



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE
BIODIESEL DE LA MICROALGA *Neochloris oleoabundans*
TRANSFORMADA CON UN GEN TRANSPORTADOR DE
LÍPIDOS**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

MONICA BETTINA FÉLIX CASTRO

La Paz, Baja California Sur, Febrero de 2017.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:12 horas del día 14 del Mes de Febrero del 2017, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación del potencial en la producción de biodiesel de la microalga *Neochloris oleoabundans* transformada con un gen transportador de lípidos"

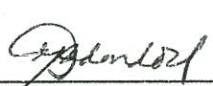
Presentada por el alumno:


MÓNICA BETTINA FÉLIX CASTRO

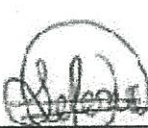
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Co-Director de Tesis


Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Co-Director de Tesis


Dra. Selena Gutierrez Flores
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega, Co-Director de tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, Co-Director de tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Dra. Selena Gutiérrez Flores, Co-Tutor de tesis

Universidad Nacional Autónoma de México

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Dra. Selena Gutiérrez Flores

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Dra. Selena Gutiérrez Flores

SUPLENTE

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Resumen

La generación de biodiesel a partir de organismos fotosintéticos como las microalgas, se plantea como una opción a futuro ante la necesidad de producir energías sustentables que sustituyan el empleo de combustibles obtenidos a partir de derivados fósiles. Debido a la alta tasa de crecimiento y de acumulación lipídica que presentan las microalgas, estos organismos son considerados como fuente potencial en la obtención de biodiesel de tercera y cuarta generación. La microalga oleaginosa *Neochloris oleoabundans* puede acumular hasta el 56% de su peso seco en lípidos totales, además de presentar un perfil idóneo de ácidos grasos al ser adaptada y cultivada en agua de mar (35 UPS), por lo que se ha considerado como modelo de estudio para la producción de biodiesel. Recientemente se ha empleado la ingeniería genética de microalgas para aumentar el rendimiento lipídico a través de la modificación de las vías metabólicas asociadas a la biosíntesis de lípidos. En este trabajo, se evaluó el efecto de la inserción del gen transportador de lípidos (LTP) en la microalga *N. oleoabundans* mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, sobre el crecimiento, contenido de lípidos totales, cuantificación de ácidos grasos, índice de yodo y estimación del número de cetano (CN); en cultivos batch de 100 mL de la cepa silvestre en medio dulceacuícola y marino, y de la cepa transformada en medio marino. Los resultados se trataron estadísticamente con la prueba t-student ($\alpha=0.05$). La inserción del gen LTP aumentó significativamente el contenido total de lípidos (36.5%) con respecto a la cepa silvestre en los medios dulceacuícola (10.5%) y marino (16.4%). Se observó un incremento en el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados para la cepa transformada (29.6%) con respecto a la cepa silvestre en los medios dulceacuícola (12.9%) y marino (21.9%) y una disminución de 2.2 veces de los ácidos grasos poliinsaturados en la cepa transformada (9.5%) con respecto a la cepa silvestre en medio dulceacuícola (25.6%), y 2.7 veces menor en medio marino (20.7%). También se observó un aumento significativo de C18:1 ω 9 en la fracción de lípidos neutros (NL) en la línea transformada (30.6%). Para la caracterización del biodiesel se estimó un valor de número de cetano (CN) de 53.4 ± 0.5 y un valor promedio de 84.9 de índice de yodo para la cepa transformada en medio marino, cumpliendo con ello los estándares de normas internacionales.

Palabras clave: Biodiesel, *Neochloris oleoabundans*, *Agrobacterium tumefaciens*, índice de yodo, número de cetano.



Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Co-Director de Tesis

VoBo.



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Co-Director de Tesis

Summary

Biodiesel production using photosynthetic organisms such as microalgae is considered a future option due to the need to produce sustainable energies that substitute the use of fossil derived fuels. Due to the high growth rate and lipid accumulation, microalgae are considered a potential source in biodiesel production of third and fourth generation. The oleaginous microalgae *N. oleoabundans* can accumulate up to 56% of its dry weight in lipids and has an ideal lipid profile of fatty acids when cultivated in marine medium (35 PSU), it's considered as study model for biodiesel production. Recently, genetic engineering of microalgae for increased lipid yield via modification of lipid metabolic pathways has been applied. In this work, we evaluated the effect of Lipid Transfer Protein (LTP) gene insertion in *N. oleoabundans*, using *Agrobacterium tumefaciens* transformation method, in growth rate, total lipids, fatty acid profile, iodine index and cetane number estimation (CN) in 100 mL batch cultures of wild strain in marine and freshwater medium, and modified strain growth in marine medium. Results have been treated statistically with t-student test ($\alpha=0.05$). LTP gene insertion significantly increased total lipid yield (35%) relative to the wild type strain in freshwater medium (10.5%) and marine medium (16.4%). There was an increase in monounsaturated fatty acids in modified strain (29.6%) relative to wild type strain in freshwater medium (12.9%) and marine medium (21.9%). Also, a decrease 2.2 times of polyunsaturated fatty acids in modified strain (9.5%) relative to wild strain in freshwater medium (25.6%) and 2.7 times in marine medium (20.7%) was observed. There was an increase in C18:1 ω 9 in neutral lipids fraction for the modified strain (30.6%). For biodiesel characterization, a cetane number (NC) value of 53.4 ± 0.5 was estimated and an average value of 84.9 iodine index was calculated for the transformed strain in marine medium, complying with international standards.

Keywords: *Biodiesel, Neochloris oleoabundans, Agrobacterium tumefaciens, iodine index, cetane number.*



Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Co-Director de Tesis

VoBo.



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Co-Director de Tesis

Para Oli, que ilumina mis días

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado. Al Departamento de Control Escolar, al Laboratorio de Cómputo, por su amabilidad y atención. Al Laboratorio de Biotecnología Microalgas, Laboratorio de Alimento Vivo, Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y Laboratorio de Química Sostenible por permitirme formar parte de sus equipos de trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría otorgada (392830). A los proyectos PAC y 971-0. CIBIOGEM-CONACyT 2014/234606.

A mi comité tutorial Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega, Dra. Gracia Gómez Anduro y Dra. Selena Gutiérrez Flores, por su guía, consejos y apoyo en la realización de este proyecto, son investigadoras de gran calidad humana que ponen en alto el nombre de las mujeres en ciencia, gracias por brindarme su amistad y siempre estar al pendiente. Mi más grande admiración y aprecio hacia ustedes.

A los técnicos de laboratorio Dra. Laura Carreón Palau, M. en C. Mario Arce y M. en C. Julio Hernández por compartir sus conocimientos, por los consejos y paciencia. Al Dr. Mario Rojas por sus consejos y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio Ara, Diana, Jessica C, Jessica E, Fredy, Hamid, Alonso, Caro, Héctor, Amaral. Gracias por su amistad y apoyo en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros de maestría Dany, Eva, Marlene, Caro, Juan

Pablo, Iván y Rigel. Gracias por esta bonita amistad, por todos los momentos compartidos.

A Alejandro Aragón, que a pesar de la distancia siempre está cerca, por todo el cariño y amistad, te extraño siempre.

Y especialmente a mi familia, mis padres Roberto y Silvia por darme las herramientas para llegar hasta aquí, por creer en mí siempre y por su apoyo y amor incondicional. A mis hermanos, Jesús, Eduardo y Armi. A Bernardo por todo el amor, apoyo y cariño, por compartir esta aventura conmigo. Los amo.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Biodiesel.....	4
2.2 Producción de biodiesel en microalgas.....	6
2.3 Transformación genética de microalgas.....	10
2.4 Proteínas transportadoras de lípidos.....	12
3. PREGUNTA CIENTÍFICA	14
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2 Objetivos particulares.....	15
6. JUSTIFICACIÓN	16
7. MATERIAL Y MÉTODOS	17
Organismo y condiciones de cultivo.....	17
7.1 Axenización y transformación genética de <i>N. oleoabundans</i> con el gen transportador de lípidos LTP	17
7.1.2 Verificación de inserto del gen LTP <i>A. tumefaciens</i> pMDC32:LTP.....	18
7.1.2.1 Activación de <i>A. tumefaciens</i> pMDC32:123LTP y pMDC32:124LTP.....	18
7.1.2.2 Extracción de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i> pMDC32:123LTP y <i>A. tumefaciens</i> pMDC32:124LTP.....	18
7.1.2.3 Confirmación de inserción mediante PCR.....	19
7.1.3 Transformación genética de <i>N. oleoabundans</i> mediante <i>A. tumefaciens</i>	20
7.1.3.1 Ensayo de resistencia a antibiótico.....	21
7.1.3.2 Condiciones de co-cultivo de <i>N. oleoabundans</i> con <i>A. tumefaciens</i>	21
7.1.4 Selección de colonias transformadas	22

7.1.4.1 Extracción de DNA a partir de las colonias aisladas.....	22
7.1.4.2 Confirmación mediante PCR empleando oligonucleótidos universales.....	23
7.1.4.3 Confirmación de inserción por PCR empleando oligonucleótidos específicos para LTP	24
7.1.4.4 Confirmación de inserción por PCR empleando oligonucleótidos específicos para <i>Agrobacterium</i>	24
7.2 Tasa de crecimiento y perfil de ácidos grasos de <i>N. oleoabundans</i>	25
7.2.1 Determinación de la concentración celular y curva de crecimiento	26
7.2.2 Extracción y determinación de lípidos totales y perfil de ácidos grasos de <i>N. oleoabundans</i>	26
7.2.3 Extracción y determinación de ácidos grasos	27
7.2.4 Separación y cuantificación de ácidos grasos en fracciones lipídicas	29
7.3. Caracterización del biodiesel.....	30
7.3.1 Número de cetano (CN)	30
7.3.2 Transesterificación ácida	31
7.3.2.1 Análisis de resonancia magnética.....	32
7.3.3 Determinación de índice de yodo	32
8. RESULTADOS	35
8.1 Cefotaxima para la axenización de cultivos de <i>N. oleoabundans</i>	35
8.2 Confirmación de las construcciones <i>A. tumefaciens</i> pMDC32:123LTP y pMDC32:124LTP.....	36
8.3 Resistencia de <i>N. oleoabundans</i> al antibiótico higromicina.....	38
8.4 Transformación de <i>N. oleoabundans</i> mediada por <i>Agrobacterium</i>	39
8.5 Confirmación de la inserción del gen LTP en <i>N. oleoabundans</i>	41
8.6 Curva de crecimiento	43
8.7 Extracción y determinación de lípidos totales.....	46
8.8 Extracción y cuantificación de ácidos grasos.....	47
8.9 Determinación de ácidos grasos en fracciones lipídicas	50
8.10 Estimación del número de cetano (CN).....	57
8.11 Transesterificación ácida.....	58
8.12 Determinación de índice de yodo	59
8.13 Análisis de resonancia magnética	60
9. DISCUSIÓN	63

10. CONCLUSIONES	70
11. LITERATURA CITADA	72

Lista de figuras

Figura 1. Reacción de transesterificación	5
Figura 2. Reacciones para la determinación del índice de yodo por el método de Hanus	6
Figura 3. Cultivos axénicos de <i>N. oleoabundans</i> en medio sólido y líquido.....	35
Figura 4. Axenización de cultivos de <i>N. oleoabundans</i> en medio F/2 y NB dulceacuícola (MD) y marino (MM).....	36
Figura 5. Gel de electroforesis para verificación de inserto	37
Figura 6. Gel de electroforesis de PCR con los oligonucleótidos específicos para el gen LTP	38
Figura 7. Ensayo de resistencia a higromicina para <i>N. oleoabundans</i>	39
Figura 8. Placas inoculadas con el concentrado recuperado de los filtros del cultivo.....	40
Figura 9. Colonias aisladas en 3 mL de medio líquido NB.....	41
Figura 10. Geles de electroforesis para la identificación de transformación de <i>N. oleoabundans</i>	43
Figura 11. Curva de crecimiento para <i>N. oleoabundans</i> línea silvestre en medio dulceacuícola.....	44
Figura 12. Curva de crecimiento para la línea silvestre de <i>N. oleoabundans</i> en medio marino	45
Figura 13. Curva de crecimiento para <i>N. oleoabundans</i> transformada con el gen LTP en medio marino	46
Figura 14. Contenido de lípidos totales en <i>N. oleoabundans</i> transformada con el gen LTP en medio marino, silvestre en medio marino y silvestre en medio dulce acuícola.....	47
Figura 15. Grupos de ácidos grasos en <i>N. oleoabundans</i> transformada con el gen LTP en MM, silvestre en MM y MD.....	49
Figura 16. Grupos de ácidos grasos de la fracción NL de <i>N. oleoabundans</i> transformada con el gen LTP en MM, silvestre MM y MD.....	52
Figura 17. Grupos de ácidos grasos para la fracción AMPL de <i>N. oleoabundans</i> transformada con el gen LTP en MM, silvestre MM y MD.....	54
Figura 18. Grupos de ácidos grasos para la fracción PL de <i>N. oleoabundans</i> transformada con el gen LTP MM, silvestre MM y MD.....	56
Figura 19. Espectro de ¹ H-RMN del biodiesel obtenido a partir de la biomasa de la muestra NEO MD WT BF	61
Figura 20. Estructura general de una molécula de biodiesel.	62

Lista de tablas

Tabla I. Comparación de diferentes fuentes de biomasa para la producción de biodiesel.....	7
Tabla II. Especies de algas y microalgas y su contenido lipídico	8
Tabla III. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el estudio	19
Tabla IV. Mezcla de reacción de PCR para oligonucleótidos LTP	20
Tabla V. Condiciones de PCR para oligonucleótidos LTP.....	20
Tabla VI. Condiciones de PCR para oligonucleótidos universales	23
Tabla VII. Mezcla de reacción de PCR para oligonucleótidos <i>Agrobacterium</i>	25
Tabla VIII. Condiciones de PCR para oligonucleótidos <i>Agrobacterium</i>	25
Tabla IX. Cuantificación por Nanodrop de las muestras de DNA obtenidas a partir de los cultivos <i>A. tumefaciens</i>	37
Tabla X. Cuantificación por Nanodrop del DNA obtenido a partir de las colonias aisladas.....	41
Tabla XI. Perfil de ácidos grasos de <i>N. oleoabundans</i> transformada con el gen LTP, silvestre MM y MD.....	50
Tabla XII. Perfil de ácidos grasos de la fracción NL de <i>N. oleoabundans</i> transformada con el gen LTP, línea silvestre MM y MD	53
Tabla XIII. Perfil de ácidos grasos para la fracción AMPL de <i>N. oleoabundans</i> transformada con el gen LTP, silvestre MM y MD	55
Tabla XIV. Perfil de ácidos grasos para la fracción PL de <i>N. oleoabundans</i> transformada con el gen LTP, silvestre MM y MD	57
Tabla XV. Valores estimados de número de cetano (CN).....	58
Tabla XVI. Gramos de biomasa para determinación de índice de yodo.....	58
Tabla XVII. Gramos de biodiesel para determinación de índice de yodo	58
Tabla XVIII. Estandarización de Na ₂ S ₂ O ₃	59
Tabla XIX. Volumen de Na ₂ S ₂ O ₃ gastado para valoración de blanco.....	59
Tabla XX. Volumen de Na ₂ S ₂ O ₃ gastado para cada muestra.....	60
Tabla XXI. Índice de yodo calculado para cada muestra.....	60

1. INTRODUCCIÓN

La producción de energías renovables es tema de debate global ya que el agotamiento de los combustibles fósiles, el incremento del precio del petróleo y el aumento en los niveles de CO₂ en la atmósfera, representan grandes problemáticas ambientales. Una alternativa energética prometedora es la producción de biodiesel. El biodiesel consiste de monoalquil-ésteres de alcoholes de cadena corta, como etanol y metanol principalmente, con ácidos grasos de cadena larga, obtenidos a partir de biomasa renovable (Garibay-Hernández, 2008). La primera generación de biodiesel, producido a partir de cultivos vegetales y principalmente semillas oleaginosas, compite por la tierra arable, agua potable y la biodiversidad de paisajes naturales. Estas preocupaciones han aumentado el interés en el desarrollo de biodiesel de segunda y tercera generación empleando organismos lingocelulósicos y fotosintéticos como las microalgas, los cuales ofrecen grandes oportunidades a largo plazo y no compiten por la tierra arable y agua potable. A la fecha, la obtención de biodiesel a partir de microalgas no es redituable pues se requiere 1 barril de petróleo de energía para obtener 1.5 barriles (comparando con derivados fósiles, que requiere un barril para obtener 10) (Clarens *et al.*, 2010). Por lo tanto, es necesario integrar al proceso de obtención de biodiesel, diseños de sistemas de producción de ingeniería, así como el seleccionar y/o generar microalgas oleaginosas que incrementen la producción de lípidos y ácidos grasos idóneos. La producción de biodiesel de cuarta generación implica la manipulación genética de organismos fotosintéticos para aumentar el rendimiento lipídico de los mismos, mediante la modificación de las vías del metabolismo de los lípidos (Lü *et al.*, 2011; Schuhmann *et al.*, 2012).

El biodiesel producido a partir de microalgas tiene varias ventajas, tales como, el de reducir un 78% las emisiones de CO₂, 98% las emisiones de sulfuro y 50% de la materia particulada que se emite después de la combustión, además de

que no se requiere modificaciones los motores de combustión que se utilizan actualmente (Banerjee *et al.*, 2016). Otras ventajas son: los cultivos de microalgas son de 10 a 20 veces más eficientes fotosintéticamente que los cultivos de vegetales, se pueden emplear diferentes tipos de agua, como las residuales y marina (Sharma *et al.*, 2012). Dadas las características anteriores, las microalgas se han considerado como una fuente alternativa para la obtención de biodiesel.

Entre la lista de microalgas que se consideran candidatas para obtener biodiesel, resalta la especie dulceacuícola *Neochloris oleoabundans*. Dicha microalga se adaptó a medio con agua de mar (35 UPS) y llegó a acumular hasta el 72.11% de su peso seco de lípidos neutros (Arredondo-Vega *et al.*, 1995).

La investigación actual sobre la producción de biodiesel en microalgas se ha enfocado en el aumento del rendimiento lipídico a partir de la manipulación genética de las vías metabólicas asociadas a la biosíntesis de lípidos. Algunas de las estrategias que se han empleado en plantas y que se consideran potencialmente exitosas para las microalgas son: modificación de la secreción de lípidos al medio, sobreexpresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos, aumento de la disponibilidad de moléculas precursoras como el acetil-CoA, baja regulación del catabolismo de ácidos grasos por inhibición de la β -oxidación o la hidrólisis de lipasas, alteración de los perfiles de saturación a través de la introducción o regulación de enzimas desaturasas y la optimización del tamaño de las cadenas de ácidos grasos con enzimas tioesterasas (Radakovits *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011; Rismani-Yazdi, *et al.*, 2012; Chungjatupornchai y Watcharawipas, 2014). Los métodos generales como electroporación, bombardeo de partículas, agitación de células suspendidas en presencia del DNA y perlas de vidrio, transposones artificiales, virus y más recientemente *Agrobacterium tumefaciens*, han sido empleados para transformar un gran número de microalgas como las verdes y rojas, diatomeas y dinoflagelados (Tabatabaei *et al.*, 2011).

Basado en lo anterior, el presente trabajo se enfocó en evaluar el efecto de la transformación de la microalga *N. oleoabundans* con el gen transportador de lípidos (LTP) mediante el sistema de *A. tumefaciens* en la producción de lípidos, enfatizando en el perfil de ácidos grasos y su potencial uso en la producción de biodiesel de cuarta generación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Biodiesel

En comparación con el diésel de petróleo, el biodiesel es una fuente de energía renovable y biodegradable que produce menos emisiones nocivas de CO₂, sulfuros, hidrocarburos aromáticos y partículas de hollín durante su combustión. Además, presenta propiedades lubricantes que reducen el desgaste del motor, es un material seguro para su transporte y manejo debido a su baja volatilidad y elevado punto de inflamación (150 °C). Debido a las propiedades físicas de este biocombustible y a su contenido energético cercano al del diésel fósil, su uso no requiere de modificaciones en el motor diésel convencional, por lo que puede ser empleado en éste directamente (Garibay-Hernández, 2008).

En el proceso de transesterificación (Fig. 1) el biodiesel es producido por una reacción entre los ácidos grasos (en forma de triacilglicérido) y un alcohol en presencia de un catalizador, para obtener ésteres metílicos (biodiesel) y glicerol. Dependiendo del tipo de catalizador, la reacción puede ser homogénea, heterogénea o *in-situ*. La catálisis homogénea puede ser básica (empleando KOH, NaOH) o ácida (empleando HCl, H₂SO₄), siendo esta segunda la más empleada en microalgas (Lam y Lee, 2012). También se ha propuesto el uso de lipasas como enzimas catalíticas en la reacción de transesterificación, donde se ha observado una purificación y separación más fácil del biodiesel en comparación con los procesos químicos. Sin embargo, este método resulta costoso debido al precio elevado de las enzimas (Guldhe *et al.*, 2015).

