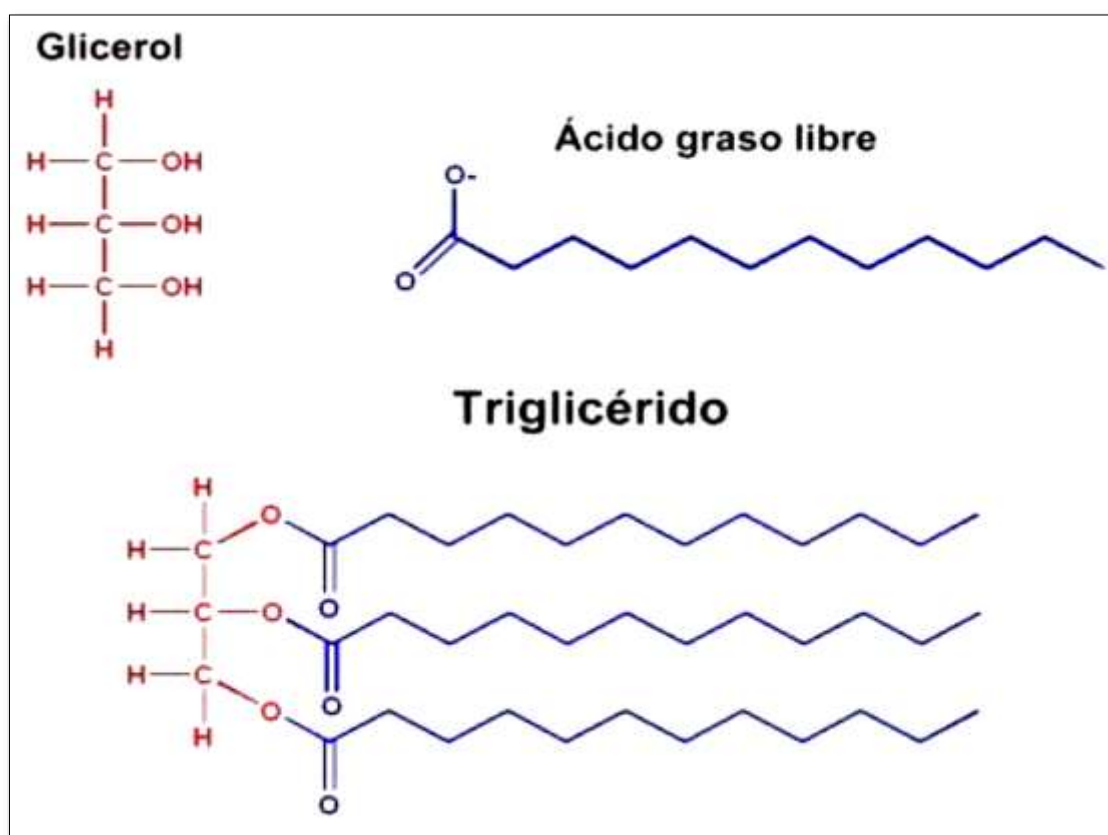


Figura 1. Estructura y componentes de los TAG. El número de carbonos habitualmente es par. Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados, según presenten o no insaturaciones en la cadena alifática. Los ácidos grasos que contienen dos o más dobles enlaces se denominan ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).

Tabla 1. Principales ácidos grasos descritos en microalgas

Nombre común	Ácidos grasos
Ácidos grasos saturados	
Laúrico	C12:0
Mirístico	C14:0
Palmítico	C16:0
Esteárico	C18:0
Ácidos grasos monoinsaturados	
Palmitoléico	C16:1
Oléico	C18:1
Ácidos grasos poliinsaturados	
Linoléico	C18:2
γ -linolénico y α -linolénico	C18:3 ω 6 y C18:3 ω 3
Araquidónico	C20:4 ω 6
Eicosapentaenoico	C20:5 ω 3 (EPA)
Decosaheptaenoico	C22:6 ω (DHA)

Fuente: Monsalve Alexander Guzmán (2013).

La biosíntesis de ácidos grasos tiene lugar en el cloroplasto tal y como se observa en la Figura 1. La primera etapa anabólica está catalizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCase) y combina CO_2 (disuelto como HCO_3^-), ATP y acetil-CoA para formar el malonil-CoA. Esta fuente endógena de acetil-CoA proviene del fosfoenolpiruvato (PEP) de la ruta glucolítica o de la dihidroxiacetona fosfato originada en el ciclo de Calvin. La glucólisis citosólica comienza con la degradación de carbohidratos simples y dando lugar a PEP, que es transportado al cloroplasto para ser convertido en piruvato y posteriormente en acetil-CoA (26). Es en esta etapa donde el malonil-CoA inicia la síntesis de ácidos grasos. La mitad del grupo malonil es usado para la elongación del grupo acilo como donante central.

El siguiente paso es la transacilación, que implica un cofactor, una proteína portadora del grupo acilo (ACP) y dos moléculas de acil-CoA. Mientras que el complejo enzimático malonil-CoA/ACP es altamente específico, acetil-CoA/ACP es de menor afinidad, lo que da

lugar a que pueda reaccionar con otros compuestos de acil-CoA de bajo peso molecular, por ejemplo, el propionil-CoA, dando lugar a un número impar de carbonos y a ramificación de los ácidos grasos. Estos son poco comunes en microalgas y muy típicos en lípidos de bacterias (40).

La formación de TAG tiene lugar en el cloroplasto y en el retículo endoplasmático. El primer paso es la condensación de G3P con una molécula de acil-CoA para formar lisofosfatidato (LPA), de nuevo condensado con otro acil-CoA para producir fosfatidato (PA) y dando lugar a diacilglicerol. El último paso incorpora de nuevo otro acil-CoA a la molécula dando lugar a triacilglicerol. Los TAG son almacenados en cuerpos oleaginosos (41).

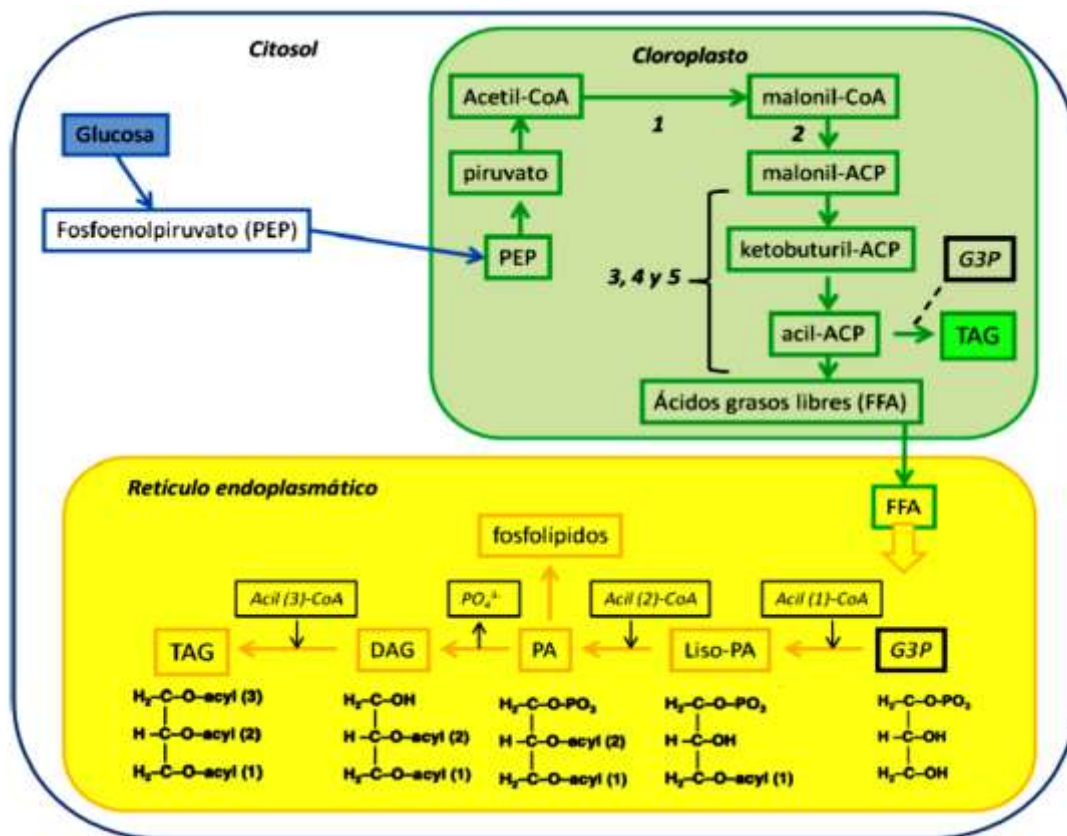


Figura 2. Ruta de biosíntesis de ácidos grasos y TAG (*Kennedy pathway*). Reacciones enzimáticas: (1) ACCase; acetil-CoA-carboxilasa (2) complejo enzimático malonil-CoA/ACP transferasa; (3) 3-ketoacil ACP reductasa; (4) 3-hidroxiacil ACP deshidrogenasa y (5) enoil ACP reductasa. ACP, proteína portadora de grupo acilo; G3P, glicerol-3-fosfato; liso-PA, ácido lisofosfatídico; TAG, triacilgliceridos; DAG, diacilgliceridos. Adaptado y modificado de: Roessler et al. (1994), Ohlrogge y Browse (1995) y Riekhof et al. (2005).