Las propiedades físico químicas del biodiesel están altamente determinadas por la estructura de las cadenas de triacilglicéridos (longitud de cadena, nivel de saturación y grado de ramificación). Las características más importantes de acuerdo a la ASTM (**A**merican **S**ociety for **T**esting and **M**aterials) para biodiesel

estándar (ASTM D6751-09) son la calidad del encendido, propiedades de fluido en frío y estabilidad oxidativa. Por ejemplo, el nivel de saturación tiene un gran impacto en la estabilidad del biocombustible, ya que las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados son susceptibles a una mayor oxidación y por lo tanto al deterioro de las propiedades del mismo (Greenwell *et al.*, 2010). La calidad del biodiesel puede ser evaluada determinando parámetros como: contenido de ésteres metílicos, índice de yodo, número de cetano, índice de acidez, contenido de agua, viscosidad, entre otras. Las especificaciones se encuentran establecidas en la norma Americana ASTM D 6751-02 y en la norma Europea EN 14214-03.

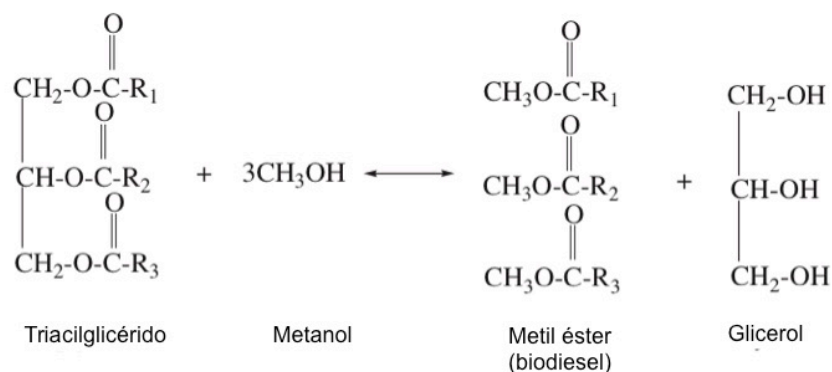


Figura 1. Reacción de transesterificación. Los lípidos (triacilglicéridos) reaccionan con una cadena corta de alcohol (metanol) en presencia de un catalizador (ácido o básico) generando como subproducto glicerol.

El índice de yodo es definido como los gramos de yodo que pueden ser fijados por 100 gramos de grasa. Es el reflejo del número de insaturaciones presentes en una estructura química, sin embargo, no proporciona información sobre la localización de las mismas. Los métodos tradicionalmente usados para determinar el índice de yodo son el método de Wijs y el de Hanus, siendo este último preferido por la facilidad para preparar el reactivo que lleva su nombre (Reactivo Hanus: solución de IBr en ácido acético, pH = 2.4). El índice de yodo puede ser determinado siguiendo el procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana NMX-F-408-1981. En el presente trabajo el índice de yodo se determinó

empleando una adaptación a microescala de dicha Norma (Baeza, 2003), para reducir los tiempos de determinación y costos, pero sobre todo reducir el uso y desecho de reactivos contaminantes; acorde con los preceptos de la química sostenible. Las reacciones involucradas en el método de Hanus para la determinación del índice de yodo se muestran en la figura 2.

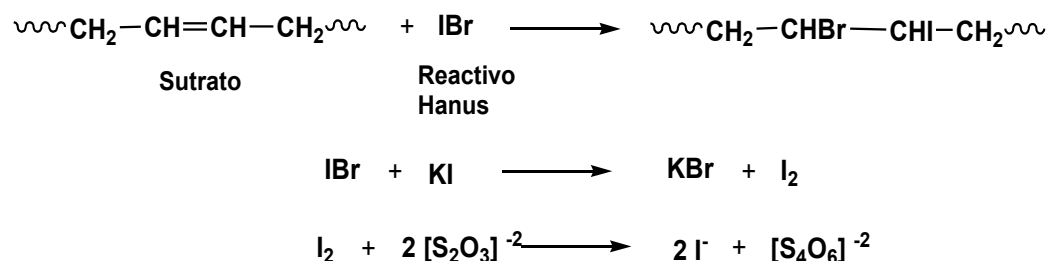


Figura 2. Reacciones para la determinación del índice de yodo por el método de Hanus.

El número de cetano (CN) es un indicador de la calidad del encendido, el cual está determinado por el perfil de ácidos grasos. A mayor longitud de la cadena, mayor nivel de saturación y menor grado de ramificación, se obtiene un mayor valor en el número de cetano y por ende una mejor calidad en el biodiesel. De acuerdo a la norma americana (ASTM D 6751) el valor del CN para que el biodiesel sea considerado de buena calidad debe ser mayor o igual a 47, mientras que la norma europea (EN 14214) especifica que éste debe ser mayor o igual a 51. El número cetano puede ser estimado mediante la ecuación desarrollada por Bamgboye y Hanses (2008).

$$\begin{aligned}
 \text{CN} = & 61.1 + 0.088(\text{C14:0}) + 0.133(\text{C16:0}) + 0.152(\text{C18:0}) - 0.101(\text{C16:1}) \quad (1) \\
 & - 0.039(\text{C18:1}) - 0.243(\text{C18:2}) - 0.395(\text{C18:3})
 \end{aligned}$$

2.2 Producción de biodiesel en microalgas

El biodiesel producido a partir de la biomasa generada por microalgas presenta ciertas ventajas, tales como una mayor producción de lípidos en un

menor espacio (Tabla I), ausencia de efectos adversos en la agricultura tradicional ya que no compiten por la tierra arable, pueden crecer en aguas residuales o marinas, y en ambientes extremos (Tabatabaei *et al.*, 2011). Sin embargo, aún existen algunas barreras técnicas a superar para que las microalgas puedan ser consideradas como una fuente económicamente viable para la producción de biodiesel tales como: el desarrollo de métodos de cosecha eficientes, reducción de la variación en la productividad de biomasa a gran escala en cultivos en el exterior, presencia de especies invasoras en estanques abiertos, limitación en la penetración de radiación solar en cultivos densos de microalgas, entre otros (Radakovits *et al.*, 2010).

Tabla I. Comparación de diferentes fuentes de biomasa para la producción de biodiesel.

Cultivo	Rendimiento lipídico (L/ha)	Área de cultivo (M ha)
Maíz	172	106
Soya	446	41
Canola	1,190	15.3
Jatropha	1,892	9.6
Microalga ^a	136,900	0.13
Microalga ^b	58,700	0.31

Notas: ^a70% de ácidos grasos en peso seco de biomasa; ^b30% de ácidos grasos en peso seco de biomasa.

Los lípidos producidos por las microalgas generalmente incluyen lípidos neutros, lípidos polares, ceras, esteroides e hidrocarburos, así como derivados prenilo como tocoferoles, carotenoides, terpenos, quininas, y derivados de pirroles como la clorofila. Estos lípidos, producidos por las microalgas, se pueden agrupar en dos categorías, lípidos de almacenamiento (lípidos no polares) y lípidos estructurales (lípidos polares). Los lípidos de almacenamiento están mayormente en forma de triacilglicéridos (TAGs), constituidos principalmente de ácidos grasos saturados e insaturados, los cuales pueden ser transesterificados para producir biodiesel. Los lípidos estructurales tienen típicamente un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). De los lípidos no polares, los TAGs son abundantes productos de almacenamiento, los cuales pueden ser catalizados

fácilmente para proveer energía metabólica (Sharma *et al.*, 2012). La síntesis de lípidos neutros en la forma de TAGs puede ser inducida en muchas especies, bajo condiciones de estrés, y estos lípidos son precursores adecuados para la producción de biodiesel. El estrés por nutrientes, como la deficiencia total de nitrógeno (Garibay-Hernández *et al.*, 2013) y/o fósforo, salinidad (Band *et al.*, 1992), irradiación, fotoperiodo (Krzeminska *et al.*, 2014) pH, temperatura, metales pesados y otros han sido estudiados para inducir la producción de lípidos en microalgas (Barenjee *et al.*, 2016). Sin embargo, el estrés mismo provoca una disminución en la actividad fotosintética que conlleva a una tasa de crecimiento más baja (Li *et al.*, 2008).

Diversos estudios muestran una gran variedad de especies de microalgas que presentan la habilidad de producir hasta un 77% de su peso seco en lípidos (Tabla II), lo que las vuelve como fuente potencial para la producción de biodiesel (Abishek *et al.*, 2014).

Tabla II. Especies de algas y microalgas y su contenido lipídico. (Modificado de Abishek *et al.*, 2014)

Cepa	Contenido de lípidos (% del peso seco)
<i>Ankistrodesmus TR-87</i>	28-40
<i>Botryococcus braunii</i>	29-75
<i>Chlorella sp.</i>	29
<i>Chlorella protothecoides</i>	15-55
<i>Cyclotella DI-35</i>	42
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	36-42
<i>Hantzschia DI-160</i>	66
<i>Nannochloris</i>	31
<i>Nannochloropsis sp</i>	31-68
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	31
<i>Scenedesmus TR-84</i>	45
<i>Porphyra Red alga</i>	9-59
<i>Tetraselmis suecica</i>	15-32
<i>Diatoms Nualgi</i>	21-31
Microalga Rich alga	20
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Schizochytrium</i>	50-77

N. oleoabundans es una microalga eucariota, edáfica, aislada de las dunas de Arabia Saudita por Chantanachat y Bold (1962) y presenta un alto contenido de lípidos dependiendo de las condiciones de cultivo. Se ha reportado que puede acumular desde 18 y 88.8% de su peso seco (Garibay-Hernández *et al.*, 2008). Debido a su versatilidad metabólica y al elevado contenido lipídico, esta microalga está clasificada dentro de las oleaginosas y se ha considerado candidato para la producción de biomasa rica en lípidos para la producción de biocombustibles como el biodiesel. Se ha observado que cambios en el pH, el estrés salino y la deficiencia de nitrógeno tienen un efecto en el aumento del contenido lipídico, en esta microalga. Particularmente la deficiencia de nitrógeno promueve altos contenidos de triacilglicéridos (TAGs) que pueden constituir hasta un 80% del contenido lipídico total con ácidos grasos (FAs) saturados y monoinsaturados, con cadenas de 14 a 20 carbonos (Tornabene *et al.*, 1983). También se ha estudiado el efecto de la deficiencia de nitrógeno (de 0 a 1 mM de nitrato) en su composición bioquímica, la cual se ve afectada por esta condición de estrés al reducirse la proliferación celular, sin embargo la masa celular aumenta debido a la acumulación de lípidos (hasta un 55.9% de ácidos grasos totales) y carbohidratos en forma de almidón (Garibay-Hernández, 2013). *N. oleoabundans* puede crecer en agua dulce, agua residual y su crecimiento ha sido adaptado en cultivos en agua marina donde se ha observado un aumento en la acumulación de lípidos neutros de 72.11% (Arredondo-Vega *et al.*, 1995). También se ha estudiado la osmoregulación, la cual se observó que fue capaz de resistir un choque osmótico al someterla a una concentración de 0.6 M NaCl (Band *et al.*, 1992). El efecto en el aumento del pH (8.1 y 10.0) y concentración de sal (420 mM) en *N. oleoabundans* cultivada en medio dulceacuícola en deficiencia de nitrógeno provocó un aumento el contenido de ácidos grasos hasta en 35% en la biomasa seca (Santos *et al.*, 2014).

2.3 Transformación genética de microalgas

La producción de biodiesel de cuarta generación implica el uso de técnicas de DNA recombinante y otras técnicas de bioingeniería para modificar directamente el metabolismo celular de la microalga mediante la introducción, delección y/o modificación de las redes metabólicas, mejoramiento de la maquinaria fotosintética, aumento en la biosíntesis y reducción del catabolismo de ácidos grasos y triacilglicéridos, inhibición de vías competitivas, entre otras, y crear o potenciar así la producción de biodiesel (Lü *et al.*, 2011; Schumann *et al.*, 2012).

Más de 30 diferentes cepas de microalgas han sido transformadas exitosamente a la fecha incluyendo clorofitas, heterocontofitas, diatomeas, faeofitas, rodofitas, dinoflagelados y euglenoides, empleando diversas técnicas como el bombardeo de partículas, perlas de vidrio, electroporación, transposones artificiales, virus, y transformación mediada por *Agrobacterium* (Tabatabaei *et al.*, 2011).

La mayoría de los avances en este tema han sido en la transformación de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* que ha sido utilizado como organismo modelo (Radakovits *et al.*, 2010). En un estudio se realizó la modificación de genes del complejo de captación de luz LHC (Light-Harvesting antenna Complexes) mediante RNAi para regular de manera negativa el sistema LHC, observando un aumento en la eficiencia del cultivo celular en condiciones de alta intensidad luminosa (Mussnug *et al.*, 2007). Otro estudio realizado en *C. reinhardtii* implicó la inserción mediante mutagénesis del gen *tla1* relacionado en el tamaño de la antena del complejo LHC, con una disminución en el tamaño de la antena en los fotosistemas I y II (Polle *et al.*, 2003). Otros ejemplos de trabajos realizados en *C. reinhardtii* han sido: **a)** la modificación en la producción de lípidos mediante la represión de genes codificantes para la proteína mayor de la gota lipídica (MLDP) mediante RNAi, obteniendo un aumento en el tamaño de la gota lipídica (diámetro 40% mayor) sin cambios en el contenido de triacilglicéridos o

metabolismo de lípidos (Moellering y Benning, 2010); **b)** modificación en los genes de la ADP-glucosa pirofosforilasa para generar una cepa deficiente en la producción de almidón observándose un aumento de 30% en el contenido de los cuerpos lipídicos, los cuales contenían 90% TAGs y 10% ácidos grasos libres (Wang *et al.*, 2009); **c)** sobre expresión de diacilglicerol aciltransferasa tipo 2 (DGAT), en el cual no se obtuvieron cambios en el contenido de TAGs ni en los perfiles de ácidos grasos (La Russa *et al.*, 2012).

Otros ejemplos se tienen en *Chlorella pyrenoidosa* donde se observó un aumento en la tasa de crecimiento, proteínas y ácidos grasos poliinsaturados en una cepa deficiente en la producción de almidón, acumulando 20.4% más ácidos grasos poliinsaturados y 18% menos ácidos grasos saturados en comparación con la cepa silvestre (Ramazanov y Ramazanov, 2006). En las diatomeas *Cyclotella cryptica* y *Navicula sapuville* se realizó la sobreexpresión de Acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) observando un aumento en la actividad de la enzima sin cambios en el contenido de lípidos (Dunahay *et al.*, 1996). En *Parietochloris incisa* se realizó mutagénesis química en el gen de la enzima Δ -5 desaturasa, generando un aumento en el contenido de ácidos grasos de 39% en comparación con la cepa silvestre de 34% (Iskandarov *et al.*, 2011). En *Phaeodoactylum tricornutum* la introducción de un gen transportador de glucosa, propició el cambio de metabolismo autotrófico a heterotrófico (Zaslavskaja *et al.*, 2001). También en esta microalga la expresión heteróloga de dos enzimas tioesterasas provocó el aumento en la acumulación de ácidos grasos de cadena corta C12:0 en un 6.2% del peso seco de los ácidos grasos totales, y C14:0 hasta 15% (Radakovits *et al.*, 2011), así como la sobreexpresión de diacilglicerol aciltransferasa tipo 2 (DGAT) estimulando la producción de gotas lipídicas y un aumento en el contenido de lípidos neutros en un 35% con un aumento del 76.2% de ácido eicosapentaenoico (C20:5 ω 3) (Niu *et al.*, 2013).

En cuanto a la microalga *N. oleoabundans* se han reportado métodos exitosos de transformación empleando el sistema de *A. tumefaciens*, uno de ellos

utilizando diferentes tiempos de co-cultivo y soportes para el mismo, diferentes temperaturas e irradiación, con una eficiencia de 30 colonias transformadas por millón de células sembradas, de las cuales un 82% mantuvo el fenotipo de transformación durante al menos un año (Ikarán, 2011). Utilizando el método de electroporación se logró transformar *N. oleoabundans* obteniéndose una estabilidad de transformación de hasta 6 meses en ausencia de antibiótico de selección (Chungjatupornchai *et al.*, 2016). También se clonó y se realizó la caracterización funcional del cDNA que codifica para la enzima diacilglicerol transferasa tipo 2 (DGAT) de *N. oleoabundans* y su transformación en *Saccharomyces cerevisiae* deficiente de DGAT obteniendo la restitución de la formación de cuerpos lipídicos y síntesis de TAGs. Estas investigaciones muestran que *N. oleoabundans* es un candidato para realizar la manipulación genética y favorecer el aumento en el contenido de TAGs y por ende, la producción de biodiesel (Chungjatupornchai y Watcharawipas, 2015).

2.4 Proteínas transportadoras de lípidos

Las proteínas transportadoras de lípidos (**Lipid Transfer Protein**) son proteínas pequeñas (\approx 9 kDa) que presentan la habilidad de unirse y transferir lípidos *in vitro*. Un gran número de estas proteínas han sido localizadas en membrana plasmática, pared celular y en la cera cuticular en plantas, por lo que se les han relacionado funciones con el transporte cuticular de lípidos en plantas. Además, se ha observado su participación en los procesos de adhesión del polen durante la reproducción y en la respuesta a estrés abiótico como bajas temperaturas, choque térmico, sequía y salinidad (Hurlock *et al.*, 2014).

El gen que codifica para esta proteína ha sido aislado y caracterizado a partir de nopal y se ha evaluado la resistencia a estrés salino en *A. thaliana* en donde mutantes para este gen mostraron una reducción en el porcentaje de germinación (Rojas-Arzaluz, 2012). Este mismo gen se insertó en la microalga

dulceacuícola *Chlorella sorokiniana* y se evaluó la resistencia a estrés salino, en donde se observó un aumento de hasta 1.6 veces el tamaño de la gota lipídica (Cabada, 2014).

3. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿La inserción del gen LTP en la microalga *N. oleoabundans* cultivada en medio dulceacuícola y marino favorecerá la producción de ácidos grasos saturados y monoinsaturados y repercutirá en la calidad del biodiesel?

4. HIPÓTESIS

Si la inserción del gen transportador de lípidos (LTP) favorece la producción de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en la microalga *N. oleoabundans* cultivada en medio dulceacuícola y marino, entonces, aumentará el potencial para ser utilizado en la producción de biodiesel.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el potencial en la producción de biodiesel de la microalga *N. oleoabundans* cultivada en medio dulceacuícola y marino y transformada con el gen transportador de lípidos LTP.

5.2 Objetivos particulares

1. Obtener cepas transformadas de *N. oleoabundans* con el gen transportador de lípidos LTP.
2. Determinar la tasa de crecimiento y perfil de ácidos grasos de la cepa silvestre de *N. oleoabundans* cultivada en medio dulceacuícola y marino y de la cepa transformada.
3. Caracterizar el biodiesel obtenido de la microalga *N. oleoabundans* cultivada en medio dulceacuícola y marino para la cepa transformada y silvestre.

6. JUSTIFICACIÓN

Con la presente investigación se cubren 3 aspectos del conocimiento: 1) Conocimiento en ciencia básica sobre el comportamiento en los perfiles lipídicos de la microalga *N. oleoabundans* cultivada en medio dulceacuícola y marino. 2) Conocimiento de la funcionalidad de la LTP en el metabolismo de lípidos en el modelo microalga. 3) Evaluación del potencial de una microalga transformada para la producción de biodiesel de cuarta generación. Lo anterior contribuirá en el área de la biotecnología aplicada para la generación de opciones en la producción de biocombustibles (biodiesel).

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Organismo y condiciones de cultivo

La microalga *N. oleoabundans* fue adquirida en la UTEX (1185) y se mantiene en el Cepario de CIBNOR en medio F/2 de Guillard y Ryther (1962) a 20°C, fotoperiodo luz:oscuridad de 12:12h y una intensidad luminosa de 1.852 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

7.1 Axenización y transformación genética de *N. oleoabundans* con el gen transportador de lípidos LTP

La transformación de *N. oleoabundans* se realizó utilizando *A. tumefaciens* GV2260 para lo cual fue necesario axenizar las microalgas antes de seguir el protocolo de transformación.

Para eliminar la carga bacteriana presente en cultivos de *N. oleoabundans* en medio dulceacuícola (MD) y marino (MM), se realizaron cultivos en medio líquido Nutrient Broth (NB) (Sigma-Aldrich: 70122-100G) y F/2 en tubos cónicos estériles de 50 mL en un volumen final de 20 mL adicionado con el antibiótico cefotaxima a una concentración final de 250 mg L⁻¹. Los cultivos fueron inoculados con 50 μL de medio de cultivo de *N. oleoabundans* en medio dulceacuícola y marino, cada uno a una dilución 1:10000. Para ambos medios de cultivo se realizaron ensayos por duplicado.

Además, se prepararon placas Petri con medio NB dulceacuícola y NB marino en un volumen de 15 mL con una concentración de agar de 1.2 % adicionados con cefotaxima a una concentración de 250 mg L⁻¹. Los cultivos fueron inoculados con 50 μL de medio de cultivo de *N. oleoabundans* en medio dulceacuícola y marino respectivamente, a una dilución 1:100, 1:10,000 y 1:1,000,000, para ambos medios. También se realizaron inoculaciones por estría

cruzada con la dilución 1:10,000 para ambas condiciones de cultivo en medio NB adicionado con cefotaxima a una concentración de 250 mg L⁻¹.

Todos los cultivos se incubaron a 28°C, fotoperiodo luz:oscuridad de 16:8h. Para los cultivos líquidos se realizó agitación manual cada 24h. Los cultivos fueron resembrados cada dos semanas aproximadamente bajo las mismas condiciones de cultivo hasta obtener cultivos libres de otros microorganismos (axénicos). Una vez que se obtuvieron líneas axénicas, los cultivos líquidos se escalaron a matraces de 250 mL con 100 mL de medio NB dulceacuícola y marino, adicionados con cefotaxima (250 mg L⁻¹). Los cultivos en medio sólido tanto medio dulce como medio marino se almacenaron en refrigeración a 4°C.

7.1.2 Verificación de inserto del gen LTP *A. tumefaciens* pMDC32:LTP

7.1.2.1 Activación de *A. tumefaciens* pMDC32:123LTP y pMDC32:124LTP

Para confirmar la presencia del gen LTP en *A. tumefaciens* pMDC32:LTP, se activaron las líneas celulares previamente transformadas *A. tumefaciens* pMDC32:123LTP y *A. tumefaciens* pMDC32:124LTP. Para esto, se realizaron cultivos en tubos de ensaye con 5 mL de medio LB (Sigma-Aldrich: L3022-250G), adicionado con los antibióticos kanamicina y rifampicina a una concentración de 50 mg L⁻¹ cada uno, en los cuales fueron inoculados tres tubos con 10 µL de la cepa de *A. tumefaciens* pMDC32:123LTP (*A. tumefaciens* PMDC32:123LTP A, B y C) y tres tubos con 10 µL de la cepa de *A. tumefaciens* pMDC32:124LTP (*A. tumefaciens* PMDC32:124LTP A, B y C).

7.1.2.2 Extracción de DNA plasmídico de *A. tumefaciens* pMDC32:123LTP y *A. tumefaciens* pMDC32:124LTP

La extracción de DNA plasmídico se realizó a partir de 1 mL de cultivo de dos muestras de *A. tumefaciens* pMDC32:123LTP (*A. tumefaciens* PMDC32:123LTP A y B) y dos muestras de *A. tumefaciens* pMDC32:124LTP (*A. tumefaciens* PMDC32:123LTP A y B) empleando el kit de extracción Purelink

Quick plasmid Miniprep kit (Invitrogen: K210011). Se realizó una cuantificación en espectrofotómetro (Thermo Scientific, NanoDrop ND-1000) y se observó el DNA plásmido por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Phytotechnology Lab: A1050) empleando como referencia DNA plasmídico de *Escherichia coli* pMDC32:LTP.

7.1.2.3 Confirmación de inserción mediante PCR

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando las muestras de DNA plasmídico de *A. tumefaciens* obtenidas previamente y primers específicos para el gel LTP (Tabla III). La mezcla para la reacción de PCR se realizó empleando la enzima DNA polimerasa (Promega GoTaq Flexi DNA Polymerase: M8295) en un volumen final de reacción de 13.5 μL (Tabla IV). El programa para la reacción de PCR se realizó en termociclador (Biorad, T100 Thermal Cycler), las temperaturas de amplificación se muestran en la tabla V. Las muestras de DNA de *A. tumefaciens* se analizaron sin diluir y a una concentración de 5 ng μL^{-1} . La presencia de bandas se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se analizaron como referencia DNA plasmídico de *Escherichia coli* pMDC32:LTP, como control negativo se empleó 1 μL de agua y como control positivo DNA de *Chlorella sorokiniana* transformada con el gen LTP (pMDC32:123LTP).

Tabla III. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el estudio.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)
OpsLTP-F	CAG AAT GGC TAG CTC AGC GGT T	364
OpsLTP-R	CAT CTA GTT CAC CTT GGA GCA GTC	
C58GlyA-F	CCA CCA CCA CGA CGC ACA AGT CT	423
C58GlyA-R	TGC CGA GAC GGA CAC CCG AC	
Univ F-1131	AAA CTY AAA GRA ATT GAC GG	498
Univ R-1629	GAC GGG CGG TGT GTR C	

Nota: Bases degeneradas IUPAC: Y representa C o T; R representa A o G.

Tabla IV. Mezcla de reacción de PCR para oligonucleótidos LTP.

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer	2.5
H ₂ O MiliQ	5.7
MgCl ₂	2
Oligonucleótido 5' (20 mM)	0.5
Oligonucleótido 3' (20 mM)	0.5
dNTP's	0.25
Taq polimerasa	0.0625
DNA	1

Tabla V. Condiciones de PCR para oligonucleótidos LTP.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5 min	
94°C	1 min	
58°C	30 seg	35
72°C	40 seg	
72.2°C	7 min	
25°C	∞	

7.1.3 Transformación genética de *N. oleoabundans* mediante *A. tumefaciens*

La transformación genética de la microalga *N. oleoabundans* se realizó a partir de inóculos de dos días de cultivo en medio NB dulceacuícola (MD) y NB marino (MM) los cuales fueron adicionados con acetosiringona (150 μM), con y sin ácido morfolino etanosulfónico (MES) para cada condición de cultivo (MD y MM), en un volumen de 25 mL, ajustando el pH a 5.8. Estos fueron cultivados durante 72 h a 28°C, con fotoperiodo luz:oscuridad de 16:8h. Posteriormente, se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer y se ajustaron los inóculos a 50×10^6 cel mL^{-1} .

Al mismo tiempo se realizó la activación de cepas de *A. tumefaciens* pMDC32:123LTP, la cual contiene el inserto con el gen LTP, para lo cual fueron cultivadas en 5 mL de medio LB adicionado con Kanamicina (50 mg L^{-1}) y rifampicina (50 mg L^{-1}) y cultivadas durante 72h bajo las condiciones de cultivo previamente mencionadas. Posteriormente, los cultivos de *A. tumefaciens*

pMDC32:123LTP se concentraron, se determinó su densidad y se ajustó a una $DO_{600} = 0.1$.

7.1.3.1 Ensayo de resistencia a antibiótico

Debido a que la cepa de *A. tumefaciens* a emplear para el ensayo de transformación (*A. tumefaciens pMDC32:123LTP*) contiene un plásmido de transformación en cuya construcción se encuentra un marcador de selección de colonias transformadas mediado por el antibiótico higromicina, se realizaron ensayos de resistencia a dicho antibiótico para determinar la concentración letal en *N. oleoabundans*. Se realizaron cultivos en placa Petri con medio NB adicionado con 0 y 100 mg L⁻¹ de higromicina y una concentración celular de 1×10^6 cel mL⁻¹ se empleó como control positivo placas Petri inoculadas con la microalga *C. sorokiniana* en medio NB adicionado con 200 mg L⁻¹ de higromicina, concentración previamente determinada como letal para esta microalga. Las placas fueron cultivadas a una temperatura de 28°C, con un fotoperiodo luz:oscuridad de 16:8h.

7.1.3.2 Condiciones de co-cultivo de *N. oleoabundans* con *A. tumefaciens*

Para el co-cultivo se agregó un volumen de 500 µL ($DO_{600} = 0.1$) de la suspensión bacteriana a 1 mL de cultivo de microalga (50×10^6 cel mL⁻¹) que posteriormente fue concentrado mediante centrifugación y se removieron 500 µL del sobrenadante para tener una suspensión de co-cultivo en 1 mL. El volumen del co-cultivo se colocó en filtros de papel Whatman el cual se utilizó como soporte del co-cultivo y estos filtros fueron colocados en placas Petri (3 filtros por placa) adicionadas con medio NB dulceacuícola y marino, con y sin MES. Las placas se cultivaron durante 3 días bajo las condiciones de cultivo previamente mencionadas. Una vez transcurrido el tiempo del co-cultivo, se removieron los filtros de las placas y se realizaron lavados empleando 15 mL de medio NB adicionado con cefotaxima (250 mg mL⁻¹). La suspensión recuperada se concentró y se determinó el número de células por recuento en cámara de Neubauer. La

densidad se ajustó a una concentración de 0.5×10^6 cel mL⁻¹. La suspensión recuperada de los filtros se almacenó a 4°C.

7.1.4 Selección de colonias transformadas

A partir del concentrado celular recuperado de los filtros del co-cultivo (tres filtros por medio de cultivo) se inocularon placas Petri con medio NB dulce acuícola y marino adicionado con cefotaxima (250 mg L⁻¹) e higromicina (100 mg L⁻¹) a una concentración de 0.5×10^6 cel mL⁻¹. Las placas fueron cultivadas a 28°C, fotoperiodo luz:oscuridad de 16:8h hasta la aparición de crecimiento microalgal. Como control se realizó la siembra en placas sin antibiótico para cada uno de los concentrados.

Una vez que se presentó crecimiento microalgal, se seleccionaron las colonias y se aislaron en placas Petri cuadrículadas con medio NB dulceacuícola y marino adicionado con cefotaxima (250 mg L⁻¹) e higromicina (100 mg L⁻¹) y en placas individuales para cada colonia aislada. Todas las placas se cultivaron en las condiciones mencionadas previamente hasta la aparición de crecimiento microalgal.

A partir de estas muestras se tomaron inóculos para cultivar a 3 mL de medio NB dulceacuícola y marino en tubos de vidrio de 10 mL. Los tubos fueron cultivados bajo las condiciones mencionadas previamente.

7.1.4.1 Extracción de DNA a partir de las colonias aisladas

Una vez que se obtuvo crecimiento microalgal en medio líquido a partir de las colonias aisladas se realizó una extracción de DNA por el método de CTAB, para lo cual se tomaron 1.5 mL de medio de cultivo y se concentraron mediante centrifugación a $2,400 \times g$, 4°C (Thermo Scientific, HERAEUS Pico 17), durante 5 minutos desechando el sobrenadante, al pellet formado se añadieron 700 µL de buffer de lisis CTAB 2X y nuevamente se centrifugaron las muestras a $2,400 \times g$, 4°C, durante 2 minutos. Posteriormente, se maceraron las células empleando un

pistilo y se incubaron las muestras a 65°C durante 30 minutos, en baño maría. Para la purificación del DNA se añadieron 600 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se homogenizaron las muestras por inversión vigorosa. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 9,600 x g, 4°C, durante 10 minutos y se recuperó la fase acuosa en un tubo eppendorf nuevo. A continuación, se agregaron 500 µL de isopropanol, se mezclaron las muestras por inversión y se dejaron incubar durante toda la noche a -20°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron centrifugadas a 16,200 x g, 4°C, durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol al 70%, nuevamente las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm, 4°C, durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se evaporó el etanol. Las muestras fueron re suspendidas en 30 µL de agua miliQ estéril. Se realizó una cuantificación por NanoDrop.

7.1.4.2 Confirmación mediante PCR empleando oligonucleótidos universales

Primeramente se realizó un ensayo de PCR empleando las muestras de DNA previamente obtenidas y oligonucleótidos específicos para secuencias universales de organismos eucariotas UnivF-1131 y UnivR-1629 (Tabla III). La mezcla de reacción se realizó bajo las mismas determinaciones que se muestran en la tabla IV, mientras que las condiciones del ensayo de PCR se muestran en la Tabla VI. Se emplearon como controles positivos muestras de DNA de *N. oleoabudans* en medio marino sin transformar y DNA de *C. sorokiniana* sin transformar y como control negativo agua. Las muestras obtenidas del ensayo se observaron en electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla VI. Condiciones de PCR para oligonucleótidos universales.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min	
95°C	30 seg	
50°C	30 seg	34
72°C	2 min	
72°C	5 min	
25°C	∞	

7.1.4.3 Confirmación de inserción por PCR empleando oligonucleótidos específicos para LTP

Para la confirmación de la inserción del gen LTP se realizó un ensayo de PCR empleando las muestras de DNA previamente obtenidas y los oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia del gen LTP OpsLTP-F y OpsLTP-R (Tabla III). La mezcla para la reacción de PCR fue la misma que se muestra en la Tabla IV así como el programa de reacción que se muestra en la Tabla V. Se empleó como control positivo DNA de *A. tumefaciens* pMDC32:LTP123 y como control negativo agua. Las muestras obtenidas del ensayo se observaron en electroforesis en gel de agarosa al 1%.

7.1.4.4 Confirmación de inserción por PCR empleando oligonucleótidos específicos para *Agrobacterium*

Para descartar amplificaciones de falsos positivos que pudieran estar siendo detectados debido a la presencia de DNA proveniente de *Agrobacterium* que no haya sido eliminado en los lavados con cefotaxima, se realizaron ensayos de PCR empleando los oligonucleótidos específicos C58GlyA-F y C58GlyA-R (Tabla III) los cuales son empleados para la detección de la cepa de *A. tumefaciens* GV2260 la cual fue empleada en el ensayo de transformación. La mezcla de reacción empleada se muestra en la tabla VII, el volumen final de reacción fue de 25 μ L. Las condiciones de reacción se muestran en la tabla VIII. Se empleó como control positivo DNA de *A. tumefaciens* pMDC32:LTP123 y como control negativo agua. Las muestras obtenidas del ensayo se observaron en gel de electroforesis.

Tabla VII. Mezcla de reacción de PCR para oligonucleótidos *Agrobacterium*.

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer	5
H ₂ O MiliQ	9.2
MgCl ₂	2
Oligonucleótido 5' (20 mM)	2.5
Oligonucleótido 3' (20 mM)	2.5
dNTP's	2
Taq polimerasa	0.3
DNA	2

Tabla VIII. Condiciones de PCR para oligonucleótidos *Agrobacterium*.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	3 min	
94 °C	20 seg	
61 °C	20 seg	35
72 °C	30 seg	
72 °C	5 min	
25 °C	∞	

7.2 Tasa de crecimiento y perfil de ácidos grasos de *N. oleoabundans*

La tasa de crecimiento se determinó a partir de las curvas de crecimiento realizadas por recuento celular en cámara de Neubauer. Para el análisis del perfil de ácidos grasos previamente se extrajeron y cuantificaron los lípidos totales y a partir de éstos, se cuantificaron los ácidos grasos. La separación de las fracciones lipídicas en lípidos neutros, polares y fosfolípidos, se partió de los lípidos totales extraídos y se separaron en columnas de sílica. Las fracciones se concentraron con nitrógenos gaseoso para proceder a la extracción de ácidos grasos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y la biomasa obtenida por liofilización, se utilizó para la cuantificación de los lípidos y ácidos grasos. Todos los resultados se expresaron en porcentaje con respecto al peso seco.

7.2.1 Determinación de la concentración celular y curva de crecimiento

A partir de los cultivos de la cepa silvestre en medio dulceacuícola (NEO WT MD) y marino (NEO WT MM), así como la línea celular transformada en medio marino (NEO LTP MM) se realizaron cultivos por triplicado en un volumen de 450 mL utilizando el fertilizante agrícola Bayfolan (BAYER), debido a que la línea transformada no presentó crecimiento en el medio NB empleado anteriormente. Los cultivos fueron mantenidos a 28°C, fotoperiodo luz:oscuridad de 16:8h y aireación constante proporcionada por bombas de pecera. Para la curva de crecimiento se tomaron muestras cada 24 h durante 6 días para los cultivos de la cepa silvestre, mientras que para la línea transformada se tomaron muestras hasta el día 7. En ambos casos, se determinó el crecimiento celular mediante el recuento diario en cámara de Neubauer. La tasa de crecimiento se calculó de acuerdo a la ecuación definida por Guillard (1973).

Tasa de crecimiento.

$$\mu = \ln X_1 - \ln X_2 / T_2 - T_1 \quad (2)$$

Donde:

x: concentración de la biomasa (cel mL⁻¹)

t: tiempo en días

7.2.2 Extracción y determinación de lípidos totales y perfil de ácidos grasos de *N. oleoabundans*

Para la extracción de lípidos totales se utilizó el protocolo propuesto por Bligh y Dyer (1959). A partir de 5 mg de biomasa liofilizada (Labconco, Free zone 1) de la cepa silvestre y transformada se realizó la extracción agregando 3 mL de la mezcla de CHCl₃:CH₃OH:H₂O (1:2:06) y 5 µL de BHT (1 mg L⁻¹ en CHCl₃) preparada a una concentración de 1 mg L⁻¹ en CHCl₃. La mezcla se sonicó 20 minutos en baño de agua con hielo. Posteriormente las muestras se incubaron a 4°C protegidos de la luz durante 36 h para asegurar la extracción completa de lípidos. Transcurrido el tiempo se sonicó (VWR Ultrasonic Cleaner, 97043-984)

nuevamente en frío durante 15 minutos, se agregó 1 mL de CHCl_3 y 1.2 mL de agua destilada y se centrifugó a $2,215 \times g$ durante 15 minutos a 10°C (Beckman, Coulter Allegra 21 R). El extracto cloroformo: lípidos se recuperó con pipeta Pasteur y se colocó en un tubo nuevo.

Para la cuantificación de lípidos totales se utilizó el método de calcinación de Marsh y Weinstein (1966). A partir de los lípidos totales extraídos se tomó una alícuota (calculada con base en la concentración media de la curva de calibración) y se concentró a sequedad con nitrógeno gaseoso. Posteriormente, se añadió 2 mL de H_2SO_4 concentrado, se selló el tubo con papel aluminio y se cerró con la tapa. La mezcla se calentó a 200°C por 15 minutos (Terlab, TE-H35D). Pasado el tiempo se sacaron las muestras y se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente, después se colocaron en un baño con agua con hielo por 5 minutos. Enfriada la muestra, se agregó 3 mL de agua destilada y se mezcló con vortex, verificando que la mezcla quedara homogénea y sin residuos de materia orgánica. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 375 nm (Thermo Scientific, Spectronic 20 Genesys). El equipo se calibró con un blanco de H_2SO_4 que se trató de igual manera que las muestras. Previamente se realizó la curva de calibración utilizando tripalmitina como estándar en un rango de concentración de 30 a 180 mg mL^{-1} . De la curva de calibración se obtuvo la ecuación en donde la pendiente (m) de la curva corresponde al factor de corrección que se utilizó en los cálculos. Los datos se expresaron en % con respecto al peso seco. La determinación de lípidos totales se basa en la formación de una mezcla monofásica de cloroformo, metanol y agua ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$) con la que se asegura la extracción de la mayoría de los lípidos incluyendo aquellos que se encuentran ligados a otras moléculas.

7.2.3 Extracción y determinación de ácidos grasos

Para la extracción y cuantificación de ácidos grasos es necesario preparar derivados no reactivos de éstos, es decir, metil-ésteres. Los ácidos grasos se

extrajeron utilizando una mezcla de solventes con ácido clorhídrico y se transformaron por una reacción de transesterificación a metil-ésteres, en la cual un mol de triglicérido es desplazado por tres moles de otro alcohol (metanol) en condiciones ácidas (Sato y Murata, 1988).

A partir de los lípidos extraídos anteriormente, colocados en un tubo de tapón de rosca, se sometieron a la reacción de metanólisis (o derivatización) en el cual se adicionó 2.5 mL de la mezcla de HCl:CH₃OH (5% v/v) a 85°C por 2.5h. Pasado el tiempo, se sacaron las muestras, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Los metil-ésteres obtenidos de la reacción, se extrajeron con 1.5 mL de hexano (grado HPLC) con ayuda de una pipeta Pasteur limpia, se tomó la fase superior y se colocó en otro tubo. La mezcla se lavó una segunda vez con 1.5 mL de hexano (grado HPLC), nuevamente se separó la fase superior y se colocó en el tubo anterior. Con el fin de eliminar humedad del extracto de ácidos grasos-metil esterificados, a la muestra se le agrega una pizca de NaSO₄ anhidro. Se inyectó manualmente un volumen conocido de cada muestra en el equipo de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) (HP, 1800B GCD System).