La acumulación de ácidos grasos se produce a partir de diferentes situaciones. Las células pueden ser capaces de reciclar los ácidos grasos a partir de otros componentes celulares, por ejemplo, lípidos de membrana. La decisión de si los lípidos se sintetizan a partir de nuevo carbono asimilado o desde carbono reciclado, depende fuertemente del estado metabólico de la célula. En células de crecimiento rápido, el metabolismo de los lípidos se centra en la síntesis de lípidos de membrana para apoyar dicho crecimiento celular. La mayoría de los lípidos en estas células son sintetizados *de novo*.

Bajo condiciones de estrés, algo más de la mitad de los lípidos durante el aumento del estrés se origina a través de la síntesis de ácidos grasos, mientras que el resto de lípidos acumulados proviene del reciclaje de ácidos grasos existentes, por ejemplo, los que se encuentran en membranas de orgánulos (42). Vale la pena mencionar que las condiciones favorables para la biosíntesis de ácidos grasos y TAG suelen ser estresantes para el metabolismo de la microalga, es decir, dificultan la división celular y por tanto reducen la velocidad de crecimiento (38). Los principales factores químicos que inducen la acumulación son la carencia nutricional, la salinidad y los cambios de pH en el medio nutricional. Factores físicos que también pueden estimular la síntesis de ácidos grasos son la variación en la intensidad de luz y en la temperatura. Tales factores no solo afectan a la acumulación de carbono, sino al crecimiento celular y a la composición de ácidos grasos (26). La abundancia de ácidos grasos respecto a la masa celular y la proporción de saturados e insaturados depende también de la intensidad del estrés aplicado.

Generalmente, la relación entre cantidad de ácidos grasos acumulados y productividad de la biomasa es inversa, y desde el punto de vista aplicado resulta clave determinar el factor y la intensidad adecuados de estrés que favorezcan la acumulación de ácidos grasos sin limitar en extremo la productividad de la biomasa. De esta forma, se conseguirá la mayor productividad posible de ácidos grasos. La carencia de nitrógeno inorgánico es el que más afecta, de entre

los nutrientes, al metabolismo de lípidos en algas. En general, se ha observado en numerosas especies un aumento en la acumulación de TAG como respuesta de la deficiencia de nitrógeno (26). La limitación de fósforo y azufre también supone en muchos casos un aumento de TAG. *Isochrysis galbana*, *Chlamydomonas reinhardtii* o *Chlorella* sp. Son algunos ejemplos (43). Por otro lado, algunos estudios revelan que en cultivos de microalgas y cianobacterias la disminución de la temperatura tiende a aumentar la proporción de los ácidos grasos insaturados, mientras los saturados aumentan con las temperaturas elevadas (44).

3.2. Definición de términos básicos.

Ácidos grasos: Son los componentes característicos de muchos lípidos y rara vez se encuentran libres en las células. Son moléculas formadas por una larga cadena hidrocarbonada de tipo lineal, y con un número par de átomos de carbono. Tienen en un extremo de la cadena un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$).

Acil-CoA carboxilasa: Es una enzima que cataliza la reacción de adición de un grupo bicarbonato al acetato para obtener malonato. Esta reacción consume una molécula de ATP.

Autótrofos: (Organismo) capaz de sintetizar o elaborar su propia materia orgánica a partir de sustancia inorgánica: plantas que tienen clorofila son seres autótrofos.

Biodiésel: Biocombustible líquido que se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, con o sin uso previo, mediante procesos industriales de esterificación y trans esterificación, y que se aplica en la preparación de sustitutos totales o parciales del petrodiesel o gasóleo obtenido del petróleo.

Biomasa: Materia total de los seres que viven en un lugar determinado, expresada en peso por unidad de área o de volumen.

Biosíntesis: La biosíntesis es el conjunto de miles de reacciones químicas que ocurren continuamente en el cuerpo de un ser vivo en el que las moléculas más sencillas forman biomoléculas (moléculas orgánicas) más complejas.

Fotosíntesis: La fotosíntesis consiste en la fabricación de alimentos por medio de la luz. En la fotosíntesis intervienen el agua, las sales minerales, el aire y la energía solar. Los únicos seres vivos capaces de crear su propio alimento son las plantas.

Gen: Es una unidad de información en un locus de Ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica un producto funcional, o Ácido ribonucleico (ARN) o proteínas y es la unidad de herencia molecular.

Lípidos: Son biomoléculas orgánicas formadas básicamente por carbono e hidrógeno y generalmente, en menor proporción, también oxígeno. Además, ocasionalmente pueden contener también fósforo, nitrógeno y azufre.

Medio de cultivo: Solución u otro substrato utilizado para cultivar microorganismos.

Microalgas: Las microalgas son organismos unicelulares microscópicos (2-200 μm), polifiléticos, su metabolismo puede ser autótrofo o heterótrofo y suelen ser eucariontes, aunque las cianobacterias procariontes son frecuentemente incluidas como microalgas Oleaginosas.

Microalgas oleaginosas: son aquellas microalgas que contienen ácidos grasos como componentes de su membrana, productos de almacenamiento, metabolitos y fuente de energía.

Nitrato: El nitrato (NO_3^-) es una materia prima útil para plantas dedicadas a la síntesis de proteínas. El nitrato en concentraciones mayores a los 10mg/L, puede ser tóxico para muchos organismos tanto terrestres como acuáticos.

Nitrógeno: De símbolo N, es un elemento gaseoso que compone la mayor parte de la atmósfera terrestre. Su número atómico es 7 y pertenece al grupo 15 (o VA) de la tabla periódica, el nitrógeno es un gas no tóxico, incoloro e insípido. Puede condensarse en forma de un líquido incoloro que, a su vez, puede comprimirse como un sólido cristalino e incoloro.

Nutrientes: son compuestos orgánicos y productos químicos inorgánicos, tales como CO_2 , nitrógeno y fósforo, aunque también en ocasiones otros minerales como Potasio, Calcio o Manganeseo.

Tasa de crecimiento: Índice de crecimiento diario de la microalga.

Triglicéridos: Los triglicéridos son un tipo de lípidos formados por una molécula de glicerol esterificado con tres ácidos grasos, que suelen ser distintos.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lugar y desarrollo de la investigación.

El cultivo de las microalgas se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP), ubicado en la Av. José Abelardo Quiñones km 2.5, distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto. La extracción de lípidos totales y la expresión diferencial de los genes se realizó en la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonía Peruana (CIRNA - UNAP). Ubicado en la Av. José Abelardo Quiñones km 2,0, pasaje Los Paujiles s/n. AA.HH. Nuevo San Lorenzo del Distrito de San Juan Bautista.

4.2. Recursos utilizados.

4.2.1. Materiales.

- ✓ Alcohol (70 % y 96 %)
- ✓ Frascos Erlenmeyer de 500 y 1000 ml.
- ✓ Gorro
- ✓ Gradillas
- ✓ Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- ✓ Mandil y guantes de laboratorio.
- ✓ Mascarilla
- ✓ Micropipetas de volumen variable (1-10; 10-100; 100-1000 µl.)
- ✓ Microtubos (200 µl, 1.5 ml y 2 ml)
- ✓ Papel de Aluminio
- ✓ Placas Petri (15x 100 mm, Duran).
- ✓ Probetas
- ✓ Puntas de plástico 100,200 y 1000 µl.