Para la separación y cuantificación de los ácidos grasos en el GCMS se utilizó una columna capilar OMEGAWAX 250 (SUPELCO, OMEGAWAX 250) cuyas dimensiones son: 30 m longitud x 0.25 mm diámetro externo x 0.25 µm diámetro interno. Las condiciones del GCMS fueron: volumen de inyección: 1 a 5 µL, gas portador: He (pureza 99.997%), flujo de He en la columna: 0.9 mL min⁻¹, inyección sin división (splitless), temperatura del inyector: 250°C, temperatura del detector: 260°C.

El programa del GCMS fue: temperatura inicial del horno 110°C durante 3 minutos, incremento de 30°C min⁻¹ hasta 165°C, se mantiene a esa temperatura 2 minutos y posteriormente se incrementa 2.2°C min⁻¹ hasta 209°C. Se mantuvo esa temperatura 35 minutos. El método de adquisición de espectros de masas es:

retardo del solvente: 4.5 minutos, rango de masas: 45-450 unidades de masa atómica (uma), tiempo entre barridos 0.5 minutos. La identificación de cada ácido graso se realizó comparando los tiempos de retención de los ácidos grasos de la curva de calibración y se corroboró mediante identificación de los iones característicos de los espectros de masa de cada grupo de ácidos grasos. La cuantificación se realizó considerando la pendiente (factor de corrección) de cada uno de los ácidos grasos de la curva de calibración previamente hecha (realizada con una mezcla de 37 ácidos grasos metilados), en donde el área de cada pico del ácido graso es directamente proporcional a la concentración de ese ácido graso. Para la identificación de los ácidos grasos se utilizó el programa WSEARCH2005 liberado gratuitamente por la Universidad de Australia como apoyo a los estudiantes. Los resultados se expresaron como $\mu\text{g mg}^{-1}$ de ácido graso con respecto al peso seco.

7.2.4 Separación y cuantificación de ácidos grasos en fracciones lipídicas

Para la separación de las diferentes fracciones lipídicas tanto de la cepa silvestre como de la línea transformada, se partió del extracto lipídico total obtenida anteriormente. Primero, se prepararon micro columnas con pipetas Pasteur nuevas las cuales se empaquetaron con sílica gel. Segundo, las columnas se activaron de la siguiente manera: 4.5 h en la mufla a 490°C , 1h en el horno a 60°C y finalmente 30 min en el desecador (NALGENE). Tercero, las columnas se colocaron en un soporte, y se lavaron de la siguiente manera: 6 mL de CH_3OH y 6 mL de CHCl_3 y 3 mL de la mezcla de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCOOH}$ (98:1:0.5). Los residuos de cada lavado, se colectaron en un tubo para desechar. Una vez lavadas las columnas, se inició la separación de las diferentes fracciones de lípidos: neutros (NL), fosfolípidos o polares (PL) y galactolípidos o lípidos polares afines a la acetona (AMPL).

De los extractos totales de los lípidos totales obtenidos anteriormente de cada muestra, se tomaron 0.5 mL que se concentraron a sequedad con nitrógeno

gaseoso, y posteriormente se resuspendieron en 0.5 mL de CHCl_3 . Este volumen de muestra se colocó en las columnas para separar las fracciones de lípidos. Para la obtención de NL la muestra en la columna se separó al agregarle 8 mL de la mezcla de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCOOH}$ (98:1:0.5). La fracción NL se colectó en un tubo de vidrio limpio con tapón de rosca. Para la obtención de AMPL se colectó en otro tubo limpio. En este paso, la columna se lavó con 3 mL de CHCl_3 y 6 mL de CH_3OH . Los residuos de los lavados, se colocaron en un tubo para desechar. Finalmente para la fracción PL se utilizó 9 mL de la mezcla $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (5:4), que fue recuperada en otro tubo de vidrio. Todas las fracciones se realizaron por triplicado. Un paso importante fue evitar el secado de la columna en cada separación de fracciones.

Las fracciones obtenidas (NL, PL, AMPL) se concentraron con nitrógeno gaseoso y se derivatizaron de acuerdo al protocolo mencionado anteriormente (7.2.3). Las fracciones metiladas se inyectaron en el GCMS y una vez obtenido el cromatograma, se identificaron los ácidos grasos utilizando el programa WSEARCH2005.

7.3. Caracterización del biodiesel

Para la caracterización del biodiesel, producido mediante transesterificación ácida, a partir del aceite obtenido de los cultivos de *N. oleoabundans*, se realizó la estimación del número de cetano (CN) y se calculó el índice de yodo para determinar la calidad del biodiesel producido, además se realizó un análisis de resonancia magnética para verificar la estructura del biodiesel generado.

7.3.1 Número de cetano (CN)

Para la estimación del número de cetano (CN) se empleó la ecuación (1) a partir del promedio del porcentaje de ácidos grasos determinado previamente en el punto 7.2.3 para cada línea celular evaluada. La ecuación implica la proporción de

ácidos grasos saturados C14:0, C16:0 y C18:0, ácidos grasos monoinsaturados C16:1 y C18:1 y ácidos grasos poliinsaturados C18:2 y C18:3. La ecuación fue desarrollada por Bamgboye y Hanses (2008) a partir de ecuaciones de regresión para la predicción del número de cetano del biodiesel de aceites vegetales, es capaz de predecir con un 88% de exactitud el CN. En nuestros resultados, consideramos esta ecuación para estimar el CN del biodiesel de la cepa silvestre y transformada de *N. oleoabundans*, ya que dicha cepa presenta el perfil de ácidos grasos semejante al de los aceites vegetales que los autores utilizaron para definir la ecuación.

7.3.2 Transesterificación ácida

A partir de la biomasa liofilizada tanto de la cepa silvestre como transformada, se realizó la reacción de transesterificación del aceite de la microalga. Para ello se colocó la biomasa liofilizada en un matraz bola de fondo redondo de 50 mL y se agregaron 12 mL de disolución 5% de HCl:CH₃OH y se sonicó durante 45 minutos en baño con hielo. Posteriormente se calentó la muestra a reflujo, a 80°C en un baño de aceite de silicón durante 3h con agitación magnética moderada, y una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. En esta etapa se observó la formación de dos fases, una líquida y la biomasa contenida al fondo del matraz. Para la extracción se tomó la fase líquida la cual está formada por la fase orgánica (biodiesel) y la fase acuosa (agua, trazas del catalizador, glicerina). El biodiesel fue extraído de la fase orgánica empleando hexano, para lo cual primeramente se separó la fase líquida por decantación y se colocó en una probeta de 25 mL a la cual se agregaron entre 4-7 mL de hexano y se agitó moderadamente para lavar y extraer el biodiesel. La fase orgánica (hexano-biodiesel) se colocó en un vaso de precipitado previamente pesado y el biodiesel se obtuvo por evaporación del hexano. Para calcular el rendimiento por el método gravimétrico se pesó el vaso de precipitado con el biodiesel y se restó el peso del vaso vacío.

7.3.2.1 Análisis de resonancia magnética

Para determinar que durante la transesterificación ácida el aceite de *N. oleoabundans* haya reaccionado completamente y se hubiera obtenido biodiesel, es decir que los triésteres se transformaron por completo en ésteres metílicos, se realizó un análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno ^1H -RMN (Varian spectrometer Inova Unit 300) para sólo una de las muestras de biodiesel generada. Esta técnica permite identificar los distintos tipos de átomos de hidrógeno presentes en una molécula, registrándose una señal diferente para cada átomo de hidrógeno con un entorno químico diferente. Las diferentes señales se muestran en un espectro con distinto desplazamiento, en partes por millón (ppm). La intensidad de las señales (tamaño: alto y ancho) es representativa de la cantidad de átomos de hidrógeno equivalentes.

La muestra NEO MD WT se corrió con una radiofrecuencia de 300 MHz. Previamente la muestra se preparó disolviendo 30 ± 10 mg de biodiesel en cloroformo deuterado (CDCl_3) y se colocó en un tubo especial para RMN. Para el análisis se empleó tetrametil silano como referencia interna (CH_4Si , $\delta = 0.00$ ppm).

7.3.3 Determinación de índice de yodo

Para la determinación del índice de yodo por el método Hanus, en un matraz erlenmeyer de 25 mL se pesaron los mg de la muestra a analizar y se resuspendieron en 1 mL de cloroformo. El matraz se envolvió en aluminio y se agregaron 1.5 mL del reactivo Hanus y se dejó reposar durante 1h con agitación magnética. Posteriormente se agregaron 1.5 mL de solución de yoduro de potasio KIO_3 (15% p/v) y 1 mL de agua desionizada fría (previamente hervida). Finalmente, se agregó con bureta una solución estandarizada de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), hasta que el color rojo de la disolución cambió a amarillo pálido. Una vez que ocurrió el cambio de coloración se agregaron dos gotas de solución indicadora de almidón lo que provocó el cambio a color azul intenso. Se continuó adicionando $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hasta que la disolución se volvió incolora. Se tomó registro

del volumen total de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastado y se realizaron los cálculos para determinar la concentración (ecuación 3).

Determinación de índice de yodo.

$$\text{Índice de yodo} = (A - B) (N) 12.69 / M \quad (3)$$

Donde:

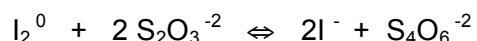
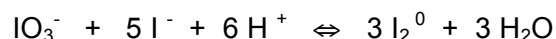
A: mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ empleados en la titulación del blanco.

B: mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ empleados en la titulación de la muestra.

M: gr de muestra.

N: Normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Para la estandarización de la disolución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ se secaron previamente 20 g de KIO_3 a 180°C durante 1h y se pesaron aproximadamente 0.15 g de KIO_3 por triplicado y se les agregaron 25 mL de agua destilada, 15 mL de KI (15% m/v) y 1 mL de HCl 6M. Con una bureta de 50 mL se adicionó la disolución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hasta que el color rojo de la disolución cambió a amarillo pálido. Una vez que ocurrió el cambio de coloración se agregaron dos gotas de solución indicadora de almidón lo que provocó el cambio a color azul intenso. Se continuó adicionando $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hasta que la disolución se volvió incolora. Se tomó registro del volumen total de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastado y se realizaron los cálculos para determinar la concentración. La concentración de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ se determinó empleando yodato de potasio (KIO_3) como patrón primario, y se calculó empleando la ecuación 4; considerando las siguientes reacciones:



Concentración de tiosulfato de sodio.

$$N_1V_1 = N_2V_2 \quad (4)$$

Donde:

N_1 = Normalidad de KIO_3 [equivalentes/Litro]

V_1 = Volumen de disolución de KIO_3 (mL)

N_2 = Normalidad de $Na_2S_2O_3$ [equivalentes/Litro]

V_2 = Volumen adicionado de $Na_2S_2O_3$ (mL)

También se realizó la valoración de un blanco para determinar la cantidad de yodo inicial, proveniente del reactivo Hanus. Para lo cual en un matraz se adicionaron 1.5 mL de reactivo Hanus, 1 mL de cloroformo y 1.5 mL de solución de KIO_3 (15% p/v) y 1 mL de agua desionizada hervida (fría), se realizó la titulación siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Debido a la cantidad de biomasa obtenida a partir de los cultivos de las diferentes líneas celulares los análisis de índice de yodo se realizaron por duplicado para la línea celular NEO LTP MM y NEO WT MM, mientras que para la línea NEO WT MD solamente se pudo realizar una sola determinación de este parámetro. Además se realizaron los análisis por duplicado de índice de yodo para la línea no transformada en medio marino cultivada medio F/2 (NEO WT MM F/2).

8. RESULTADOS

8.1 Cefotaxima para la axenización de cultivos de *N. oleoabundans*

Una vez que se obtuvieron líneas axénicas tanto en medio sólido como en medio líquido (Fig. 3) se tomaron muestras en tubos eppendorf de 2 mL de los cultivos en medio F/2 y NB dulceacuícola y marino y se observaron con microscopio óptico en objetivo 40X para verificar la ausencia de otros microorganismos (Fig. 4), comparando muestras de cultivos en medio F/2 dulceacuícola y marino los cuales no habían sido sometidos al tratamiento con cefotaxima (cfx). Los cultivos sin el tratamiento con el antibiótico (Fig. 3 a y d) presentaron una alta carga bacteriana, mientras que en los cultivos tratados con cefotaxima solamente se observó crecimiento microalgal (Fig. 3 b, c, e y f).

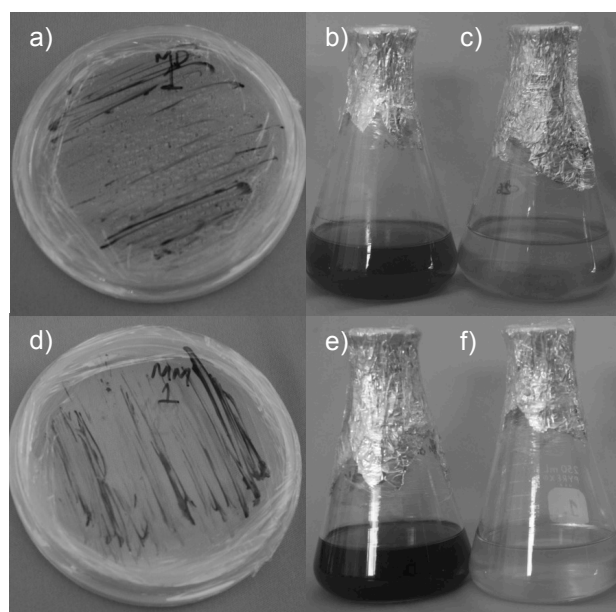


Figura 3. Cultivos axénicos de *N. oleoabundans* en medio sólido y líquido. a) cultivo en medio sólido NB MD. b) cultivo en medio líquido NB MD (100 mL). c) cultivo en medio líquido F/2 MD (100 mL). d) cultivo en medio sólido NB MM. e) cultivo en medio líquido NB MM (100 mL). f) cultivo en medio líquido F/2 MM (100 mL).

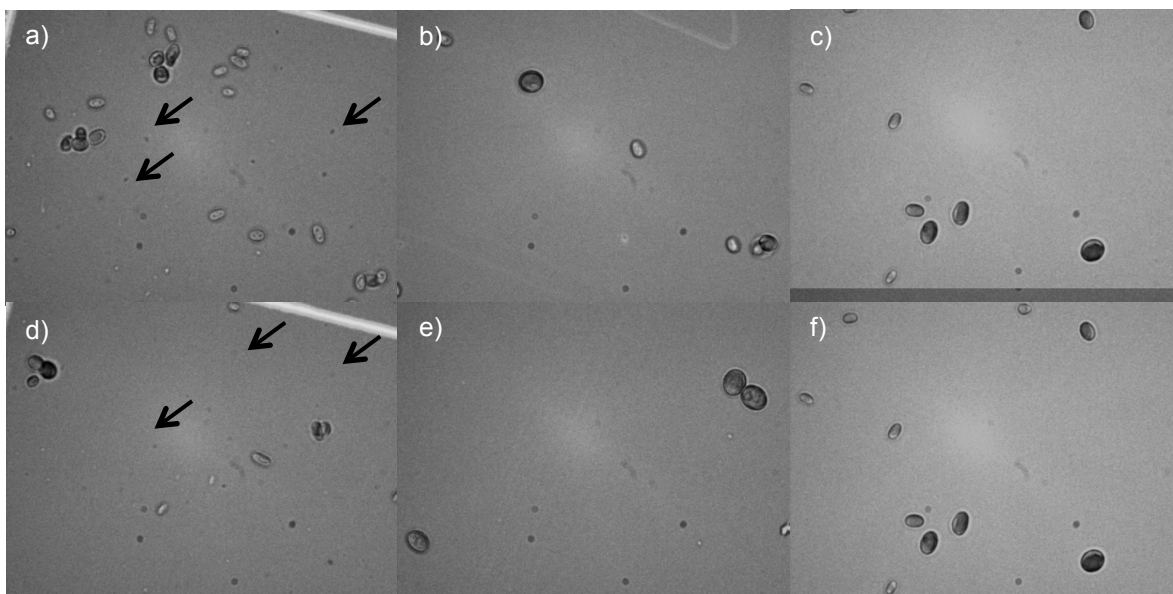


Figura 4. Axenización de cultivos de *N. oleoabundans* en medio F/2 y NB dulceacuícola (MD) y marino (MM). a) cultivo en medio F/2 MD sin cfx. b) cultivo en medio F/2 MD con cfx (250 mg L^{-1}). c) cultivo en medio NB MD con cfx (250 mg L^{-1}). d) cultivo en medio F/2 MM sin cfx. e) cultivo en medio F/2 MM con cfx (250 mg L^{-1}). f) cultivo en medio NB MM con cfx (250 mg L^{-1}). Las flechas indican la presencia de microorganismos no algales (bacterias).

8.2 Confirmación de las construcciones *A. tumefaciens* pMDC32:123LTP y pMDC32:124LTP

Las muestras de DNA plasmídico obtenidas a partir de los cultivos de *A. tumefaciens* fueron cuantificadas en NanoDrop obteniéndose valores entre 27 y $38.9 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (Tabla IX). En el gel de agarosa se pueden observar las bandas correspondientes a las cuatro muestras de *A. tumefaciens* analizadas (Fig. 5, carriles 6 a 9).

Tabla IX. Cuantificación por Nanodrop de las muestras de DNA obtenidas a partir de los cultivos *A. tumefaciens*.

Muestra	Concentración (ng μL^{-1})
<i>A. tumefaciens</i> pMDC32:123LTP A	31.4
<i>A. tumefaciens</i> pMDC32:123LTP B	27.0
<i>A. tumefaciens</i> pMDC32:124LTP A	33.6
<i>A. tumefaciens</i> pMDC32:124LTP B	38.9

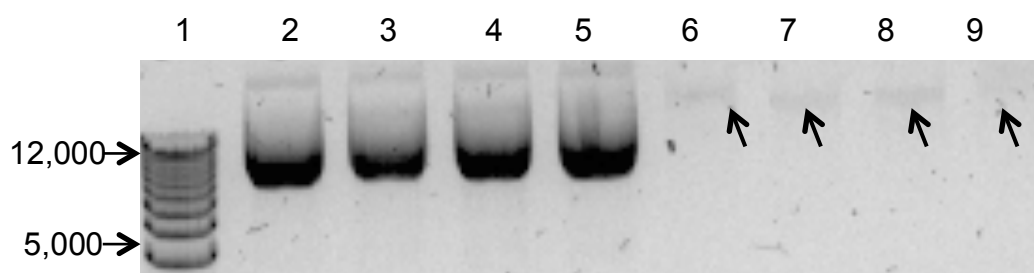


Figura 5. Gel de electroforesis para verificación de inserto en *Agrobacterium tumefaciens* pMDC32:123LTP y pMDC32:124LTP. 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder; 2: *E. coli* pMDC32:LTP A; 3: *E. coli* pMDC32:LTP B; 4: *E. coli* pMDC32:LTP C; 5: *E. coli* pMDC32:LTP D; 6: *A. tumefaciens* pMDC32:123LTP A; 7: *A. tumefaciens* pMDC32:123LTP B; 8: *A. tumefaciens* pMDC32:124LTP A; 9: *A. tumefaciens* pMDC32:124LTP B.

Para la confirmación de la inserción del gen LTP mediante PCR en las muestras de *A. tumefaciens* a emplear para la posterior transformación en *N. oleoabundans* se confirmó con la presencia de bandas en gel de agarosa obteniéndose amplificación para las muestras de *A. tumefaciens* pMDC32:123LTP A, pMDC32:123LTP A 5 ng μL^{-1} (Fig. 6, carriles 3 y 6, respectivamente), mientras que para las muestras de *A. tumefaciens* pMDC32:124LTP A y pMDC32:124LTP A 5 ng μL^{-1} (Fig. 6 carriles 4 y 7, respectivamente) no se observó amplificación para el gen LTP por lo que para los posteriores ensayos de transformación se decidió emplear la línea pMDC32:123LTP A. En cuanto a los controles, no se observó amplificación en el control negativo (agua) mientras que en el control positivo

empleando DNA de *C. sorokiniana* transformada con LTP se observó amplificación correspondiente al gen LTP (Fig. 6, carriles 8 y 9, respectivamente).

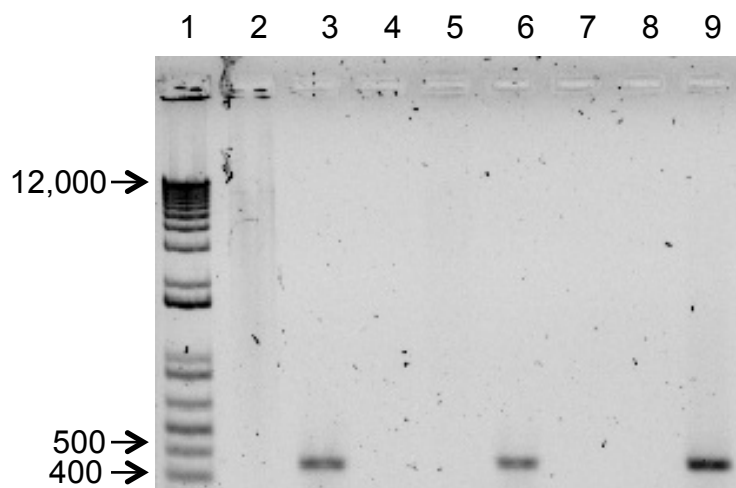


Figura 6. Gel de electroforesis de PCR con los oligonucleótidos específicos para el gen LTP. 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder; 2: *E. coli* pMDC32:LTP; 3: *A. tumefaciens* pMDC32:123LTP A; 4: *A. tumefaciens* pMDC32:124LTP A; 5: *E. coli* pMDC32:LTP A; 6: *A. tumefaciens* pMDC32:123LTP A ($5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$); 7: *A. tumefaciens* pMDC32:124LTP A ($5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$); 8: control negativo (agua); 9: Control positivo (*A. tumefaciens* pMDC32:123LTP)

8.3 Resistencia de *N. oleoabundans* al antibiótico higromicina

En el ensayo para la evaluación de la resistencia a higromicina a dos concentraciones diferentes (0 y 100 mg L^{-1}) e inoculados a una concentración celular de $1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ observamos lo siguiente: Las muestras en triplicado de *N. oleoabundans* disminuyeron el crecimiento microalgal (Fig. 7, a) pero no desaparecieron completamente. A diferencia de lo observado en las placas inoculadas con *C. sorokiniana* en donde no se observa crecimiento y es indicativo de una dosis letal (Fig. 7, b) indicando una posible resistencia al antibiótico por parte de la microalga *N. oleoabundans*. Los posteriores ensayos de transformación se realizaron empleando una concentración de higromicina de 100 mg L^{-1} .

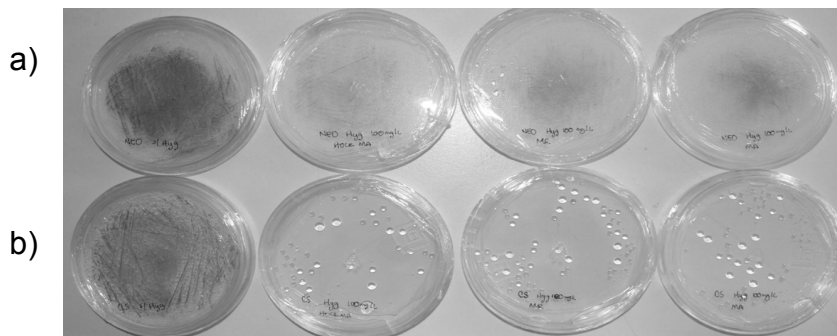


Figura 7. Ensayo de resistencia a higromicina para *N. oleoabundans*. a) Ensayo empleando higromicina en *N. oleoabundans*; b) Ensayo empleando higromicina en *C. sorokiniana*.

8.4 Transformación de *N. oleoabundans* mediada por *Agrobacterium*

De la transformación se obtuvieron un total de 12 concentrados de los filtros del co-cultivo, tres en medio dulce acuícola adicionado con MES (MD MES⁺ filtro 1, 2 y 3), tres en medio dulce acuícola sin MES (MD MES⁻ filtro 1, 2 y 3), tres en medio marino adicionado con MES (MM MES⁺ filtro 1, 2 y 3) y tres en medio marino sin MES (MM MES⁻ filtro 1, 2 y 3). A partir de estos 12 concentrados del co-cultivo se inocularon placas Petri en los medios correspondientes en medio NB con antibiótico y sin antibiótico, las cuales presentaron crecimiento abundante bacteriano en ausencia de antibióticos (Fig. 8, derecha), y abundante crecimiento microalgal en presencia de los antibióticos (Fig. 8, izquierda), la densidad celular de las colonias fue muy alta por lo que impidió realizar conteo de colonias. No se observó diferencia en la concentración celular en las placas adicionadas con MES y sin MES.

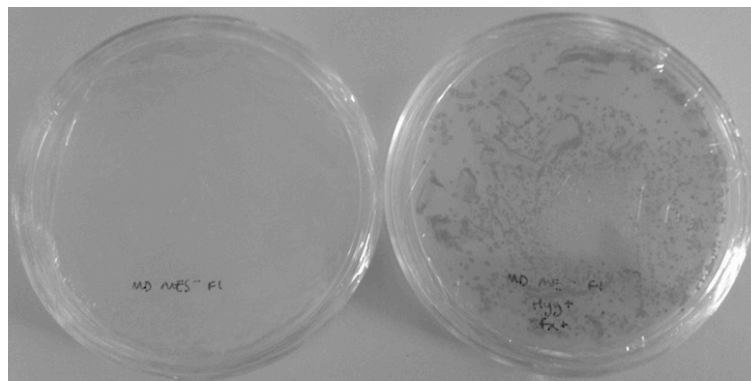


Figura 8. Placas inoculadas con el concentrado recuperado de los filtros del co-cultivo. Derecha: placa Petri en medio NB dulceacuícola sin antibiótico inoculada con el concentrado del filtro 1 MD MES⁻ donde se observa abundante crecimiento bacteriano. Izquierda: placa Petri en medio NB dulceacuícola con cefotaxima (150 mg L⁻¹) e higromicina (100 mg L⁻¹) inoculada con el concentrado del filtro 1 MD MES⁺ se observa abundante crecimiento microalgal.

A partir de los cultivos inoculados con el concentrado del filtro 1 en medio NB con antibióticos se seleccionaron 20 colonias por medio de cultivo (10 de medio dulce acuícola MES⁺ filtro 1, 10 de medio dulce acuícola MES⁻ filtro 1, 10 de medio marino MES⁺ filtro 1 y 10 de medio marino MES⁻ filtro 1) estas fueron aisladas en placas Petri cuadriculadas y numeradas en los medios correspondientes. Una vez que hubo crecimiento cada colonia aislada fue resemebrada en una placa Petri individual en su medio correspondiente. Se observó crecimiento tanto en las placas Petri cuadriculadas como en las placas individuales para cada uno de los medios. A partir de las 20 colonias aisladas de cada medio de cultivo que sirvieron como inóculo para los cultivos en 3 mL de medio NB se observó crecimiento en todas las colonias aislada en medio marino, excepto la colonia número 5 (Fig. 9), mientras que en las colonias aisladas provenientes de medio dulceacuícola no se observó crecimiento microalgal por lo que los ensayos posteriores de confirmación de inserción no pudieron ser realizados.

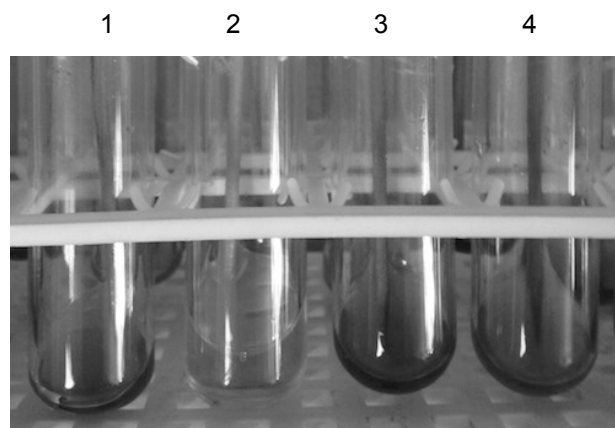


Figura 9. Colonias aisladas en 3 mL de medio líquido NB. 1: colonia aislada número 4 en medio marino. 2: colonia aislada número 5 en medio medino (ausencia de crecimiento); 3: colonia aislada número 6; 4: colonia aislada número 7.

8.5 Confirmación de la inserción del gen LTP en *N. oleoabundans*

Se realizó extracción de DNA de las muestras de 3 mL en medio marino para un total de 19 muestras, 9 en medio marino sin MES (MM MES⁻) y 10 en medio marino adicionado con MES (MM MES⁺). La cuantificación por NanoDrop se observa en la tabla X, obteniéndose valores entre 59.9 y 152.1 ng μL^{-1} .

Tabla X. Cuantificación por Nanodrop del DNA obtenido a partir de las colonias aisladas.

Muestra	Concentración (ng μL^{-1})	Muestra	Concentración (ng μL^{-1})
MM MES ⁻ 1	59.9	MM MES ⁺ 1	95.9
MM MES ⁻ 2	83.1	MM MES ⁺ 2	76.9
MM MES ⁻ 3	94.2	MM MES ⁺ 3	129.3
MM MES ⁻ 4	125.3	MM MES ⁺ 4	93.6
MM MES ⁻ 6	101.6	MM MES ⁺ 5	116.6
MM MES ⁻ 7	115.3	MM MES ⁺ 6	130.6
MM MES ⁻ 8	100.8	MM MES ⁺ 7	122.2
MM MES ⁻ 9	152.1	MM MES ⁺ 8	114.6
MM MES ⁻ 10	102.4	MM MES ⁺ 9	89.1
		MM MES ⁺ 10	111.5

Para determinar la inserción del gen LTP en *N. oleoabundans* se realizaron tres ensayos de PCR con diferentes oligonucleótidos: 1) oligonucleótidos universales para identificar especies eucariotas, 2) oligonucleótidos para detectar la cepa de *A. tumefaciens* GV2260 empleada en la transformación y 3) oligonucleótidos específicos para la secuencia del gen LTP.

En el ensayo de PCR realizado empleando los oligonucleótidos universales para eucariotas UnivF-1131 y UnivR-1629 (Troedsson *et al.*, 2008) los cuales amplifican una secuencia de 498 pb (Tabla III), se observó amplificación para todas las muestras analizadas al detectarse una banda cercana a los 500 pb (Fig. 10 A). Para el ensayo empleando oligonucleótidos específicos para el gen LTP, los cuales amplifican una secuencia de 364 pb (Tabla III), se observó amplificación para todas las muestras analizadas (Fig. 10 B). Para el ensayo de PCR realizado empleando los oligonucleótidos específicos para detectar la cepa GV2260 de *Agrobacterium* C58GlyA-F/R (Deeba *et al.*, 2014) los cuales amplifican una secuencia de 423 pb (Tabla III), se observa en el gel de electroforesis realizado amplificación para las muestras analizadas excepto la muestra de medio marino MES⁺ 8 (Fig. 10 C, carril 9). Se seleccionó la transformante del carril 9 para los siguientes experimentos por ser la clona que contiene el gen de LTP sin contaminación con *Agrobacterium*.

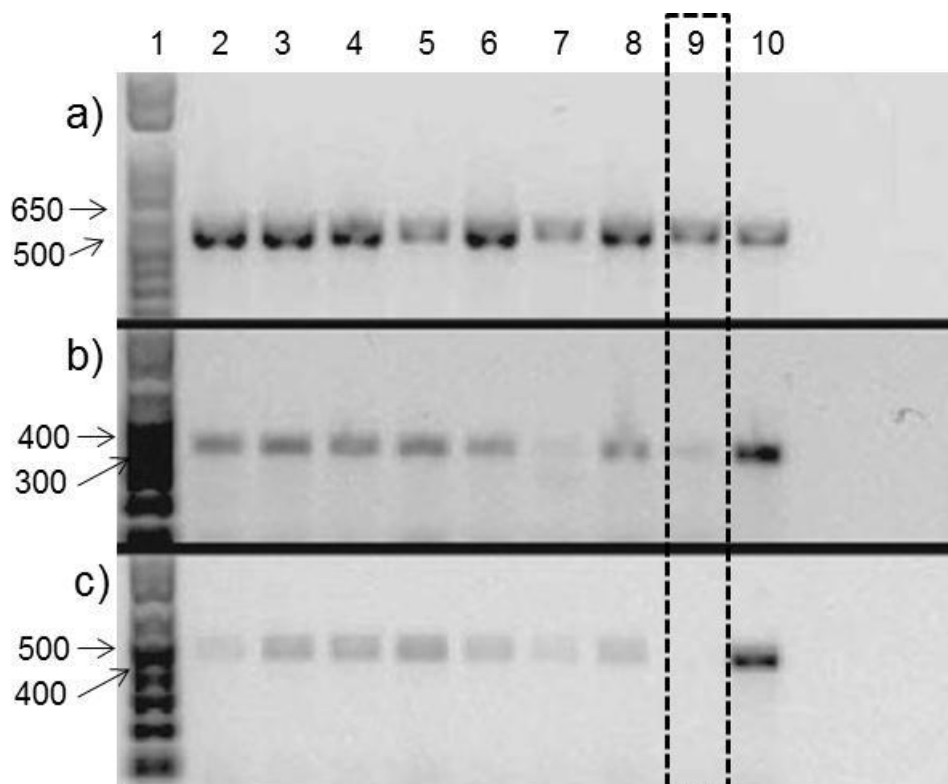


Figura 10. Geles de electroforesis para la identificación de transformación de *N. oleoabundans*. a) amplificación con primers universales, carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder; carril 2-10: muestras de DNA de *N. oleoabundans* MM MES⁺ 1 a 9. b) amplificación con primers para LTP, carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder; carril 2-10: muestras de DNA de *N. oleoabundans* MM MES⁺ 1 a 9. c) amplificación con primers para *Agrobacterium*, carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder; carril 2-10: muestras de DNA de *N. oleoabundans* MM MES⁺ 1 a 9.

8.6 Curva de crecimiento

A partir del recuento celular, se graficaron y se obtuvieron las curvas de crecimiento para cada tipo de cultivo (silvestre y transformada). Para los cultivos de la línea silvestre en medio dulce acuícola (NEO WT MD) se observó un aumento en el número de células entre los días 2 y 3 de cultivo, que continua hasta llegar a un máximo al día 4 de aproximadamente 1.8×10^6 cel mL⁻¹, a partir de este día comienza a bajar el número de células, tendencia que se observó

hasta el día 6 (Fig. 11). Con los datos del número de células con respecto al tiempo se calculó la tasa de crecimiento (μ) de 0.30 d^{-1} y se consideró el día 4 como el tiempo idóneo para cosechar la biomasa total de los cultivos.

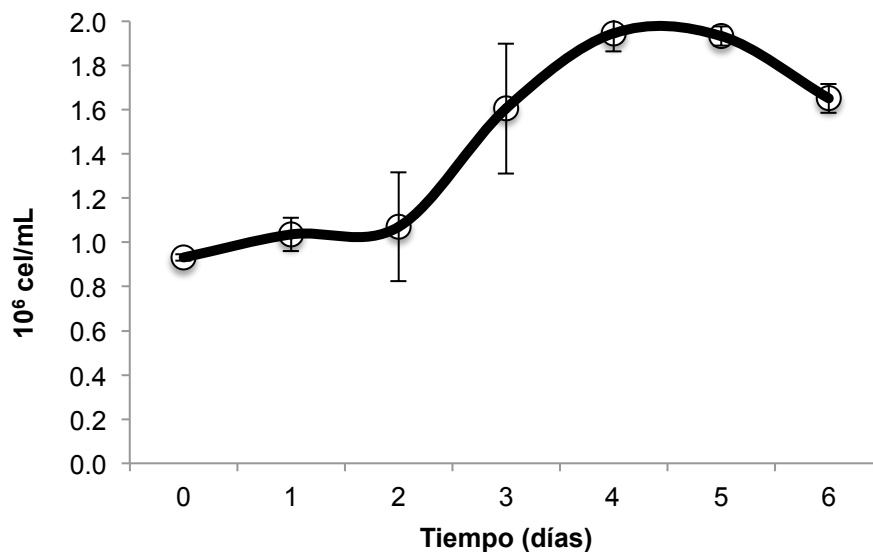


Figura 11. Curva de crecimiento para *N. oleoabundans* línea silvestre en medio dulceacuícola. Cada punto representa el valor promedio de réplicas independientes, las barras de dispersión indican desviación estándar.

En la curva de crecimiento para la línea silvestre en medio marino (NEO WT MM) (Fig. 12) se observa un aumento en el número de células entre los días 2 y 3 de cultivo, que continua hasta llegar a un máximo al día 5 ($1.7 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$), a partir de este día se observó una disminución en el número de células. Con los datos del número de células con respecto al tiempo, se calculó la tasa de crecimiento de 0.26 d^{-1} , y se consideró el día 4 como el tiempo idóneo para cosechar la biomasa total de los cultivos.

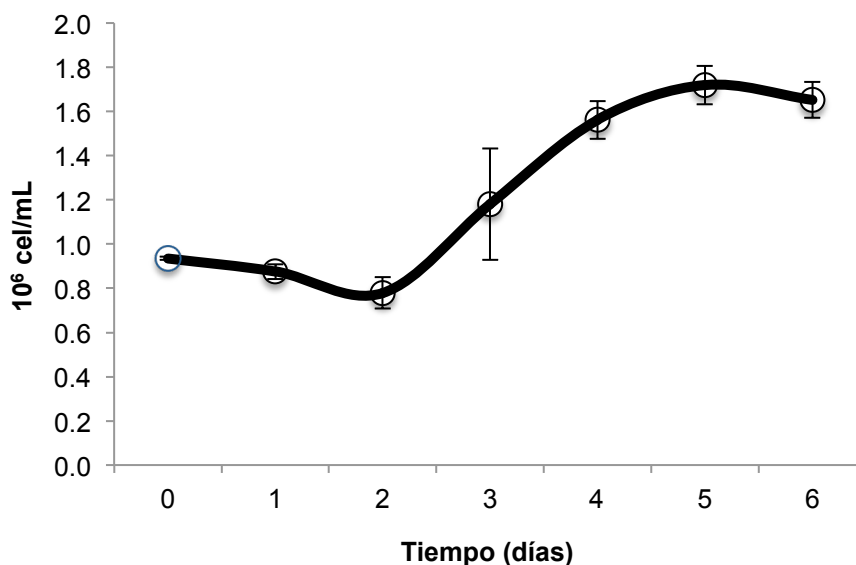


Figura 12. Curva de crecimiento para la línea silvestre de *N. oleoabundans* en medio marino. Cada punto representa el valor promedio de réplicas independientes, las barras de dispersión indican desviación estándar.

En los cultivos de la línea transformada con el gen LTP en medio marino (NEO LTP MM), la curva de crecimiento presentó un aumento de la concentración celular entre los días 3 y 4 de cultivo, seguido por un descenso en el día 5 para volver a aumentar hasta el día 6 con un máximo de 1.2×10^6 cel mL⁻¹ (Fig. 13). A partir de este día se observó una disminución en el número de células con respecto al tiempo. Con los datos del número de células con respecto al tiempo se calculó la tasa de crecimiento de 0.07 d^{-1} y se consideró el día 6 como el idóneo para cosechar la biomasa total de los cultivos.

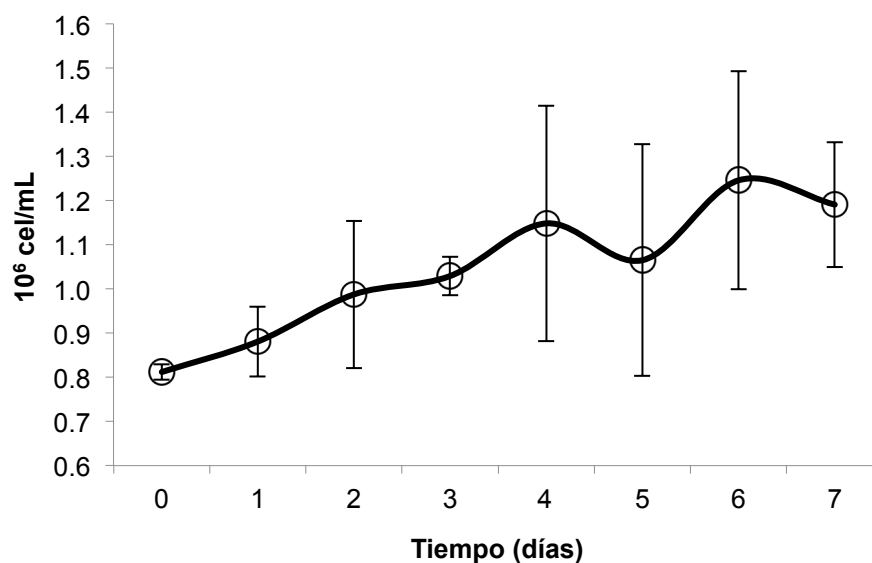


Figura 13. Curva de crecimiento para *N. oleoabundans* transformada con el gen LTP en medio marino. Cada punto representa el valor promedio de réplicas independientes, las barras de dispersión indican desviación estándar.

8.7 Extracción y determinación de lípidos totales

Para la línea transformada en medio marino (NEO LTP MM) se obtuvo un valor de lípidos totales de 36.5% del peso seco, observándose un aumento significativo ($p < 0.001$) respecto a las líneas silvestres tanto en medio marino (NEO WT MM) como dulceacuícola (NEO WT MD) para las cuales se obtuvieron 16.4% y 10.5% respectivamente (Fig. 14).