- ✓ Tubos de 15 ml

4.2.2. Equipos.

- ✓ Autoclave (Yamato, SM 510)
- ✓ Balanza analítica (Sartorius, ED 124S)
- ✓ Bombas de aireación.
- ✓ Baño María (Labnet)
- ✓ Cámara de fotoregistro (Biometra, F14582JRF)
- ✓ Cámara electroforética de corrida horizontal
- ✓ Cámara de Neubauer.
- ✓ Cabina de flujo laminar (Telstar, Technologies S.L)
- ✓ Centrifuga (Kert Lab, 0412-1)
- ✓ Centrifuga refrigerada (Hettich, Universal 32OR)
- ✓ Congelador a -80°C (Symphony, Dw-86L628)
- ✓ Computadora (HP, Raedon Graphics)
- ✓ Deshionizador (Thermo Scientific, D13321)
- ✓ Estufa (Ecocell 111)
- ✓ Espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Cientific EE. UU)
- ✓ Horno microondas (Samsung, AMW73F-W)
- ✓ Microscopio de fluorescencia (Zeiss, Lab.A1-Ax10)
- ✓ Microscopio óptico (alphaoptics, N-800M)
- ✓ Microcentrifuga refrigerada (Hettich, Mikro 200)
- ✓ Termociclador (eppendorf, modelo ep RealplexS⁴)
- ✓ Termo Bloock (Labnet, D1200)
- ✓ Vórtex (Scientific Industries, SI-T246)

4.2.3. Reactivos.

- ✓ $C_6H_8O_7$ (Ácido cítrico)
- ✓ HCl (Ácido clorhídrico)
- ✓ $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (Ácido etilendiaminotetraacético Sódico)
- ✓ EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético)
- ✓ Alcohol isopropílico
- ✓ Alcohol isoamílico
- ✓ Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- ✓ Carbón activado
- ✓ $C_6H_5FeO_7 \cdot XH_2O$ (Citrato férrico)
- ✓ Cloroformo
- ✓ Ditiotreitól
- ✓ Etanol
- ✓ Espermidina
- ✓ Na_2SiO_3 (Metasilicato de sodio)
- ✓ NaCl (Cloruro de Sodio)
- ✓ $C_6H_9NO_n$ (Polivinilpirrolidona – 40)
- ✓ Rojo de Nilo.
- ✓ $C_{21}H_{39}NO_3$ (Sarkosyl)
- ✓ $C_4H_{11}NO_3$ HCL Tris – Ácido clorhídrico
- ✓ Tris base
- ✓ Tris Glycina
- ✓ Tris Sulfato de Lauril de Sodio
- ✓ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Cloruro de calcio dihidratado)
- ✓ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sulfato de magnesio heptahidratado)
- ✓ $NaHCO_3$ (Bicarbonato de sodio)
- ✓ K_2HPO_4 (Fosfato dipotásico)

- ✓ NaNO_3 (Nitrato de sodio)
- ✓ H_3BO_3 (Ácido bórico)
- ✓ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de cobre (II) pentahidratado)
- ✓ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de zinc heptahidratado)
- ✓ $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Cloruro de calcio hexahidratado)
- ✓ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Cloruro de manganeso tetrahidratado)
- ✓ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Molibdato de sodio dihidratado)

4.2.4. Programas.

- ✓ Bowtie v1.0.1 (Programa de ensamblado de transcriptos)
- ✓ DESeq v2.14 (Programa de análisis de expresión diferencial de gen)
- ✓ Excel de Microsoft Office
- ✓ RSEM v1.2.15 (Programa que calcula la abundancia de los transcritos)
- ✓ SAMtools v1.4 (Programa de contabilización de secuencias alineadas)

4.3. Diseño de la investigación

La investigación fue correlacional porque nos permitió establecer la relación entre la concentración del nitrato en el medio de cultivo y el nivel de expresión del gen Acetil-CoA carboxilasa y la producción de lípidos de las microalgas. El diseño fue de tipo experimental, porque las microalgas fueron cultivadas con y sin nitrógeno. (0 g/100 ml H_2O y 8,5 g/100 ml H_2O , (Figura 3).

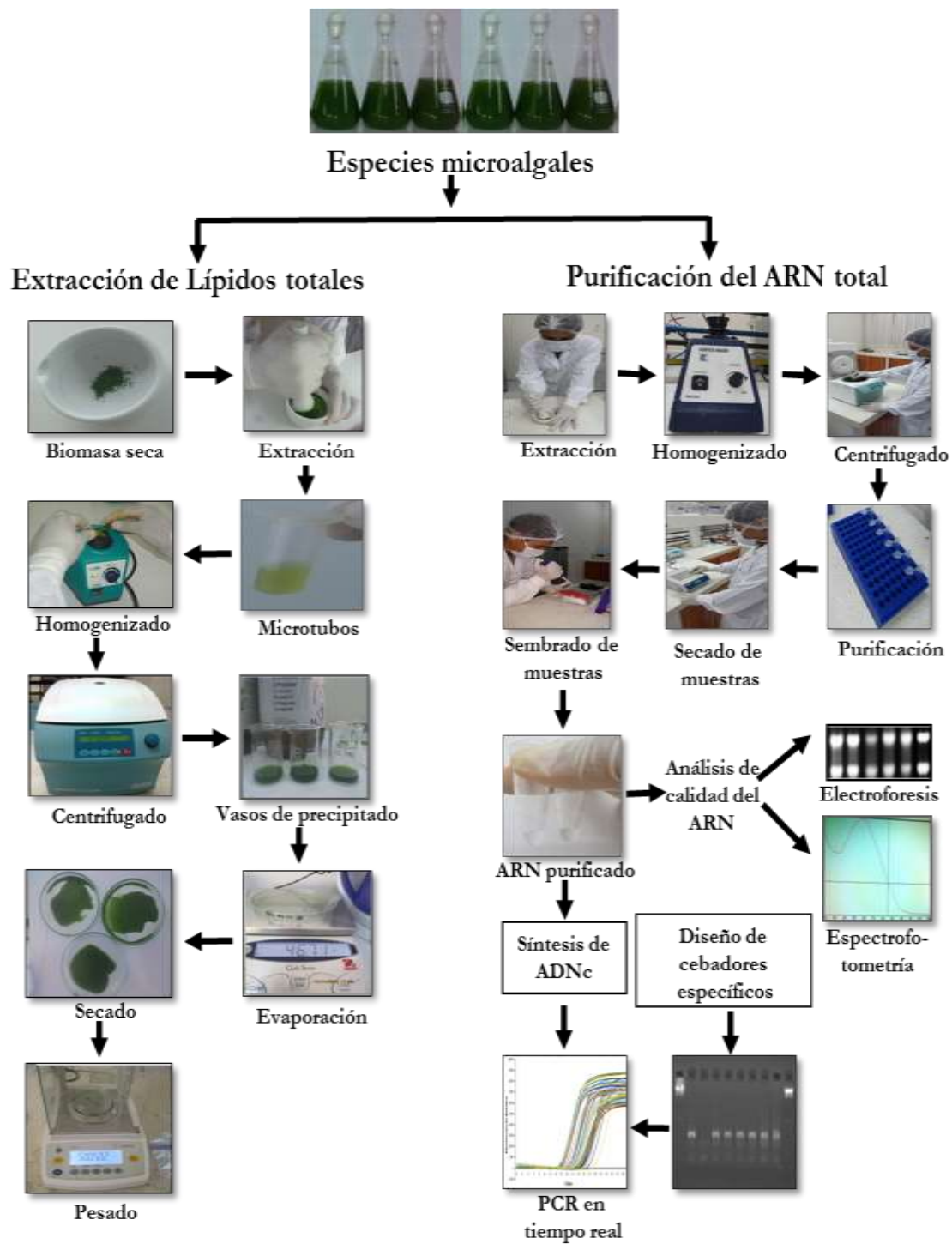


Figura 3: Flujograma metodológico empleado en la investigación

4.4. Población y muestra.

4.4.1. Población.

Estuvieron constituidas por todas las especies de microalgas dulceacuícolas de la amazonía peruana.

4.4.2. Muestra.

La muestra fue representada por tres especies de microalgas oleaginosas (*Ankistrodesmus* sp UCP 0001, *Chlorella* sp UCP 0002. *Scenedesmus* sp UCP 0003.) que fueron proporcionadas por el Banco de Cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP)

4.5. Técnicas, Instrumentos y procedimientos de recolección de datos.

4.5.1. Técnica de recolección de datos:

Para la recolección de datos se utilizó la observación directa y el registro de la información de la cantidad de lípidos totales acumulados por las tres especies de microalgas cultivadas en medio Chu N° 10 con y sin nitrógeno (45). Asimismo, se utilizaron la observación indirecta para estimar el nivel de expresión del gen en las tres especies cultivadas bajo las condiciones indicadas previamente.

4.5.2. Instrumento de recolección de datos:

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) Análisis bioinformáticos: Se utilizó para determinar el nivel de expresión del gen en cada una de las especies microalgales cultivadas en medio Chu N° 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, Nanodrop y computadoras con programas bioinformáticos.

4.5.3. Procedimiento Experimental.

4.5.3.1. Experimentos de la inducción de la producción de Lípidos

Se inoculó 50 mL de resuspensión microalgal (Proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la UCP) por triplicado en frascos Erlenmeyer que contenían 1000 mL de medio Chu N° 10 completo con nitrógeno (+ N) y del mismo modo en tres frascos Erlenmeyer que contenían 150 mL de medio Chu N° 10 sin nitrógeno (- N). Las microalgas se cultivaron en estos medios por siete días en agitación permanente (110 rpm), a 28°C y con una intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Al término de siete días de cultivo se cosechó las microalgas con el procedimiento indicado y de cada frasco se destinó 200 mg de biomasa para la obtención de lípidos totales y determinar el perfil de ácidos grasos. 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 tratamientos.