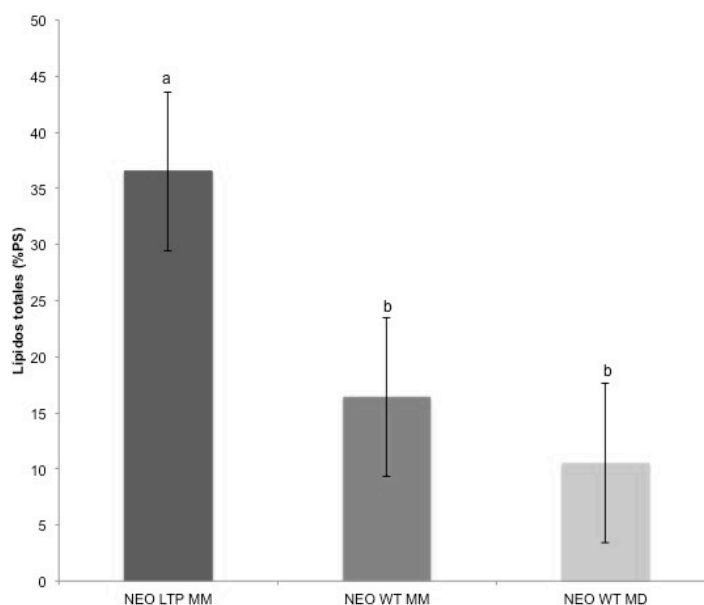


Figura 14. Contenido de lípidos totales en *N. oleoabundans* transformada con el gen LTP en medio marino, silvestre en medio marino y silvestre en medio dulce acuícola. Los valores están expresados en porcentaje con respecto al peso seco (%). NEO LTP MM: *N. oleoabundans* en medio marino transformada con el gen LTP. NEO WT MM: *N. oleoabundans* en medio marino silvestre. NEO WT MD: *N. oleoabundans* en medio dulceacuícola silvestre. Las barras representan intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.8 Extracción y cuantificación de ácidos grasos

Para los ácidos grasos saturados se obtuvieron porcentajes de 31.3, 28.9 y 31.1 del peso seco para la línea transformada con el gen LTP (NEO LTP MM), silvestre en medio marino (NEO WT MM) y silvestre en medio dulceacuícola (NEO WT MD), respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre las tres condiciones de cultivo (Fig. 18). En particular, el ácido palmítico (C16:0) presentó la mayor abundancia en los tres tipos de cultivo con porcentajes de 26.5, 25.4 y 28.3 del peso seco para NEO LTP MM, NEO WT MM y NEO WT MD, respectivamente, observándose diferencias significativas ($p = 0.049$) entre las líneas silvestres en medio marino y dulceacuícola, sin embargo, no se observó

diferencia significativa respecto a la línea transformada. También se identificaron en las tres condiciones de cultivo, pero en menor porcentaje el ácido tetradecanoico (C14:0) y octadecanoico (C18:0) (Tabla X).

Para los ácidos grasos monoinsaturados se observaron % significativamente mayores ($p < 0.001$) en los cultivos de la línea transformada con respecto a las líneas silvestres, con porcentajes de 30.3, 22.3 y 13.3 del peso seco, para los cultivos NEO LTP MM, NEO WT MM y NEO WT MD, respectivamente (Fig. 15). Particularmente el ácido *cis*-9-octadecenoico (C18:1 ω 9) fue el que se encontró en mayor proporción en los cultivos de la línea transformada (29.1% peso seco), mientras que para los cultivos de las líneas silvestres (MM y MD) se obtuvieron 7.7 y 9.0% peso seco, respectivamente. Otros ácidos grasos identificados pero que se encontraron en las tres líneas de cultivo pero en menor % fueron el ácido 7-hexadecanoico (C16:1 ω 9, C16:1 ω 7, C16:1 ω 5) y 11-octadecenoico (C18:1 ω 7) (Tabla X).

En el caso de los ácidos grasos biinsaturados se observó un aumento significativo ($p = 0.010$) en la línea transformada con respecto a la línea silvestre MM. Para NEO LTP MM y NEO WT MM se obtuvieron 28.4 y 21.9% del peso seco, respectivamente. Se obtuvo un aumento en el porcentaje de ácidos grasos biinsaturados en los cultivos de la línea silvestre MD (33.7% peso seco) sin embargo, no se encontraron diferencias significativas respecto a la línea transformada (Fig. 15). En el caso del ácido 9,12-octadecadienoico (18:2 ω 6) se encontraron valores altos en las tres líneas de cultivo, observando mayor porcentaje en la línea silvestre MD (32.2% peso seco) con respecto a la línea transformada (30% peso seco), y en la silvestre en medio marino (20.9% peso seco). También se encontró en menor % en las tres líneas de cultivo el ácido 9,12-hexadecadienoico (16:2 ω 6) (Tabla XI).

Para el caso de los ácidos grasos poliinsaturados se observó una disminución altamente significativa ($p < 0.001$) en los cultivos de la línea

transformada NEO LTP MM (9.8% peso seco) con respecto a los cultivos silvestres en NEO WT MM (26.2% peso seco) y NEO WT MD (21.4% peso seco) (Fig. 15). Los dos ácidos grasos 8,11,14-hexadecatrienoico (C16:3 ω 3) y 9,12,15-octadecatrienoico (C18:3 ω 3) presentaron una disminución significativa en los cultivos de la línea transformada respecto a los cultivos de la línea silvestre. En el caso del C16:3 ω 3 se obtuvo 0.9, 5.1 y 3.2% del peso seco para NEO LTP MM, NEO WT MM y NEO WT MD, respectivamente; mientras que para el C18:3 ω 3 fue de 8.1, 21.2 y 18.3% de peso seco, para NEO LTP MM, NEO WT MM y NEO WT MD, respectivamente (Tabla XI).

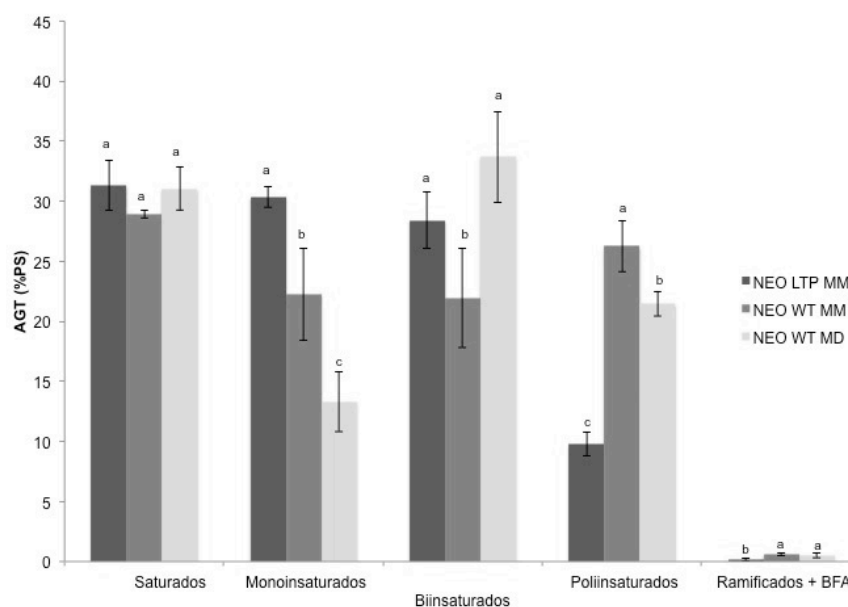


Figura 15. Grupos de ácidos grasos en *N. oleoabundans* transformada con el gen LTP en MM, silvestre en MM y MD. Los valores están expresados en porcentaje con respecto al peso seco. NEO LTP MM: *N. oleoabundans* en medio marino transformada con el gen LTP. NEO WT MM: *N. oleoabundans* en medio marino silvestre. NEO WT MD: *N. oleoabundans* en medio dulceacuícola silvestre. Las barras representan intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

Tabla XI. Perfil de ácidos grasos de *N. oleoabundans* transformada con el gen LTP, silvestre MM y MD.

AG	NEO LTP MM	NEO WT MM	NEO WT MD	F (2,6)	P
14:0	1.0±1.1 ^{ab}	1.9±0.6 ^a	1.2±0.3 ^b	4.5	0.065
16:0	26.5±3.7 ^{ab}	25.4±0.4 ^b	28.3±2.8 ^a	5.2	0.049
18:0	2.4±0.5 ^a	1.6±1.1 ^b	1.6±1.2 ^b	4.7	0.059
∑AGS	31.3±4.6 ^a	28.9±0.7 ^a	31.1±3.9 ^a	2.5	0.159
16:1ω9	0.2±0.3 ^b	0.4±0.2 ^a	0.3±0.1 ^{ab}	4.03	0.078
16:1ω7	0.1±2.6 ^b	2.9±0.9 ^a	0.8±0.4 ^b	10.5	0.011
16:1ω5	0.1±0.2 ^b	1.0±0.2 ^a	1.0±0.4 ^a	43.3	<0.001
18:1ω9	29.1±6.7 ^a	7.7±4.1 ^b	9.0±3.1 ^b	92.33	<0.001
18:1ω7	1.5±1.9 ^b	10.3±6.2 ^a	2.2±1.4 ^b	28.7	0.001
∑AGM	30.3±1.8 ^a	22.3±8.4 ^b	13.3±5.5 ^c	38.7	<0.001
16:2ω6	0.03±0.1 ^c	1.0±0.2 ^b	1.5±0.8 ^a	48.1	<0.001
18:2ω6	30.0±5.2 ^a	20.9±8.8 ^b	32.2±7.6 ^a	11.1	0.010
∑AGB	28.4±5.2 ^a	21.9±9.0 ^b	33.7±8.4 ^a	10.8	0.010
16:3ω3	0.9±1.1 ^c	5.1±0.1 ^a	3.2±0.9 ^b	92.1	<0.001
18:3ω3	8.1±1.1 ^c	21.2±4.5 ^a	18.3±1.9 ^b	98.2	<0.001
∑AGP	9.8±2.2 ^c	26.2±4.6 ^a	21.4±2.2 ^b	128.1	<0.001
i14:0	ND	0.3±0.3 ^a	0.2±0.3 ^a	10.2	0.012
15:0	0.04±0.2 ^a	0.2±0.1 ^a	0.1±0.1 ^a	0.9	0.454
17:0	0.1±0.1 ^b	0.1±0.02 ^a	0.1±0.1 ^{ab}	4.5	0.065
∑AGb	0.2±0.3 ^b	0.6±0.3 ^a	0.5±0.4 ^a	9.0	0.016
AG (µg/mg)	107.5±125.7 ^a	34.2±16.8 ^b	20.7±3.9 ^b	7.5	0.023
AG %PS	10.7±12.7 ^a	3.4±1.7 ^b	2.1±0.4 ^b	7.5	0.023

Notas: Los valores son el promedio de réplicas independientes. ∑AGS ácidos grasos saturados. ∑AGM ácidos grasos monoinsaturados. ∑AGB ácidos grasos biinsaturados. ∑AGP ácidos grasos poliinsaturados. ∑AGb ácidos grasos asociados a bacterias. AG ácidos grasos ± intervalo de confianza. Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). ND no detectado.

8.9 Determinación de ácidos grasos en fracciones lipídicas

Dado que la transformación de *N. oleoabundans* con el gen LTP favoreció la disminución de los ácidos grasos poliinsaturados, se procedió a la separación de las diferentes fracciones lipídicas con el fin de sugerir a que nivel de la célula pudiera estar involucrado el gen insertado. De esta manera se cuantificó el perfil de ácidos grasos en las fracciones NL (Lípidos neutros, de reserva), AMPL (Galactolípidos o lípidos polares afines a la acetona, membrana tilacoidal) y PL

(Lípidos polares o fosfolípidos, membrana celular) para cada una de las condiciones de cultivo.

Fracción NL: se observó una disminución significativa ($p = 0.009$) para los ácidos grasos saturados en la línea transformada y silvestre MM respecto a los cultivos de la línea silvestre MD, obteniéndose valores de 27.7, 34.5 y 48.0 % del peso seco para NEO LTP MM, NEO WT MM y NEO WT MD, respectivamente (Fig. 16). Se encontró en mayor porcentaje para las tres líneas de cultivo el ácido palmítico (C16:0 entre 23.0% y 35.6% para la línea transformada y silvestre MD, respectivamente (Tabla XII).

En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados se observó un aumento significativo ($p = 0.001$) para NEO LTP MM con 33.1% del peso seco en comparación con las líneas silvestres MM (23.4% peso seco) y MD (20.7% peso seco) (Fig. 16). Particularmente el aumento se observó en el ácido *cis*-9-octadecenoico con 30.6% para NEO LTP MM, 17.8% para NEO WT MM y 18.6% para NEO WT MD (Tabla XII)

En los ácidos grasos biinsaturados no se observaron diferencias significativas entre los cultivos de la línea transformada y la línea silvestre MM y en MD (Fig. 16).

En cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados se observó una disminución significativa ($p = 0.005$) entre la línea NEO LTP MM y NEO WT MD con 6.5% y 3.0% del peso seco, respectivamente. Con NEO WT MM no se encontró diferencia significativa con respecto a NEO LTP MM (Fig. 16). El ácido 9,12,15-octadecatrienoico (C18:3 ω 3) con 6.1%, 5.6% y 2.9% del peso seco para NEO LTP MM, NEO WT MM y NEO WT MD, respectivamente (Tabla XII).

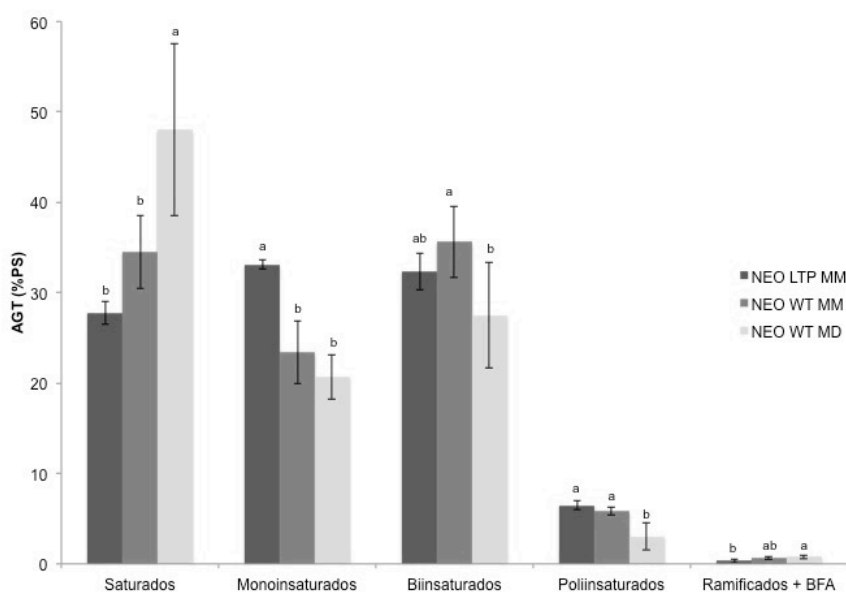


Figura 16. Grupos de ácidos grasos de la fracción NL de *N. oleoabundans* transformada con el gen LTP en MM, silvestre MM y MD. Los valores están expresados en porcentaje con respecto al peso seco. NEO LTP MM: *N. oleoabundans* en medio marino transformada con el gen LTP. NEO WT MM: *N. oleoabundans* en medio marino silvestre. NEO WT MD: *N. oleoabundans* en medio dulceacuícola silvestre. Las barras representan intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

Fracción AMPL: se obtuvo un aumento (34% peso seco) significativo ($p = 0.001$) en la línea NEO LTP MM en los ácidos grasos saturados con respecto a las líneas silvestres NEO WT MM y NEO WT MD con 23.4% y 23.5% del peso seco, respectivamente (Fig. 17). El aumento de AMPL se debió al incremento del ácido palmítico (C16:0) en la línea transformada (27.9% peso seco) con respecto a la línea silvestre MM (19.7% peso seco) y MD (19.4% peso seco) (Tabla XIII).

En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados se observó una disminución significativa (< 0.001) en el porcentaje en la línea NEO LTP MM respecto a la línea NEO WT MM, con 6.3% y 12.0%, respectivamente. No se encontró diferencia significativa entre la línea transformada y la línea silvestre MD para la cual se obtuvo 5.0% del peso seco (Fig. 17).

Tabla XII. Perfil de ácidos grasos de la fracción NL de *N. oleoabundans* transformada con el gen LTP, línea silvestre MM y MD.

AG	NEO LTP MM	NEO WT MM	NEO WT MD	F (2,6)	P
14:0	1.3±1.0 ^b	3.8±0.3 ^a	1.3±1.3 ^b	12.6	0.007
16:0	23.0±2.3 ^b	25.3±4.4 ^b	35.6±5.2 ^a	16.2	0.004
18:0	3.4±0.6 ^b	5.4±4.7 ^b	11.1±3.5 ^a	10.6	0.011
∑AGS	27.7±2.7 ^b	34.5±8.9 ^b	48.0±9.5 ^a	11.3	0.009
16:1ω9	0.2±0.3 ^a	0.2±0.4 ^a	0.3±0.1 ^a	1.4	0.308
16:1ω7	0.8±3.0 ^a	1.2±1.8 ^a	0.8±0.4 ^a	0.2	0.836
16:1ω5	0.1±0.02 ^b	0.1±0.1 ^{ab}	0.2±0.1 ^a	3.9	0.082
18:1ω9	30.6±4.3 ^a	17.8±7.1 ^b	18.6±1.8 ^b	34.0	0.001
18:1ω7	1.4±1.7 ^b	4.2±3.9 ^a	0.8±0.5 ^b	9.4	0.014
∑AGM	33.1±1.1 ^a	23.4±7.7 ^b	20.7±2.4 ^b	27.0	0.001
16:2ω6	0.1±0.1 ^b	0.1±0.1 ^a	0.1±0.02 ^a	6.1	0.035
18:2ω6	32.3±4.4 ^{ab}	35.5±8.7 ^a	27.4±5.8 ^b	3.6	0.095
∑AGB	32.3±4.4 ^{ab}	35.6±8.6 ^a	27.5±5.9 ^b	3.6	0.095
16:3ω3	0.3±0.2 ^a	0.2±0.3 ^{ab}	0.1±0.1 ^b	4.3	0.069
18:3ω3	6.1±1.0 ^a	5.6±0.6 ^a	2.9±1.4 ^b	15.5	0.004
∑AGP	6.5±1.1 ^a	5.8±1.0 ^a	3.0±1.5 ^b	15.0	0.005
15:0	0.2±0.3 ^b	0.3±0.2 ^{ab}	0.4±0.2 ^a	3.6	0.095
17:0	0.1±0.2 ^b	0.3±0.2 ^a	0.4±0.1 ^a	7.6	0.023
∑AGb	0.3±0.5 ^b	0.6±0.3 ^{ab}	0.8±0.2 ^a	5.7	0.041
AG (μg/mg)	1.5±2.7 ^a	0.3±0.2 ^{ab}	0.1±0.1 ^b	4.4	0.067
AG %PS	0.2±0.3 ^a	0.03±0.02 ^{ab}	0.1±0.01 ^b	4.4	0.067

Notas: Los valores son el promedio de réplicas independientes. ∑AGS ácidos grasos saturados. ∑AGM ácidos grasos monoinsaturados. ∑AGB ácidos grasos biinsaturados. ∑AGP ácidos grasos poliinsaturados. ∑AGb ácidos grasos asociados a bacterias. AG ácidos grasos ± intervalo de confianza. Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

También para los ácidos grasos biinsaturados se observó una disminución significativa ($p = 0.001$) en la línea transformada con respecto a la línea silvestre, obteniéndose 6.0%, 13.3% y 23.2% para NEO LTP MM, NEO WT MM y NEO WT MD, respectivamente (Fig. 17). Se obtuvo un mayor % del ácido 9,12-octadecadienoico (C18:2ω6) para los cultivos NEO LTP MM (5%), NEO WT MM (10.4%) y NEO WT MD (17%), con respecto al peso seco (Tabla XIII).

Los ácidos grasos poliinsaturados tanto en la línea transformada como silvestre (MM y MD) presentaron un porcentaje elevado: 53.4, 51.0 y 48.0 respectivamente (Fig. 17). El ácido 9,12,15-octadecatrienoico (C18:3ω3) se

encontró en mayor porcentaje en las tres líneas: NEO LTP MM (36.9%), NEO WT MM (37.3%) y NEO WT MD (34.9%) con respecto al peso seco (Tabla XIII).