4.5.3.2. Extracción y análisis de lípidos totales.

La extracción de lípido total se realizó según Yu (46), que consistió en transferir la biomasa seca a morteros para su trituración con 8 mL de una mezcla de cloroformo: metanol (2:1). El extracto obtenido se transfirió a microtubos de 2 mL. La solución se homogenizó en vortex por 30 seg. y centrifugó a 10000g a 4°C por 5 min. La fase clorofórmica se transfirió a vasos de precipitado de peso conocido. Los restos celulares y otros componentes fueron retenidos en la fase intermedia (entre fase acuosa y clorofórmica) y fueron tratados varias veces con la solución extractora de lípidos (cloroformo: metanol) después de su homogenización en el vortex y centrifugación. Todos los extractos con solventes orgánicos fueron filtrados y transferidos al mismo vaso de precipitado. Los solventes orgánicos se evaporaron del vaso de precipitado en un hot plate a 50°C por 4 horas. Luego el componente lipídico retenido en el vaso de precipitado se secó a 50°C por 4 horas. Finalmente, el vaso de precipitado se atemperó a 25°C y se determinó su peso. Por diferencia de peso del vaso de

precipitado con y sin los lípidos se determinó la cantidad de lípidos totales obtenidos con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = \frac{P_L}{P_M} \times 100$$

Dónde: **PL** es el peso seco de los lípidos totales y

PM es el peso seco de las microalgas.

4.6. Purificación del ARN total

La extracción y purificación del ARN se realizó de acuerdo con el protocolo modificado de Castro *et al* (47), que consistió de los siguientes pasos:

En un mortero se colocó 0,25 g. de biomasa microalgal, al cual se le agregó 2,5 mL, de buffer de extracción CTAB pH 8,5 (Tris 300 mM; EDTA 25 mM; NaCl 2M; CTAB 2%; PVP – 40 3%) y 25% de buffer TRIS – SDS pH 8,0 (Tris 300 mM; SDS 3%; PVP – 40 3%; EDTA 100mM; NaCl 2M; Sarkosyl 0,5%). combinados en una proporción 0,75% y 0,25% (atemperados en baño María a 70°C). Además, se agregó 100 µL de 2-mercapto etanol, 20 µL de proteinasa K, 50 µL de carbón activado y 100 mg de arena estéril. Se trituraron las muestras enérgicamente por 8 min. aproximadamente. Posteriormente se transfirió 1 mL del homogenizado a tubos de 2 mL a las cuales se agregó 1 mL de cloroformo alcohol isoamilico (24:1), se homogenizó en vortex, luego los tubos se centrifugaron a 21000 xg a 4°C por 10 min. se transfirió 700 µL del sobrenadante a un nuevo microtubo y se agregó suavemente 300 µL de etanol absoluto, se homogenizó suavemente por inversión de 8 a 10 veces seguidamente se agregó 1 mL de cloroformo alcohol isoamilico (24:1), se homogenizó en vórtex por un minuto, luego se centrifugó a 21000 xg a 4°C por 10 min. seguidamente se transfirió 1 mL de sobrenadante y se agregó 1 mL de cloroformo alcohol isoamilico, se homogenizó en vórtex y centrifugó a 21000 xg a 4°C por 10 min. se transfirió 1 mL de sobrenadante a microtubos de 1,5 mL, se agregó 333 µL de Cloruro de litio (LiCl) 10 M

(concentración final de 2,5 M). se incubó a - 80°C por 1 h, centrifugar a 23000 xg a 4°C por 30 min. se descartó el sobrenadante y resuspendió el precipitado (constituido principalmente por ARN) con 500 µL de LiCl 2 M, se incubó a -20°C por 10 min y centrifugar a 23000 xg a 4°C por 10 min. se descartó el sobrenadante y el ARN precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70%, finalmente se centrifugó a 21000 xg a 4°C por 10 min, se descartó el sobrenadante, evaporó los residuos de etanol en un Termo block a 50°C por 5 min, resuspendió el ARN total con 50 µL de tampón TE, se almacenó a -80°C hasta posteriores análisis.

4.6.1. Análisis electroforético y espectrofotométrico del ARN

Se tomó 5 µL del ARN obtenido y se mezcló con un mismo volumen de Buffer de siembra para ARN en microtubos de 200 µL (RNA Ladder 0,5-10 kb), el cual contiene 47,5% HiDi Formamida, SDS al 0,01%, azul de bromofenol al 0,01%, y EDTA 0,5 mM. La separación de las bandas de ARN ribosomal se comprobó en un gel de agarosa al 1%, los geles fueron teñidos con 2,5 µL de Bromuro de Etidio 1X (48, 49). Se utilizó como solución amortiguadora de corrida el tampón TBE 1X (Tris, ácido bórico 45 mM y EDTA 1 mM) a pH 8,0 y se procedió a correr el ARN a 100 voltios (V) durante 30 min (49). Se observaron las bandas en un transluminador de luz ultravioleta y fotografiada con el equipo Bio Doc Analyze (Biometra, F14582JRF) (Ver Figura N° 4). La calidad y cantidad del ARN total purificado se determinó según Sthephenson (50) con la ayuda de un espectrofotómetro (Thermo Scientific, NanoDrop® 2000). El equipo proporciona automáticamente datos de concentración, absorbancias 260 y 280, ratios de calidad A_{260nm}/A_{280nm} y A_{260nm}/A_{230nm} .

4.6.2. Búsqueda de secuencias homólogas de la subunidad alfa del gen Acetil CoA carboxilasa

Las secuencias ensambladas del transcriptoma de *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, fueron proporcionadas por el proyecto: “Secuenciamiento y anotación del transcriptoma de microalgas oleaginosas de la amazonía peruana promisorias para la producción sustentable de biodiésel: descubrimiento de genes y descripción de vías metabólicas”. Primero se obtuvo

la secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa de la enzima Acetil-CoA carboxilasa de la especie *Chlamidomonas reinhardtii* (51) del GenBank del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nih.gov/genbank/>). Con esta secuencia se buscó homologías con un Basic Local Alignment Search Tool (BLAS), en la base de datos traducida del transcriptoma de *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, empleando el programa BlastStation v2,0 (<https://www.blaststation.com/intl/en/>). La secuencia nucleotídica identificada fue extraída de la base de datos y determinada su secuencia de aminoácido con el programa EMBOSS Transeq (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>), confirmada mediante un análisis de la base de datos del Genbank con el programa protein Blast (<https://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>).

4.6.3. Diseño de cebadores para qPCR

Las secuencias nucleotídicas identificadas con los algoritmos mencionados en el procedimiento anterior (BlastStation v2,0, EMBOSS Transeq, y protein Blast del GenBank), fueron utilizadas para el diseño de los cebadores correspondientes, utilizando el programa PrimerQuest (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>), bajo las siguientes condiciones de diseño. El primer nivel: Temperatura media de fusión (T_m) de 60°C, tamaño del amplicón 100 a 120 pb, correspondiente al gen Acc α f1 y r1, para el gen se espera 70 a 90pb contenido de GC de 35-55% y otros parámetros establecidos en el programa. Los cebadores obtenidos fueron sometidos al segundo nivel: termodinámicamente estables ($\Delta G > -10$). El tercer nivel: Se realizó empleando el algoritmo del programa, que permitió elegir el par de cebadores f1 y r1 cuyos amplicones (productos de PCR) no formaran estructuras secundarias, termodinámicamente estables o estructuras internas que pudieran afectar la eficiencia del PCR a la temperatura de hibridación y extensión de 60°C (Ver figura 11).

4.6.4. Transcripción Reversa

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 6,8 μ L de ARN total (de microalgas), se usó la transcriptasa reversa MuLV y oligo dT 16, 1 μ L, siguiendo las

instrucciones del Kit GeneAmp®-RNA PCR Core (Applied Biosystems). La reacción se efectuó en un termociclador Eppendorf a 25°C por 10 min, 42°C por 60 min, 99°C por 5 min y 4°C por 5 min.

4.6.5. PCR en tiempo real

Este procedimiento se desarrolló para medir el nivel de expresión de los genes de interés. Para la reacción se empleó el SYBR Green PCR Core Kit (Applied Biosystems). Los componentes de la reacción fueron: 2 µL de Buffer 10X; 2,4 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,4 µL de dNTPs Mix 10 mM; 1 µL de cebadores específicos 10 µM; 2 µL de ADNc 10 mM (dilución 1:2), 1 µL de Taq polimerasa y agua csp 20 µL. las condiciones de amplificación, se realizó en un termociclador de tiempo real Eppendorf ep RealplexS⁴ fueron: una temperatura inicial de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto (detección de la señal fluorescente), y para el análisis de la curva de fusión se empleó un ciclo de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos y aumento gradual de la temperatura en 20 minutos hasta 95°C por 15 segundos y 1 ciclo final de 4°C (52). La estabilidad de expresión del gen de referencia para nuestro conjunto de muestras, fue el gliceraldehído-3- Fosfato deshidrogenasa (GAPDH), utilizando el NormFinder software en R (53).

4.6.6. Análisis e interpretación de datos

Los datos de concentración de ácidos grasos y de cuantificación de ARN total fueron almacenados en una base de datos del programa Microsoft Excel 2010. La eficiencia de los cebadores de PCR en tiempo real y el CT de las amplificaciones se determinó con el programa LinRegPCR (54), para tal efecto se realizaron diluciones seriadas del ADNc de 1/2 realizándose el PCR en tiempo real (qPCR) por triplicado. La expresión relativa de los genes (expresión normalizada, NE) en cada tipo de muestra analizada (con y sin nitrógeno) se estimó de acuerdo a Simon (55), con la siguiente ecuación:

$$NE = \frac{(E_{referencia})^{Ct_{referencia}}}{(E_{blanco})^{Ct_{blanco}}}$$

Donde:

NE: expresión normalizada

Ereferencia: eficiencia del PCR para el gen de referencia.

Eblanco: eficiencia del PCR para el gen blanco, de interés.

Ct: ciclo en el que la fluorescencia supera a la fluorescencia basal.

Los análisis estadísticos (promedios, error estándar de la media, ANOVA y la prueba de validación HSD de Tukey y correlación de Pearson) se realizó empleando el programa IBM SPSS Statistics v.21 y los gráficos fueron diseñados en Microsoft Excel 2010.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1. Purificación del ARN total

5.1.1. Extracción y cuantificación del ARN

La metodología empleada nos permitió obtener el ARN de las tres especies de microalgas estudiadas. En la figura 4, se observa un patrón electroforético característico en las tres especies (*Ankistrodesmus* sp., UCP 0001, *Chlorella* sp., UCP 0002 y *Scenedesmus* sp., UCP 0003), con las bandas de ARN ribosomales 28S y 18S de alta calidad, con bandas bien definidas requeridas para la realización del RT-PCR y PCR en tiempo real (qPCR).

Respecto a la cantidad y calidad del ARN obtenido con el proceso de purificación empleado, se logró una mayor concentración promedio de 481.6 ng/ μ L para *Ankistrodesmus* sp (-N) y una menor concentración promedio de 1.56.ng/ μ L para *Scenedesmus* sp (-N). Asimismo, los ratios de calidad a $A_{260}/_{230}$ y $A_{260}/_{280}$ fueron entre 1.59 a 1.10 y 2.02 a 1.79 respectivamente. Estos valores indican que las muestras de ARN purificado fueron de alta pureza ya que supera el rango de valores aceptados, lo cual nos indica que éstos se encontraron libre de contaminantes por ADN, polifenoles, polisacáridos y proteínas. (Figura 04).

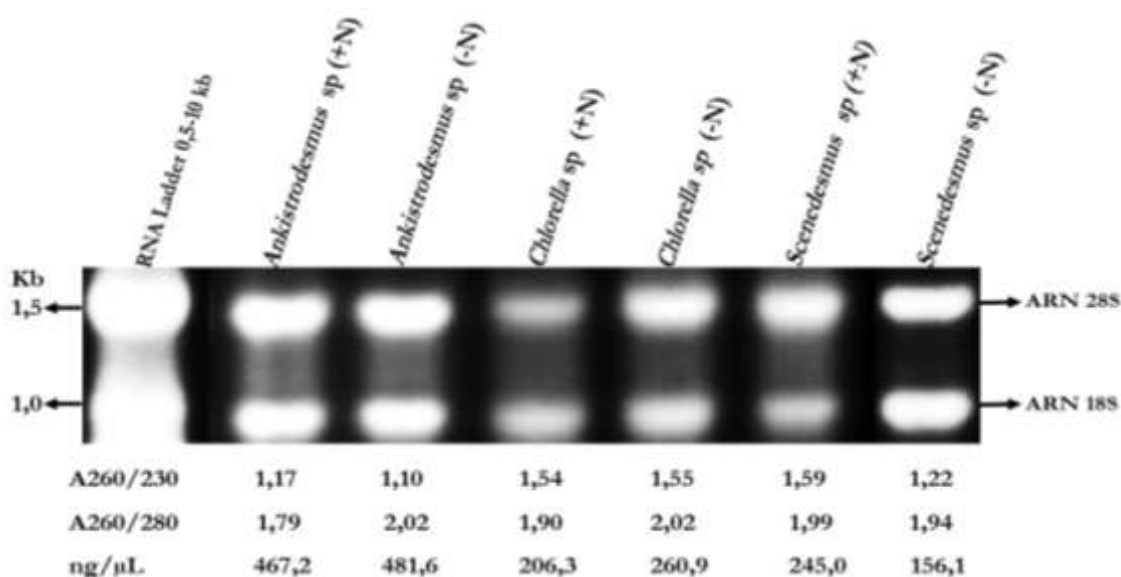


Figura 4: Gel de agarosa al 1% mostrando bandas de ARN de las tres especies de microalgas estudiadas. Las flechas muestran el ARN de 28S y 18S. M: marcador de peso molecular (ARN Ladder 0,5-10 kb). Abajo, las ratios de calidad y concentración de ARN total obtenido de las tres especies de microalgas cultivadas en medio con (+N) y sin Nitrógeno (-N).

5.2. Nivel de expresión del gen Acetil CoA carboxilasa en las microalgas *Ankistrodesmus sp*, *Chlorella sp* y *Scenedesmus sp*. cultivadas en medio Chu-10 con y sin nitrógeno.

5.2.1. Expresión del gen $Acc\alpha$ en las tres especies microalgales

El desarrollo del PCR en tiempo real (qPCR) proporcionó valores promedio para cada gen, que varía entre 25,55 a 23,87 para el gen $\alpha ACCasa$ f1 y r1, mientras que entre 19,78 a 16,71 para el gen de referencia GADPH f1 y r1. A partir de los cuales se calcularon las expresiones relativas de los genes en estudio, siendo *Scenedesmus sp.*, (-N), la especie que presenta mayor nivel de expresión de los genes en estudio sobre las otras condiciones, así; con respecto al gen de referencia GADPH f1 y r1, la especie *Scenedesmus sp.*, (-N), presentó una expresión relativa de ~16 veces más copias de ARNm que *Chlorella sp.*, (+N) (-N) y *Ankistrodesmus sp* (+N) (-N) (Figura N° 5).

Sin embargo, se evidencia también que *Chlorella sp.* (+N), muestra una mayor expresión del gen $Acc\alpha$ con respecto a *Scenedesmus sp.*, (+N) y *Ankistrodesmus sp.*, (+N).

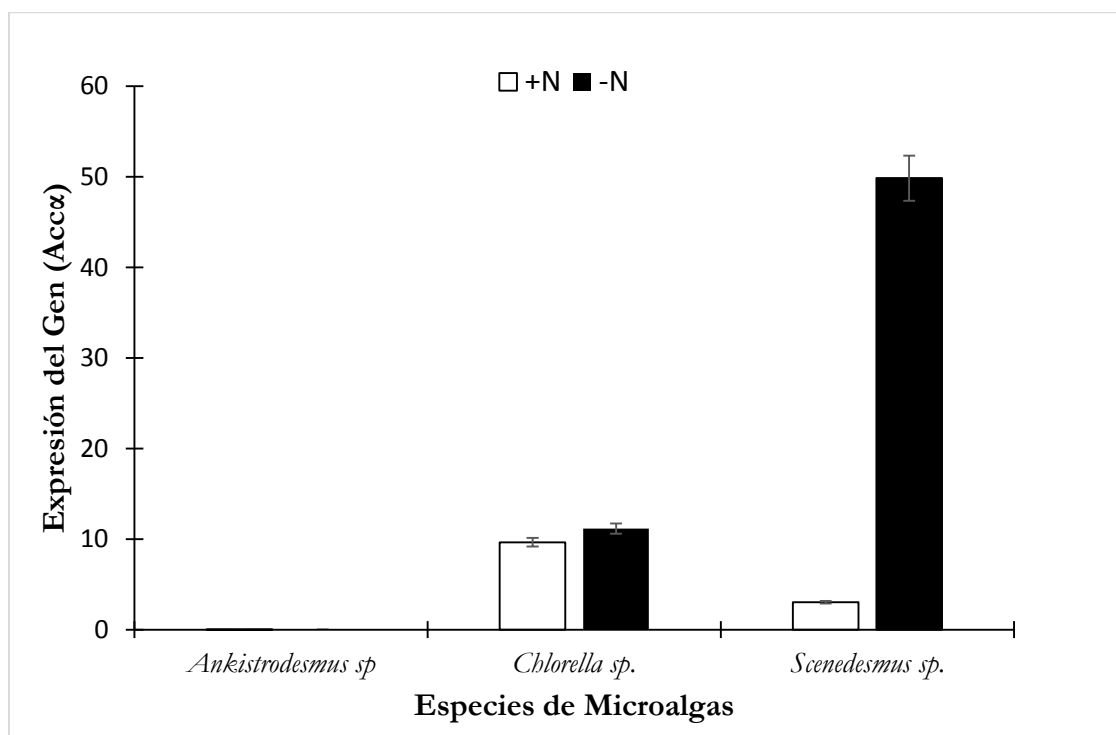


Figura 5: Expresión relativa de los genes en las especies de microalgas evaluadas. En ella se muestra las veces de incremento por especie.