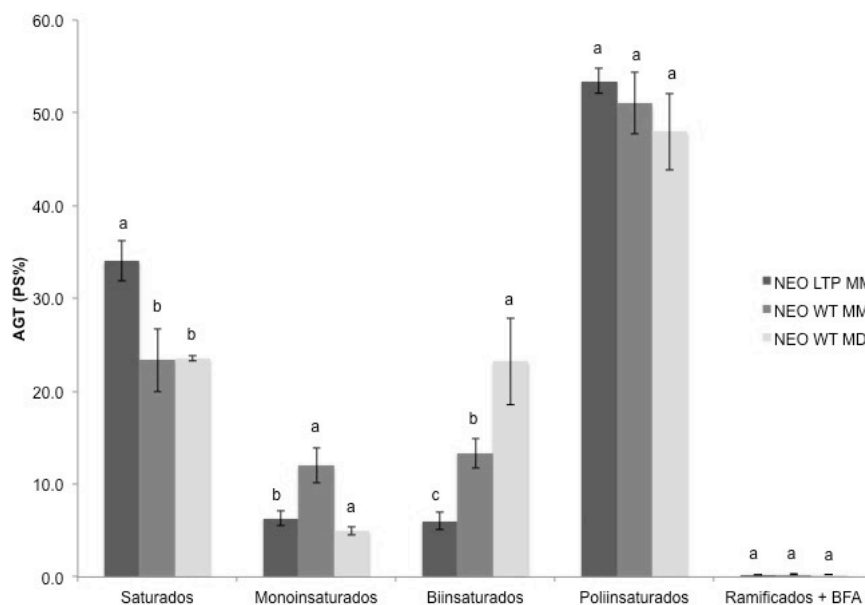


Figura 17. Grupos de ácidos grasos para la fracción AMPL de *N. oleoabundans* transformada con el gen LTP en MM, silvestre MM y MD. Los valores están expresados en porcentaje con respecto al peso seco. NEO LTP MM: *N. oleoabundans* en medio marino transformada con el gen LTP. NEO WT MM: *N. oleoabundans* en medio marino silvestre. NEO WT MD: *N. oleoabundans* en medio dulceacuícola silvestre. Las barras representan intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

Fracción PL: se observó un aumento en la proporción de ácidos grasos saturados en comparación con los otros grupos, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las tres líneas. Los porcentajes obtenidos fueron: 62.0, 50.3 y 57.0 para las líneas NEO LTP MM, NEO WT MM y NEO WT MD, respectivamente (Fig. 18). El ácido palmítico (C16:0) se encontró con porcentajes de 34.7, 26.3 y 31.9 para NEO LTP MM, NEO WT MM y NEO WT MD, respectivamente. El ácido octadecanoico (C18:0) presentó porcentajes de 23.0, 22.7 y 22.8 para NEO LTP MM, NEO WT MM y NEO WT MD, respectivamente (Tabla XIV).

Tabla XIII. Perfil de ácidos grasos para la fracción AMPL de *N. oleoabundans* transformada con el gen LTP, silvestre MM y MD.

AG	NEO LTP MM	NEO WT MM	NEO WT MD	F (2,6)	P
14:0	3.8±0.7 ^a	1.9±1.2 ^b	2.1±1.0 ^b	21.1	0.002
18:0	2.3±0.5 ^a	1.7±1.2 ^a	2.1±0.3 ^a	2.8	0.140
16:0	27.9±5.0 ^a	19.7±5.1 ^b	19.4±0.9 ^b	4.7	0.001
∑AGS	34.0±4.8 ^a	23.4±7.5 ^b	23.5±0.6 ^b	26.0	0.001
16:1ω9	0.5±0.9 ^b	1.4±1.1 ^a	0.8±0.4 ^{ab}	5.1	0.052
16:1ω7	0.2±0.2 ^b	1.2±0.9 ^a	0.2±0.1 ^b	19.1	0.003
16:1ω5	ND	0.1±0.03 ^a	0.1±0.03 ^a	51.4	<0.001
18:1ω9	4.3±1.9 ^a	4.9±2.4 ^a	2.5±0.1 ^b	8.7	0.017
18:1ω7	1.3±0.8 ^b	4.5±2.3 ^a	1.4±1.2 ^b	25.4	0.001
∑AGM	6.3±1.7 ^b	12.0±4.1 ^a	5.0±1.0 ^b	37.1	<0.001
16:2ω6	1.0±0.4 ^c	2.9±0.5 ^b	6.2±3.3 ^a	34.3	0.001
18:2ω6	5.0±1.7 ^c	10.4±3.1 ^b	17.0±7.3 ^a	30.9	0.001
∑AGB	6.0±2.1 ^c	13.3±3.5 ^b	23.2±0.6 ^a	34.2	0.001
16:3ω3	16.5±1.2 ^a	13.7±1.5 ^b	13.1±5.4 ^b	5.6	0.042
18:3ω3	36.9±1.9 ^a	37.3±8.5 ^a	34.9±4.4 ^a	0.98	0.428
∑AGP	53.4±2.9 ^a	51.0±7.3 ^a	48.0±9.1 ^a	2.9	0.134
15:0	0.2±0.05 ^a	0.2±0.05 ^a	0.2±0.03 ^a	2.1	0.199
17:0	0.09±0.02 ^a	0.1±0.02 ^a	0.1±0.02 ^a	2.0	0.217
∑AGb	0.2±0.03 ^a	0.3±0.1 ^a	0.3±0.01 ^a	3.0	0.127
AGT (µg/mg)	7.4±5.6 ^a	10.0±3.6 ^a	7.2±7.5 ^a	1.4	0.320
AGT %PS	0.7±0.6 ^a	1.0±0.4 ^a	0.7±0.8 ^a	1.4	0.320

Notas: Los valores son el promedio de réplicas independientes. ∑AGS ácidos grasos saturados. ∑AGM ácidos grasos monoinsaturados. ∑AGB ácidos grasos biinsaturados. ∑AGP ácidos grasos poliinsaturados. ∑AGb ácidos grasos asociados a bacterias. AG ácidos grasos ± intervalo de confianza. Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas $\alpha < 0.05$ (F de Fisher). ND no detectado

Para los ácidos grasos monoinsaturados se observó una disminución significativa ($p = 0.009$) en la línea transformada con respecto a la línea silvestre MM con 18.0 y 34.0% del peso seco para NEO LTP MM y NEO WT MM, respectivamente (Fig. 18), sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre la línea transformada con respecto a la línea silvestre MD en la que se obtuvo 16.5% respecto al peso seco.

Para los ácidos grasos biinsaturados se observó una disminución significativa ($p = 0.015$) en la línea transformada y la línea silvestre MM con respecto a la línea silvestre MD: 10.4%, 8.1% y 18.5% del peso seco para la línea NEO LTP MM, NEO WT MM y NEO WT MD, respectivamente (Fig. 18).

Particularmente se observó un aumento en el ácido 9,12-octadecadienoico (C18:2 ω 6) en la línea silvestre MD (17.6% peso seco) (Tabla XIV).

En el caso de los ácidos grasos poliinsaturados, aunque no hubo diferencias significativas en la línea transformada y silvestre, se obtuvieron menores porcentajes: 6.8, 6.3 y 6.2 del peso seco para NEO LTP MM, NEO WT MM y NEO WT MD, respectivamente (Fig. 18).

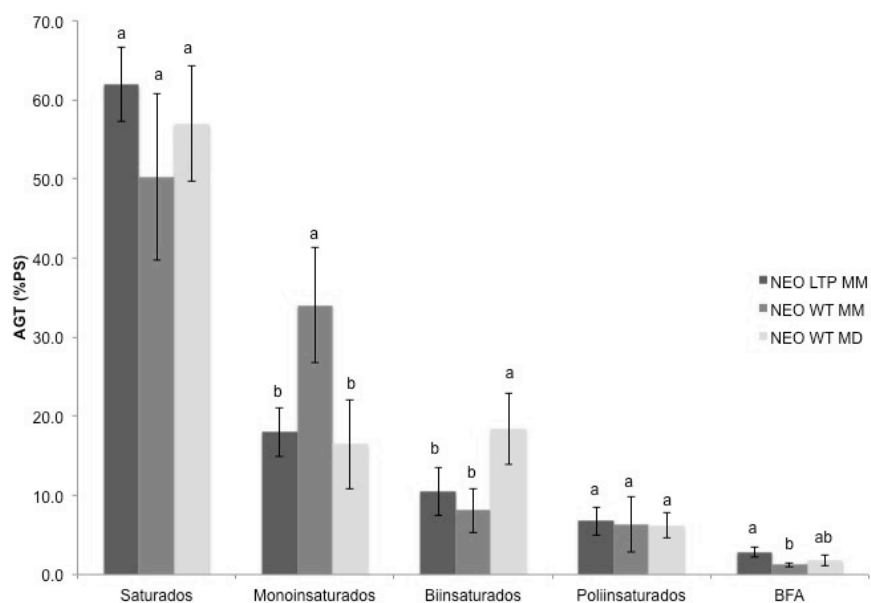


Figura 18. Grupos de ácidos grasos para la fracción PL de *N. oleoabundans* transformada con el gen LTP MM, silvestre MM y MD. Los valores están expresados en porcentaje con respecto al peso seco. NEO LTP MM: *N. oleoabundans* en medio marino transformada con el gen LTP. NEO WT MM: *N. oleoabundans* en medio marino silvestre. NEO WT MD: *N. oleoabundans* en medio dulceacuícola silvestre. Las barras representan intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

Tabla XIV. Perfil de ácidos grasos para la fracción PL de *N. oleoabundans* transformada con el gen LTP, silvestre MM y MD.

AG	NEO LTP MM	NEO WT MM	NEO WT MD	F (2,6)	P
14:0	4.3±2.9 ^a	1.3±1.2 ^b	2.4±0.8 ^b	12.1	0.008
16:0	34.7±6.2 ^a	26.3±1.6 ^b	31.9±8.0 ^a	9.5	0.014
18:0	23.0±13.1 ^a	22.7±24.6 ^a	22.8±9.1 ^a	0.0	0.998
∑AGS	62.0±10.3 ^a	50.3±23.1 ^a	57.0±16.1 ^a	2.2	0.201
16:1ω9	1.3±1.6 ^a	0.8±1.3 ^a	0.8±1.6 ^a	0.6	0.583
16:1ω7	1.1±2.2 ^b	5.0±3.9 ^a	2.0±1.5 ^b	10.5	0.011
16:1ω5	1.3±1.5 ^a	0.6±0.4 ^a	0.7±0.8 ^a	2.5	0.161
18:1ω9	7.6±3.2 ^a	3.4±2.0 ^b	8.6±8.1 ^a	5.3	0.047
18:1ω7	6.8±6.9 ^b	24.3±8.5 ^a	4.4±2.5 ^b	51.6	<0.001
∑AGM	18.0±6.7 ^b	34.0±15.9 ^a	16.5±12.5 ^b	11.6	0.009
16:2ω6	1.1±1.0 ^a	0.6±0.4 ^a	0.9±1.1 ^a	1.5	0.299
18:2ω6	9.4±7.3 ^b	7.5±6.4 ^b	17.6±11.0 ^a	7.5	0.024
∑AGB	10.4±6.6 ^b	8.1±6.1 ^b	18.5±9.9 ^a	9.1	0.015
16:3ω3	1.3±3.3 ^a	1.0±2.4 ^a	0.8±0.8 ^a	0.2	0.828
18:3ω3	5.4±3.0 ^a	5.3±5.2 ^a	5.4±3.9 ^a	0.01	0.994
∑AGP	6.8±3.9 ^a	6.3±7.6 ^a	6.2±3.5 ^a	0.05	0.948
15:0	1.3±0.3 ^a	0.5±0.2 ^b	0.8±0.7 ^b	11.5	0.009
17:0	1.6±1.2 ^a	0.7±0.6 ^b	1.0±0.9 ^{ab}	4.0	0.081
∑AGb	2.8±1.4 ^a	1.3±0.6 ^b	1.8±1.6 ^{ab}	7.5	0.023
AG (µg/mg)	0.6±0.5 ^a	0.7±0.6 ^a	0.8±0.8 ^a	0.3	0.763
AG %PS	0.06±0.05 ^a	0.07±0.06 ^a	0.08±0.08 ^a	0.3	0.763

Notas: Los valores son el promedio de réplicas independientes. ∑AGS ácidos grasos saturados. ∑AGM ácidos grasos monoinsaturados. ∑AGB ácidos grasos biinsaturados. ∑AGP ácidos grasos poliinsaturados. ∑AGb ácidos grasos asociados a bacterias. AG ácidos grasos ± intervalo de confianza. Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas $\alpha < 0.05$ (F de Fisher).

8.10 Estimación del número de cetano (CN)

El número de cetano (CN) se estimó aplicando la ecuación de Bamgboye y Hanses (2008) utilizando el porcentaje de los ácidos grasos obtenido de la extracción de lípidos totales. Los resultados fueron: 53.3, 50.12 y 49.12 para la línea transformada con el gen LTP, silvestre en medio marino y silvestre en medio dulceacuícola, respectivamente (Tabla XV). Los valores de CN de la línea transformada y silvestre fueron superiores a los indicados por la Norma Estadounidense ASTM D 6751 (≥ 47), mientras que la línea transformada superó el valor indicado por la Norma Europea EN 14214 (51).

Tabla XV. Valores estimados de número de cetano (CN).

Línea celular	Valor de CN
NEO LTP MM	53.37±0.53
NEO WT MM	50.12±0.64
NEO WT MD	49.12±1.08

Notas: Los valores son el promedio de réplicas independientes. ± desviación estándar.

8.11 Transesterificación ácida

Los gramos de biomasa obtenidos para la generación de biodiesel de las 4 muestras analizadas (NEO LTP MM, NEO WT MM, NEO WT MD y NEO WT MM F/2) fueron determinados por diferencia de peso (Tabla XVI). La cantidad de biodiesel obtenido por transesterificación ácida a partir de los gramos de biomasa fueron de 0.0504 g para NEO LTP MM, 0.0493 g para NEO WT MM, 0.0286 para NEO WT MD y 0.0649 para NEO WT MM F/2 (Tabla XVII).

Tabla XVI. Gramos de biomasa para determinación de índice de yodo.

Muestra	Peso matraz vacío (g)	Peso matraz con muestra (g)	Peso de la muestra (g)
NEO LTP MM	19.80	19.83	0.0275
NEO LTP MM	26.62	26.65	0.0217
NEO WT MM	11.64	11.66	0.0244
NEO WT MM	12.31	12.33	0.0241
NEO WT MD	26.62	26.65	0.0273
NEO WT MM F/2	19.81	19.84	0.0307
NEO WT MM F/2	19.91	19.94	0.0296

Tabla XVII. Gramos de biodiesel para determinación de índice de yodo.

Muestra	Peso vaso vacío (g)	Peso vaso con muestra (g)	Peso de la muestra (g)
NEO LTP MM	63.73	63.78	0.0504
NEO WT MM	63.08	63.13	0.0493
NEO WT MD	57.21	57.24	0.0286
NEO WT MM F/2	62.37	62.43	0.0649

8.12 Determinación de índice de yodo

En la estandarización del tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) se obtuvo una concentración promedio de 0.1 equivalentes L^{-1} (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Estandarización de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

No. Matraz	Peso de KIO_3 [g]	Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastado (mL)	Concentración de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (equivalentes L^{-1})*
1	0.1482	41.2	0.101
2	0.1490	41.0	0.102
3	0.1487	41.4	0.101

En cuanto a la valoración del blanco se obtuvo un volumen promedio de 3.0 mL gastados de tiosulfato de sodio (Tabla XIX).

Tabla XIX. Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastado para valoración de blanco.

No. matraz	Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastado (mL)
1	3.02
2	3.02
3	2.96

Para la determinación del índice de yodo calculado a partir del volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastado para la titulación debl blanco (Tabla XIX) y de cada muestra (Tabla XX) (ecuación 3), se obtuvieron valores de 73.44 para NEO MD WT BF, 62.81 para NEOMM WT F/2, 82.15 para NEO MM WT BF y 84.90 para NEO MM LTP BF (Tabla XXI).

Tabla XX. Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastado para cada muestra.

Muestra	Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastado (mL)
NEO MD WF BF	1.42
NEO MM WT F/2	1.60
NEO MM WT F/2	1.42
NEO MM WT BF	1.40
NEO MM WT BF	1.46
NEO MM LTP BF	1.12
NEO MM LTP BF	1.58

Tabla XXI. Índice de yodo calculado para cada muestra.

Muestra	Índice de yodo ($\text{gI}_2/100 \text{ g}$)	Promedio ($\text{gI}_2/100 \text{ g}$)
NEO MD WF BF	73.44	73.44
NEO MM WT F/2	57.87	62.81
NEO MM WT F/2	67.74	
NEO MM WT BF	83.21	82.15
NEO MM WT BF	81.09	
NEO MM LTP BF	86.75	84.90
NEO MM LTP BF	83.04	

8.13 Análisis de resonancia magnética

En el espectro ^1H -RMN del biodiesel generado se observan señales (picos) con diferentes desplazamientos (Fig. 19). La señal con un desplazamiento de cero ($\delta = 0 \text{ ppm}$; último pico) corresponde al tetrametil silano (Me_4Si) utilizado como referencia. La señal con $\delta=0.88 \text{ ppm}$ corresponde a los hidrógenos de los grupos metilo ($-\text{CH}_3$), $\delta = 1.25\text{-}1.29 \text{ ppm}$ corresponde a los hidrógenos de los grupos metilenos ($-\text{CH}_2-$), $\delta = 1.61 \text{ ppm}$ corresponde a los hidrógenos de los grupos metilo unidos en β -posición con respecto al éster ($-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), $\delta = 1.96 \text{ ppm}$ corresponde a los hidrógenos de los grupos metilenos unidos a un átomo de carbono con doble enlace ($-\text{CH}_2-\text{C}=\text{}$), $\delta = 2.29 \text{ ppm}$ corresponde a los grupos metileno unidos en α -posición (unidos directamente) al grupo éster ($-\text{OCO}-\text{CH}_2-$), δ

= 2.78 ppm corresponde a los grupos metileno que se encuentran entre dobles enlaces ($=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$), $\delta = 3.65$ ppm corresponde a los grupos metilos unidos directamente al grupo éster ($\text{CH}_3-\text{OCO}-$), $\delta = 5.38$ ppm corresponde a los hidrógenos de los dobles enlaces ($-\text{CH}=\text{CH}-$) y por último, la señal en $\delta = 7.26$ ppm corresponde al cloroformo empleado como disolvente de la muestra. Estas señales son las esperadas, indicando que la transesterificación vía ácida del aceite obtenido de los diferentes cultivos de *N. oleoabundans* se llevó a cabo por completo, es decir, los triésteres se transformaron por completo en ésteres metílicos (biodiesel). En este caso, no se observan señales de ácidos grasos libres, triésteres o diésteres que no hayan reaccionado.

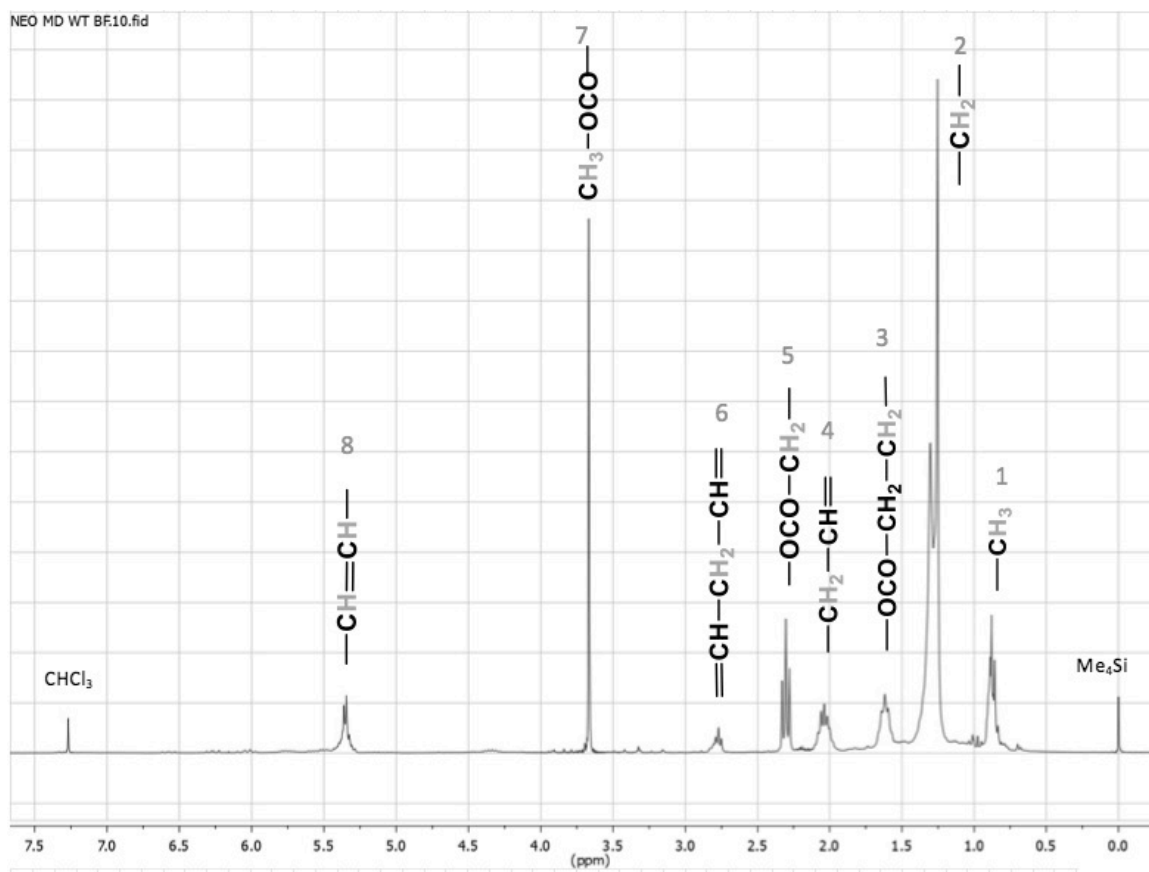


Figura 19. Espectro de ^1H -RMN del biodiesel obtenido a partir de la biomasa de la muestra NEO MD WT BF.