5.3. Relación entre el nivel de expresión del gen *Accx* con la producción de lípidos en las tres especies de microalgas.

5.3.1. Producción de lípidos

Por lo general, se evidencia que el contenido de lípidos totales en las tres especies evaluadas difiere en cada una de ellas. Observándose que *Ankistrodesmus* sp., fue la especie que presentó el mayor porcentaje de lípidos totales (22 %) en condiciones sin nitrógeno, seguido de *Scenedesmus* sp., que tuvo un 15 % y finalmente *Chlorella* sp., con un total de 13 % de lípidos totales. Asimismo, se observa el mismo comportamiento en cada una de las especies de microalgas que fueron cultivadas en medios de cultivo con nitrógeno (Figura 6).

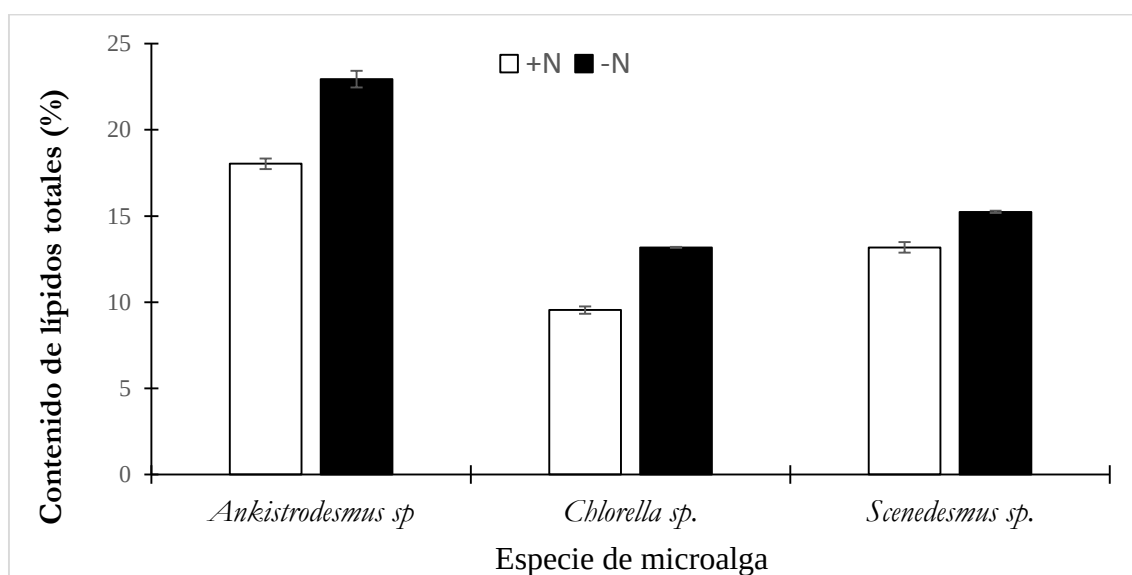


Figura 6. Contenido de lípidos totales (%) de las tres especies de microalgas

5.3.2. Expresión de genes y producción de lípidos totales

Respecto a la relación entre la expresión de los genes en estudio y la producción de lípidos en las tres especies de microalgas, podemos ver que *Ankistrodesmus* sp., -N muestra una expresión mayor, respecto a *Ankistrodesmus* sp., +N, la tendencia es la misma en las demás especies, siendo los tratamientos -N las que muestran mayor expresión, respecto a los tratamientos +N. (Tabla 2).

Tabla N° 2. Valores de producción de lípidos totales y expresión de genes

	Lípidos Totales (%)		Expresión de genes	
	+N	-N	+N	-N
<i>Ankistrodesmus</i> sp	18.03±0.3	22.94±0.48	0.0052	0.0077
<i>Chlorella</i> sp	9.54±0.21	13.18±0.03	9.6464	11.1579
<i>Scenedesmus</i> sp	13.18±0.03	15.24±0.06	3.0314	49.8665

Los valores representan el promedio $\pm$ desviación estándar **ng/ μ L**.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

Las microalgas han adquirido gran valor biotecnológico en los últimos años, siendo utilizados en gran número de soluciones, tales como la producción de aceites, bioplásticos y biodiésel (1). Además de diversas aplicaciones en aspectos de alimentación, producción de biomasa y metabolitos con muy buen perfil de aminoácidos agregados de origen natural (26). Sin embargo, se ha observado que mientras la concentración de lípidos puede llegar a incrementar significativamente en condiciones de limitación de nitrógeno, la tasa de crecimiento o producción de biomasa es reducida lo cual no es rentable cuando se pretende tener una alta productividad de aceite (1). Acetil CoA Carboxilasa es una enzima clave en la vía de síntesis de los lípidos, para ello fue necesario evaluar el grado de expresión de estos genes y la relación que existe con la producción de los lípidos.

En esta investigación reportamos una mayor expresión del gen *Accα* y *GADPH* en los cultivos sometidos a tratamientos sin nitrógeno, lo cual representa ~16 veces más copias de ARNm en la especie *Scenedesmus* sp (-N), con respecto a *Chlorella* sp y *Ankistrodesmus* sp respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Liang *et al.* (56) quienes reportan cambios en la transcripción y abundancia de gliceraldehído- 3-fosfato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa, implicados en la síntesis de acetil-CoA, en *Nannochloropsis* Sp. el cual es un precursor de la biosíntesis de ácidos grasos.

Respecto a los niveles de expresión de los genes y la producción de lípidos, se incrementa de manera paralela en todas las especies cultivadas sin nitrógeno, estos resultados corroboran a los reportados para *C. velia* e *Isochrysis aff. galbana* (57), en donde se observa el incremento de la expresión de ACCase plastidial el cual correlacionó positivamente con el aumento del contenido de los ácidos grasos a lo largo del tiempo. Además, hubo una fuerte interacción entre el estado del nitrógeno y la fase de crecimiento, donde los cultivos sometidos a

limitación de nitrógeno, respondieron con una mayor expresión de ACCase plastidial. El nitrógeno del cultivo también era importante, ya que los cultivos repletos de nitrógeno respondieron de forma más débil con respecto a la acumulación de lípidos y ácidos grasos que los cultivos en condiciones de depleción de nitrógeno. Así mismo en estudios realizados en *Ankistrodesmus* sp., *Ankistrodesmus nannoselene* y *Scenedesmus* sp. por Paredes en el 2014. (58), encontró que los tratamientos sin nitrógeno mostraron un mayor porcentaje de lípidos, con 26,4 %, 31.6 % y 24 % respectivamente. Además, Perez (59) en el 2016 en una investigación realizada en *Triceratium dictyotum* bajo condiciones de estrés, indica que los tratamientos con déficit de nitrógeno muestran una mayor producción de lípidos, respecto a los cultivos sometidas a condiciones normales.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

- El nitrato influye en la expresión del gen *Acca* y la producción de lípidos en las tres especies de microalgas oleaginosas Amazónicas.
- Los niveles de expresión del gen *Acca*, se incrementa en los cultivos sin nitrógeno en las tres especies de microalgas *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.
- Los cultivos sin nitrógeno, muestran una mayor producción de lípidos en las tres especies de microalgas *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Siendo *Ankistrodesmus* sp., la especie que obtuvo un mayor porcentaje de los lípidos totales.
- Existe una correlación positiva y significativa de los niveles de expresión de los genes *Acca*.

CAPÍTULO VIII

RECOMENDACIONES

- Aplicar análisis multivariado para un mejor entendimiento de todo el proceso de síntesis de lípidos.
- Desarrollar estudios de regulación para los genes estructurales de la biosíntesis de lípidos.
- Estudiar la expresión de otros genes involucrados en la síntesis de lípidos de las microalgas *Ankistrodesmus* sp, *Chlorella* sp *Scenedesmus* sp.
- Evaluar la expresión relativa del gen *GADPH* comparando con otros genes de referencia para confirmar los resultados encontrados.

CAPÍTULO IX

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garibay-Hernández A, Vázquez-Duhalt R, Sánchez-Saavedra M. y Martínez-Jiménez A. Biodiésel a partir de Microalgas. Soc. Mex. Biotecnol Bioingeniería. 2009; 13:38-61.
2. Georgianna DR, Mayfield SP. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature*. 2012; 488 (7411):329-35.
3. Sharma KK, Schuhmann H and Schenk. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies*. 2012; 5: 1532-3.
4. Loera M y Olguín E. Las Microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Latinoam Biotecnol Amb Algal*. 2010; 1 (1):91-116.
5. Ho S-H, Chen C-Y, Lee D-J, Chang J-S. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems--a review. *Biotechnol Adv*. 2011; 29 (2):189-98.
6. Sahoo D, Elangbam G, Devi S. Using algae for carbón dioxide capture and biofuel production to combat climate change. *Phykos*. 2012; 42(1):32-8.
7. Smith VH, Sturm BSM, Denoyelles FJ, Billings SA. The ecology of algal biodiesel production. *Trends Ecol Evol*. 2010; 25 (5):301-9.
8. 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(13):6909-19.
9. Wu LF, Chen P, Huang AP, Lee Ch M. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresour Technol*. 2010; 113:14-18.
10. Li Y, Horsman M, Wu N, Lan C, Dubois N. Articles: Biocatalysts and Bioreactor Design. *Biotechnol Prog*. 2008; 24 (4):815-820.
11. Singh J, Gu S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew Sustain Energy Rev*. 2010; 14(9):2596-610.
12. Khoo HH, Sharratt PN, Das P, Balasubramanian RK, Naraharisetti PK, Shaik S. Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: preliminary results and comparisons. *Bioresour Technol*. 2011; 102(10):5800-7.
13. Ríos SD, Torres CM, Torras C, Salvadó J, Mateo-Sanz JM, Jiménez L. Microalgae-based biodiesel: Economic analysis of downstream process realistic scenarios. *Bioresour Technol*. 2013; 136:617-25.

14. Xin L, Hong-Ying H, Jia Y, Yin-Hu W. Enhancement effect of ethyl-2-methyl acetoacetate on triacylglycerols production by a freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1. *Bioresour Technol.* 2010; 101(24):9819-21.
15. El-Sheekh M, Abomohra AE-F, Hanelt D. Optimization of biomass and fatty acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel production. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013; 29(5):915-22.
16. Moellering ER, Benning C. RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell.* 2010; 9(1):97-106.
17. Lee DY, Park J-J, Barupal DK, Fiehn O. System response of metabolic networks in *Chlamydomonas reinhardtii* to total available ammonium. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2012; 11(10):973-88.
18. Radakovits R, Jinkerson RE, Fuerstenberg SI, Tae H, Settlage RE, Boore JL, et al. Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nat Commun.* 2012; 3: 686.
19. Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature.* 2008; 456(7219):239-44.
20. Rismani-Yazdi H, Haznedaroglu BZ, Bibby K, Peccia J. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. *BMC Genomics.* 2011; 12:148.
21. Carrier G, Garnier M, Le Cunff L, Bougaran G, Probert I, De Vargas C, et al. 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.* 2014; 9(1): e86889.
22. Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sustain Energy Rev.* 2010; 14 (1):217–32.
23. Albarracín I. La producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. In 2007. p. 1– 16.
24. Sheehan J, Dunahay T, Benemann R, Roessler G. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae [Internet]. National Renewable Energy Laboratory; 1998 jul. Available from: http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/biodiesel_from_algae.pdf.

25. Arredondo-Vega, B.O, Vázquez-Duhalt, R. Aplicaciones biotecnológicas del cultivo de microalgas. *Cienc Desarro* Xvii. 1991;98 99-111.
26. Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J Cell Mol Biol*. 2008 May; 54(4):621–39.
27. Canell R. J. P. Algae as a Source of Biologically Active Products. *Pestic Sci*. 1993; 39: 147–153.
28. Demirbas A, Demirbas MF. *Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel*. Springer; 2010. 204 p.
29. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*. Jun; 2007;25(3):294–306.
30. Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol*. 2011 Mar; 26(3):126–31.
31. Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy*. 2011 Oct; 88(10):3402–10.
32. Mutanda T, Ramesh D, Karthikeyan S, Kumari S, Anandraj A, Bux F. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresour Technol*. 2011 Jan; 102(1):57–70.
33. Illman AM, Scragg AH, Shales SW. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Technol*. 2000.
34. Bruce E. Rittmann. Opportunities for Renewable Bioenergy Using Microorganisms. Published online 7 March 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
35. Knothe G (2005) Dependence of biodiesel. fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technol*.86: 1059-1070.
36. Cohen, Z. y Khozin-Goldberg, I. Searching for PUFA-rich microalgae. En Z. Cohen y C. Ratledge (Eds.), *Single cell oils* (pp. 53-72). Champaign: American Oil. Chem. Society. 2005
37. Rontani, J.F., Marty J.C., Miquel, J.C., John, K. y Volkman, J.K. Free radical oxidation (autoxidation) of alkenones and other microalgal lipids in seawater. *Organic Geochemistry*. 2006;37, 354-368.
38. Solovchenko, A. E. Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology* 2012;59 (2), 167-176.

39. Thompson G.A.Jr. Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996, 1302, 7-45.
40. Courchesne, N.M.D., Parisien, A., Wang, B. y Lan, C. Enhancement of lipid. production using biochemical, genetic and transcription factor Engineering. 2009
41. Greenwell, H. C., Laurens, L. M. L, Shields, R. J., Lovitt, R. W. y Flynn K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*. 2010;7, 703-726.
42. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12:323.
43. Otsuka, H. Changes of lipid and carbohydrate contents of *Chlorella* cells during the sulfur starvation, as studied by the technique of synchronous culture. *Journal of General and Applied Microbiology*. 1961;7, 72-77.
44. Renaud, S.M., Thinh, L.V., Lambrinidis, G. y Parry, D.L. (2002). Effect of temperatura on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian. microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211, 195-214.
45. Días Calampa, Lilia; Urcia Saboya, Margarita. Aislamiento e identificación de microalgas oleaginosas en las cuencas de los Ríos Amazonas, Itaya y Nanay, Loreto 2013. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Ecología. UCP.
46. Yu X, Zhao P, He C, Li J, Tang X, Zhou J, et al. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresour Technol*. 2012; 121: 256-62.
47. Castro, Juan C. Hicler N. Rodríguez, J. Dylan Maddox, Brucee Jiu, Joe B. Petterman, Jorge L. Marapara And Marianela Cobos. A simple and efficient method for high-quality total RNA isolation from oleaginous microalgae. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*. 2017; 18 (1 & 2) 15- 21.
48. Omar Guadalupe Alvarado-Gómez, Juan Pablo Martínez-Soriano, Benito, Pereyra-Alférez y Mario Alberto Rocha-Peña. Comparación de Métodos de Extracción de RNA para la Detección del Viroide Exocortis de los Cítricos por Electroforesis Secuencial. *Rev Mex Fitopatol*. 2000; 18 (1):42-9.
49. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vols 1,2 and 3*. 3rd edition. CHSL Press; 2001. 2344 p.
50. Roger Huerlimann and Kirsten Heimann. *Comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae*. School of Marine and Tropical Biology, James Cook

- University, Townsville, Queensland, Australia. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2013; 33(1): 49–65.
51. Stephenson F. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*. United States of America: Academic Press; 2013.
 52. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Scott KD and Playford J. 1996. DNA extraction technique for PCR in rain forest plant species. *Biotechniques* 1989;20, 974–979.
 53. Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F.: Normalización de Datos de PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real: a Enfoque de estimación de varianza basada en modelos para identificar genes Adecuado para la normalización, aplicado a la vejiga y el colon Conjuntos de datos sobre el cáncer. - *Cancer Res.* 64: 5245 - 5250, 2004.
 54. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, Van den Hoff MJB, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(6): e45-e45.
 55. Simon P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics.* 2003;19(11):1439-40.
 56. Liang, C., Cao, S., Zhang, X., Zhu, B., Su, Z., Xu, D., Guang, X., Ye, N., 2013. De novo sequencing and global transcriptome analysis of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) following nitrogen starvation. *BioEnergy Research* 6 (2), 494–505.
 57. Huerlimann, R., Steinig, E.J., Loxton, H., Zenger, K.R., Jerry, D.R., Heimann, K., 2014. The effect of nitrogen limitation on acetyl-CoA carboxylase expression and fatty acid content in *Chromera velia* and *Isochrysis aff. galbana* (TISO). *Gene* 543 (2), 204–211.
 58. Paredes Rodríguez Jae Diana. 2014. Impacto en la acumulación de nitrógeno en la acumulación de lípidos totales en cinco especies de microalgas oleaginosas. Tesis para obtener el grado de licenciado en Ecología. Universidad Científica del Perú.
 59. Pérez Rojas Carlos Alejandro. 2016. Producción de lípidos, ácidos grasos y pigmentos en *Triceratium dictyotum* (SIMS 6 ROSS 1990) (Bacillariophyta: Coscinodiscophyceae) bajo condiciones de estrés por déficit de nitrógeno, déficit de cilicio y distintas irradiancias. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias.

ANEXOS



Figura N° 07. Extracción de lípidos totales.



Figura N° 08: Sembrado de muestras en geles de agarosa.



Figura N° 09: Procesamiento de muestras para PCR en tiempo real (qPCR).

Tabla N° 3. Características de los cebadores diseñados para los genes de estudio

Enzima	Tamaño del Amplicón	Secuencias	Tamaño del cebador
A_ACCALPHA	119	F1: CGATCAAGGACGCCATCAT	19
		R1: GTTTGAGGAGTGGGTCGTC	19
A_GDPH	87	F1: GCCAAGTATGAGGAGATCATGG	22
		R1: GTTTGAGGAGTGGGTCGTC	18
C_ACCALPHA	89	F1: GCGAGTACGAGCACATGAA	19
		R1: GTTTGAGGAGTGGGTGGTC	19
C_GDPH	90	F1: GGCACCATGGTCAAGATCTAC	20
		R1: AAGATGGTGGCGGACAAG	18
S_ACCALPHA	91	F1: CAGGCACTACGAGAACATGAG	21
		R1: GTTTGAGGAGTGGGTGGTG	19
S_GDPH	98	F1: GTGGTGTCCACGGACTTT	18
		R1: TTTGTGAAGCTGGTCTCCTG	20

Tabla N° 04. Resultados del ANOVA de la expresión de los genes *Accα* y *GADPH* en microalgas.

Especies	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<i>Ankistrodesmus</i> sp +N	4	,003905	,000735	,000367	,002734	,005075	,002820	,004425
<i>Ankistrodesmus</i> sp -N	4	,009716	,005456	,002728	,001034	,018399	,005373	,017701
<i>Chlorella</i> sp +N	3	9,87333	1,23265	,711672	6,81125	12,9354	8,69000	11,1500
<i>Chlorella</i> sp -N	3	11,2000	2,18020	1,25874	5,78406	16,6159	8,81000	13,0800
<i>Scenedesmus</i> sp +N	4	2,64000	,431586	,215793	1,95325	3,32674	2,29000	3,27000
<i>Scenedesmus</i> sp -N	4	40,8875	9,88560	4,94280	25,1572	56,6177	26,1700	47,5000
Total	22	10,7902	15,6275	3,33181	3,86132	17,7190	,002820	47,5000

Tabla N° 05. Resultados de Anova de un factor de las microalgas oleaginosas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4822,371	5	964,474	50,384	,000
Intra-grupos	306,280	16	19,142		
Total	5128,650	21			

Tabla N° 06. Resultados de las comparaciones múltiples (Prueba HSD de Tukey) para determinar diferencias significativas en la expresión de los genes *Accα* y *GADPH*.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
<i>Ankistrodesmus</i> sp +N	<i>Ank.</i> sp -N	-,0058117322	3,093742	1,000	-9,974316669	9,962693205
	<i>Chl.</i> sp +N	-9,8694281977	3,341624	,082	-20,636644139	,897787744
	<i>Chl.</i> sp -N	-11,1960948644*	3,341624	,039	-21,963310806	-,428878923
	<i>Sc.</i> sp +N	-2,6360948644	3,093742	,953	-12,604599802	7,332410073
	<i>Sc.</i> sp -N	-40,8835948644*	3,093742	,000	-50,852099802	-30,915089927
<i>Ankistrodesmus</i> sp -N	<i>Ank.</i> sp +N	,0058117322	3,093742	1,000	-9,962693205	9,974316669
	<i>Chl.</i> sp +N	-9,8636164655	3,341624	,083	-20,630832407	,903599476
	<i>Chl.</i> sp -N	-11,1902831322*	3,341624	,039	-21,957499074	-,423067191
	<i>Sc.</i> sp +N	-2,6302831322	3,093742	,953	-12,598788069	7,338221805
	<i>Sc.</i> sp -N	-40,8777831322*	3,093742	,000	-50,846288069	-30,909278195
<i>Chlorella</i> sp +N	<i>Ank.</i> sp +N	9,8694281977	3,341624	,082	-,897787744	20,636644139
	<i>Ank.</i> sp -N	9,8636164655	3,341624	,083	-,903599476	20,630832407
	<i>Chl.</i> sp -N	-1,3266666667	3,572346	,999	-12,837304685	10,183971351
	<i>Sc.</i> sp +N	7,2333333333	3,341624	,305	-3,533882608	18,000549275
	<i>Sc.</i> sp -N	-31,0141666667*	3,341624	,000	-41,781382608	-20,246950725
<i>Chlorella</i> sp -N	<i>Ank.</i> sp +N	11,1960948644*	3,341624	,039	,428878923	21,963310806
	<i>Ank.</i> sp -N	11,1902831322*	3,341624	,039	,423067191	21,957499074
	<i>Chlo.</i> sp +N	1,3266666667	3,572346	,999	-10,183971351	12,837304685
	<i>Sc.</i> sp +N	8,5600000000	3,341624	,164	-2,207215942	19,327215942
	<i>Sc.</i> sp -N	-29,6875000000*	3,341624	,000	-40,454715942	-18,920284058
<i>Scenedesmus</i> sp +N	<i>Ank.</i> sp +N	2,6360948644	3,093742	,953	-7,332410073	12,604599802
	<i>Ank.</i> sp -N	2,6302831322	3,093742	,953	-7,338221805	12,598788069
	<i>Chl.</i> sp +N	-7,2333333333	3,341624	,305	-18,000549275	3,533882608
	<i>Chlo.</i> sp -N	-8,5600000000	3,341624	,164	-19,327215942	2,207215942
	<i>Sc.</i> sp -N	-38,2475000000*	3,093742	,000	-48,216004937	-28,278995063
<i>Scenedesmus</i> sp -N	<i>Ank.</i> sp +N	40,8835948644*	3,093742	,000	30,915089927	50,852099802
	<i>Ank.</i> sp -N	40,8777831322*	3,093742	,000	30,909278195	50,846288069
	<i>Chlo.</i> sp +N	31,0141666667*	3,341624	,000	20,246950725	41,781382608
	<i>Chlo.</i> sp -N	29,6875000000*	3,341624	,000	18,920284058	40,454715942
	<i>Sc.</i> sp +N	38,2475000000*	3,093742	,000	28,278995063	48,216004937

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla N° 07. Resultados de prueba de HSD de Tukey de los subconjuntos homogéneos de la tres especies de microalgas.

HSD de Tukey^{a,b}

Especies de microalgas	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
<i>Ankistrodesmus</i> sp +N	4	,003905136		
<i>Ankistrodesmus</i> sp -N	4	,009716868		
<i>Chlorella</i> sp +N	4	2,640000000	2,640000000	
<i>Chlorella</i> sp -N	3	9,873333333	9,873333333	
<i>Scenedesmus</i> sp +N	3		11,200000000	
<i>Scenedesmus</i> sp -N	4			40,887500000
Sig.		,072	,147	1,000

Tabla N° 08 . Resultados de prueba T de *Ankistrodesmus* Sp.

Especie	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
<i>Ankistrodesmus</i> sp +N	4	,0039	,00074	,00037
<i>Ankistrodesmus</i> sp -N	4	,0097	,00546	,00273

Tabla N° 09. Resultados de prueba de muestras independientes de *Ankistrodesmus* Sp.

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Se han asumido varianzas iguales	5,490	,058	-2,111	6	,079	-,00581	,00275	-,01255	,00092
No se han asumido varianzas iguales			-2,111	3,109	,122	-,00581	,00275	-,01440	,00278

Tabla N° 10. Resultados de prueba T de *Chlorella* sp

Especie	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
<i>Chlorella</i> sp +N	3	9,8733	1,23265	,71167
<i>Chlorella</i> sp -N	3	11,2000	2,18021	1,25874

Tabla N° 11. Resultados de prueba de muestras independientes de *Chlorella* sp.

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Se han asumido varianzas iguales	1,199	,335	-,917	4	,411	-1,32667	1,44600	-5,34140	2,68807
No se han asumido varianzas iguales			-,917	3,160	,423	-1,32667	1,44600	-5,79936	3,14603

Tabla N° 12. Resultados de prueba T de *Scenedesmus* Sp.

Estadísticos de grupo

Especie	N	Media	Desviación típica	Error típica de la media
<i>Scenedesmus</i> sp +N	4	2,6400	,43159	,21579
<i>Scenedesmus</i> sp - N	4	40,8875	9,88560	4,94280

Tabla N° 13. Resultados de prueba de muestras independientes de *Scenedesmus* sp

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferenci a de medias	Error típ. de la diferenci a	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Se han asumido varianzas iguales	7,759	,032	- 7,731	6	,000	- 38,24750	4,94751	- 50,35362	- 26,14138
No se han asumido varianzas iguales			- 7,731	3,011	,004	- 38,24750	4,94751	- 53,95891	- 22,53609