9. DISCUSIÓN

Los métodos de axenización utilizados para microalgas implican el uso de antibióticos, aislamiento con micropipeta, resiembra de colonias (Guillard, 2005), selección celular mediante fluorescencia activada (Sensen *et al.*, 1993) y uso de resinas triyodadas (Kibok *et al.*, 2015). Generalmente se requiere de la combinación de dos o más métodos. En la cepa de *Neochloris oleoabundans* se utilizó el antibiótico cefotaxima a una concentración de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguido del aislamiento de colonias las cuales se transfirieron al medio de cultivo, obteniendo la axenización completa del mismo, el cual se verificó a lo largo de los experimentos. Otros antibióticos se han usado para diferentes microalgas, por ejemplo, para la axenización de *Ettlia texensis* (Muge *et al.*, 2013) se utilizó la mezcla de penicilina (10 mg mL^{-1}), estreptomycin (2.5 mg mL^{-1}) y gentamicina (2.5 mg mL^{-1}), seguido del subcultivo de dicha cepa en medio adicionado con glucosa o agar nutritivo para el mantenimiento de cultivos axénicos. Estos resultados indican que la combinación de diferentes métodos de axenización aseguran el éxito de cultivos de microalgas libres de bacterias.

Un aspecto importante de mencionar, es que en el medio ambiente en donde habitan las microalgas, llámese agua de mar, agua dulce, salobre, residual, suelo, nieve, normalmente se encuentran en asociación con bacterias, es decir, cohabitan en un sinergismo en donde existe un beneficio mutuo y en el que llegan a combinar sus actividades metabólicas. Un ejemplo conocido es durante el proceso de fotosíntesis, en el que se produce oxígeno, además de carbohidratos. El O_2 presente en el medio, compite con el sitio activo de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa (RUBISCO), enzima clave durante el proceso de fotosíntesis. Esta enzima se conoce que puede actuar como oxigenasa y/o carboxilasa, y de esto dependerá de la concentración del O_2 y/o del CO_2 que haya en el medio. Las bacterias en esta asociación con las microalgas, juegan un papel muy importante

ya que utilizan el O₂ producido, disminuyendo así la concentración de éste en el medio, por lo que favorecerá que la RUBISCO actúe como carboxilasa.

El trabajar con cultivos axénicos de *N. oleoabundans*, se asume que al momento de alterar el sinergismo que existía, repercutirá en la fotosíntesis y por ende, en la tasa de crecimiento (μ). Si bien es cierto, se sabe que éstos parámetros de crecimiento también dependen de otros factores como irradiancia (intensidad y calidad de la luz), temperatura, fotoperíodo, pH; éstos se mantuvieron constantes durante el desarrollo de los experimentos. Al haber eliminado a las bacterias durante la axenización, así como el haber sometido a la microalga a un proceso de transformación, se espera una μ afectada. Trabajos previos con *N. oleoabundans* reportaron una μ de 0.73 d⁻¹ así como una disminución del crecimiento al día 8 en el medio SWES con agua de mar a 30 UPS (Popovich *et al.*, 2012). En medio BMM enriquecido con glucosa y acetato de sodio, se obtuvo una μ de 0.145 d⁻¹ (Rodríguez-Silva *et al.*, 2016). En medio dulceacuícola (Pruvost *et al.*, 2009), en presencia de 420 mM de sal (Santos *et al.*, 2012) así como en cultivo heterotrófico (Morales-Sánchez *et al.*, 2013), la μ osciló entre 0.04-0.08 h⁻¹. Nuestros resultados de μ fueron para la cepa silvestre en el medio MM y MD de 0.26 d⁻¹ y 0.30 d⁻¹, respectivamente, mientras que para la línea transformada en MM fue de 0.07 d⁻¹, con un descenso en el número de células al día 6.

En cuanto a la transformación genética de *N. oleoabundans*, se han implementado principalmente las técnicas de electroporación (Carter, 2010; Keyser, 2011; García-Flores, 2015; Chungjatupornchai *et al.*, 2015), así como la transformación mediada por *A. tumefaciens* (Ikarán, 2010; García-Flores, 2015) con resultados exitosos. Específicamente para la transformación mediada por *Agrobacterium*, Ikarán-Zugazaga (2010), sugirió el uso de filtros de papel como soporte para el co-cultivo, los cuales se utilizaron en nuestros ensayos. Asimismo, además indica que un fotoperíodo de 16:8 h luz:oscuridad durante el co-cultivo es determinante para el proceso de infección logrando una eficiencia de transformación de 30 colonias por millón de células sembradas. En el caso

particular de *N. oleoabundans* presentó resistencia al antibiótico de selección (higromicina) por lo que no fue posible determinar la eficiencia de transformación. Se observó abundante crecimiento celular en las placas, sin embargo, no fue posible determinar cuáles eran transformadas y cuáles no. Chungjatupornchai *et al.* (2016), mencionan que *N. oleoabundans* es sensible a concentraciones de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina cuando es cultivada a una concentración de 3.1×10^8 células en medio BBM (Bold's basal medium), a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, e iluminación constante. Carter (2010), menciona que concentraciones bajas, desde $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, de higromicina en cultivo líquido BBM, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, e iluminación constante; inhiben el crecimiento de *N. oleoabundans*, mientras que Keyser (2011) determina que concentraciones entre $5\text{-}100 \mu\text{g mL}^{-1}$ son letales para esta microalga, tanto en medio líquido BBM como sólido. Se ha determinado para otras microalgas como *C. sorokiniana* una concentración letal de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina, cultivada en medio sólido NB, a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, con foto periodo de 16:8 h; sin embargo, estas condiciones no tuvieron efecto inhibitorio en *N. oleoabundans*. Es importante mencionar que ambas condiciones de cultivo evaluadas en este trabajo contenían sales en su composición ya que el medio marino NB fue elaborado con agua de mar ajustada a 35 UPS, mientras que el medio dulce NB fue adicionado con un 10% de agua de mar ajustada a 35 UPS. En las especificaciones para el uso de higromicina se indica que concentraciones bajas de sal disminuyen la cantidad de antibiótico necesario para tener un efecto letal, por lo que la presencia de sal en los medios de cultivo utilizados pudo haber tenido un efecto negativo en la actividad del antibiótico. García-Flores (2015), reporta un método de transformación por *Agrobacterium* empleando un medio de inducción con sales AB 1X, 2mM de NaH_2PO_4 , 30 mM MES, glucosa 1% y 100 mM de acetosiringona, además del uso de zeocina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) como marcador de selección. El co-cultivo se realizó durante 24 h a iluminación constante, obteniendo un total de 5 colonias transformada de 1×10^6 células cultivadas en medio de selección. En nuestro caso se añadió al medio de cultivo MES como potenciador de la transformación, sin embargo, no se observó diferencia en el crecimiento celular en las placas de

selección adicionadas con y sin este compuesto. Este crecimiento abundante en las placas de selección se vio influenciado principalmente por la dosis de higromicina empleada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

El aumento en la cantidad de lípidos totales en la línea transformada fue 2.2 veces mayor con respecto a la cepa silvestre en MM, y 3.4 veces mayor con respecto a la cepa silvestre en MD, lo que sugiere que el gen LTP está provocando el incremento de los lípidos en la línea transformada. Trabajos previos, han reportado entre 27-56% de lípidos totales para *N. oleoabundans* silvestre cultivada en medio dulceacuícola (Tornabene *et al.*, 1983; Li *et al.*, 2008; Gouveia y Oliveira, 2009; Rodríguez-Silva *et al.*, 2016). Popovich *et al.* (2012), reportaron 26.65% en medio marino. Hasta la fecha, no se han encontrado reportes en donde se evalúe la producción de lípidos totales en *N. oleoabundans* modificada genéticamente, sin embargo, en la microalga *C. reinhardtii* se reportó un aumento de 2 a 4 veces la producción de gotas lipídicas en cepas mutantes para la producción de almidón, al compararlas con la cepa silvestre (Wang *et al.*, 2009; Work *et al.*, 2010), así como un aumento en el tamaño de gotas lipídicas, en cepas mutantes para MLDP (Moellering y Benning, 2010).

El aumento en los ácidos grasos monoinsaturado (AGM) C18:1 ω 9 fue 3.7 veces en la línea transformada con respecto a la cepa silvestre en MM, y de 3.2 veces con respecto a la cepa silvestre en MD. También el ácido graso biinsaturado (AGB) C18:2 ω 6 aumentó su porcentaje con respecto al peso seco 1.4 veces en la línea transformada con respecto a la cepa silvestre en MM. El principal ácido graso en forma de triacilglicérido en *N. oleoabundans* es el ácido oléico (C:18:1) (Yang *et al.*, 2013), mientras que los más abundantes son: el ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1 ω 9), linoleico (C18:2 ω 9) y linolénico (C18:3 ω 3) (Gouveia y Oliveira, 2008; Levine *et al.*, 2011; Popovich *et al.*, 2012).

Levine *et al.* (2011) encontraron una disminución en los ácidos grasos poliinsaturados C16:3 y C18:3 en *N. oleoabundans* y un aumento en el porcentaje

de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Este resultado fue similar a lo que se obtuvo en este trabajo.

En cuanto a las fracciones lipídicas NL, AMPL y PL de *N. oleoabundans*, Popovich *et al.* (2012), reportaron lo siguiente: para NL 27.5% para los ácidos grasos saturados (AGS), similar a lo obtenido para la línea transformada (27.7%), y menores para las cepas silvestres (34.5% en MM y 48% en MD). 48.7% para ácidos grasos monoinsaturados (AGM), el cual fue mayor a lo encontrado en este trabajo (33.3% línea transformada, 35% cepa silvestre en MM y 27.5% cepa silvestre en MD). 23.7% para ácidos grasos poliinsaturados (AGP), mientras que en este trabajo se obtuvieron para la línea transformada 6.1%, 5.6% cepa silvestre en MM y 3.0% cepa silvestre en MD.

Para la fracción de galactolípidos (AMPL), 25.7% para AGS, menor a lo encontrado para la línea transformada (34.0%) y mayor para las cepas silvestres (23.4% en MM y 23.5% en MD); 49.80% para AGM, mayor a lo reportado en este trabajo (6.3% línea transformada, 12.0% cepa silvestre en MM y 5.0% cepa silvestre en MD). 22.2% para AGP, mientras que en este trabajo, se obtuvo 53.4% para la línea transformada, 51.0% para la cepa silvestre en MM y 48.0% para la cepa silvestre en MD.

Para la fracción de fosfolípidos (PL), 29.70% para AGS, menor a lo obtenido en este trabajo que fue de 62.0% para la línea transformada, 50.3% para la cepa silvestre en MM y 57.0% para la cepa silvestre en MD. 32.9% para AGM, mayor a lo encontrado para la línea transformada (18%), cepa silvestre en MD (16.5%), y similar para la cepa silvestre en MM (34.0%). 37.5% para AGP, mayor a lo que obtenido en este trabajo (6.8% línea transformada, 6.3% cepa silvestre en MM y 6.2% cepa silvestre en MD).

Mittelbach y Remschidt (2004) mencionan que C18:1 es un ácido graso ideal para la producción de biodiesel ya que provee mejores propiedades de flujo y una menor oxidación. En este trabajo se obtuvo un aumento significativo de

C18:1 ω 9 en la línea transformada en la fracción NL (30.6%), lo que sugiere que el gen LTP está implicado en la síntesis de este ácido de *N. oleoabundans*.

Schenk *et al.* (2008), definen como la mezcla ideal de ácidos grasos para la producción de biodiesel a los siguientes: C16:1, C18:1 y C14:0 en una proporción 5:4:1. En este trabajo, aunque el C18:1 aumentó significativamente, en los casos de C16:1 y C14:0 no se observaron incrementos en su porcentaje.

De acuerdo a las especificaciones de la norma EN14214, el C18:3 debe ser menor a 12%. En la línea transformada este ácido graso fue 8.1%.

La estimación del índice de cetano (CN) en la línea transformada y silvestre MM y MD fue mayor (53.4, 50.1, 49.1 respectivamente) que el definido en la Norma Estadounidense ASTM D 6751 que indica debe ser ≥ 47 . Mientras que en el caso de la Norma Europea EN 14214 indica un valor de ≥ 51 , en este trabajo, la línea transformada fue de 53.4. Hasta el momento, no se han encontrado reportes del CN, ya sea estimado (considerando el % de ácidos grasos) y/o calculado, para *N. oleoabundans*, sin embargo, para otras microalgas marinas y dulceacuícolas, se han reportado estimaciones empleando la ecuación de Krisnangkura (1986), tales son los casos de: *Nannochloropsis oculata* (55.0), *P. tricornutum* (47.3), *Scenedesmus dimorphus* (32.9), *Chlamydomonas sp.* (66.9), *C. vulgaris* (63.8) y *Botryococcus braunii* (55.1). En las mismas microalgas cuantificando el CN por el método de Ramírez-Verduzco *et al.* (2012), los valores de CN fueron: *N. oculata* (57.9), *P. tricornutum* (50.3), *S. dimorphus* (37.1), *Chlamydomonas sp* (62.4), *C. vulgaris* (63.3) y *B. Braunii* (58.7) (Aminul Islam *et al.*, 2013).

Otro de los parámetros que se evaluaron para definir la calidad del biodiesel, fue el índice de yodo. Para *N. oleoabundans* se han reportado los siguientes índices: 86.57-88.25 $\text{gl}_2/100 \text{ g}$ (Popovich *et al.*, 2012); 102 $\text{gl}_2 100 \text{ g}^{-1}$ (Gouveia y Oliveira, 2008) y 83.15 $\text{gl}_2 100 \text{ g}^{-1}$ (Levine *et al.*, 2011). En nuestro trabajo se encontró que la línea transformada fue 84.90 $\text{gl}_2 100 \text{ g}^{-1}$; la cepa silvestre en MM fue de 82.15 $\text{gl}_2 100 \text{ g}^{-1}$, y para la cepa silvestre en MD fue de

73.44 $\text{gI}_2/100 \text{ g}$). Las tres líneas trabajadas, cumplieron con las especificaciones de calidad de biodiesel ($<120 \text{ gI}_2 100 \text{ g}^{-1}$).

10. CONCLUSIONES

Se logró la inserción del gen LTP en la microalga *N. oleoabundans* empleando *A. tumefaciens* como método de transformación, al detectarse la secuencia del gen en el genoma de la microalga.

La axenización del cultivo de *N. oleoabundans* rompió el sinergismo en la asociación microalga-bacteria lo que afectó la tasa de crecimiento.

La inserción del gen LTP provocó también una disminución en la tasa de crecimiento en la microalga *N. oleoabundans*, lo que repercute en la producción de biomasa y obtención de biodiesel.

La inserción del gen LTP provocó en la microalga *N. oleoabundans* cultivada en medio marino el incremento de los lípidos totales con respecto a la línea silvestre cultivada tanto en MM como en MD. En este trabajo se obtuvieron porcentajes menores a los reportados empleando diferentes condiciones de cultivo. Estos resultados que se obtuvieron se podrían mejorar aireando con una mezcla de aire-CO₂ así como la eliminación del oxígeno en el medio.

Se determinó que la fracción de lípidos neutros (NL) se vio mayormente afectada por la presencia del gen LTP, aumentando particularmente la cantidad de ácido oleico (C8:1), por lo que este gen podría estar involucrado en la acumulación de lípidos de reserva.

La calidad del biodiesel obtenido se estimó a través del CN y el índice de yodo. Los resultados de ambos parámetros sugieren que la transformación de *N. oleoabundans* mediante la inserción del gen LTP favoreció la calidad del biodiesel ya que los valores obtenidos están dentro de las Normas establecidas.

La inserción del gen LTP favoreció la producción de ácidos grasos saturados en la microalga *N. oleoabundans* cultivada en medio marino, además de

una disminución en los ácidos grasos poliinsaturados, aumentando el potencial de esta microalga para la producción de biodiesel.

11. LITERATURA CITADA

Abishek, M.P., J. Patel, A.P. Rajan. 2014. Algae oil: a sustainable renewable fuel of future. *Biotechnol Res Int.* 2014:272814.

Archibald, P. 1973. The genus *Noechloris* Starr (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Phycologia* 12(3-4):187-193.

Arredondo-Vega, B.O., C.J. Band-Schmidt, R. Vázquez-Duhalt. 1995. Biochemical composition of *Neochloris oleoabundans* adapted to marine medium. *Cytobios.* 83:201-205.

Baeza, A. 2003. Microbureta a microescala total para titulometría. *Re Chil Educ Cient.* 1(2):4-7.

Baldisserotto, C., Ferroni, L., Giovanardi, M., Boccaletti, L., Pantaleoni, L., S. Pancaldi. 2012. Salinity promotes growth of freshwater *Neochloris oleoabundans* UTEX 1185 (Sphaeropleales, Chlorophyta): morphophysiological aspects. *Phycologia* 51(6):700-710.

Bamgboye, A.I., A.C. Hansen. 2008. Prediction of cetane number of biodiesel fuel from the fatty acid methyl ester (FAME) composition. *Int Agrophysics.* 22:21-29.

Band, C.J., B.O. Arredondo-Vega, R. Vázquez-Duhalt, H. Greppin. 1992. Effect of a salt-osmotic upshock on the edaphic microalga *Neochloris oleoabundans*. *Plant Cell Environ.* 15:129-133.

Banerjee, C., K.K. Dubey, P. Shukla. 2016. Metabolic Engineering of microalgal based biofuel production: prospects and challenges. *Front Microbiol.* 7:432.

Carter, B. 2010. Transformation of *Ettlia oleoabundans*, a potential biofuel alga. Thesis (Bachelor of Science). Worcester, MA. Faculty of Worcester Polytechnic Institute. 36 p.

Chantanachat, S., H.C. Bold. 1962. Phycological studies. II. Some algae from arid soils. University of Texas Publications. 6218:1-74.

Chungjatupornchai, W., A. Watcharawipas. 2015. Diacylglyceron acyltransferase type 2 cDNA from oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans*: cloning and functional characterization. *J Appl Phycol.* 27(4):1499-1507.

Chungjatupornchat, W., P. Kitraksa, S. Fa-aoonsawat. 2016. Stable nuclear transformation of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* by electroporation. *J Appl Phycol.* 28(1):191-199.

Clarens, A.F., E.P. Resurreccion, M.A. Whiteand, L.M. Colosi. 2010. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstock's. *Environ Sci Technol.* 44(5):1813-1819.

Dunahay, T.G., E.E. Jarvis, S.S. Dais, P.G. Roessler. 1996. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *Appl Biochem Biotech.* 57:223-231.

García-Flores, F.J. 2015. Transformación genética de *Neochloris oleoabundans* utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y electroporación. Tesis (Maestría en ciencias). Aguascalientes, Ags. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Química. 49 p.

Garibay-Hernández, A. 2008. Evaluación de condiciones de cultivo en la producción de lípidos con el alga *Neochloris oleoabundans* para su uso potencial como biodiesel. Tesis (Maestría en Ciencias). Cuernavaca, Morelos. Universidad Autónoma de México. 128 p.

Garibay-Hernández, A., R. Vázquez-Duhalt, M.P. Sánchez-Saavedra, L. Serrano-Carreón, A. Martínez-Jiménez. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología* 13(3):38-61.

Gouveia, L., A.C. Oliveira. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36(2):269-274.

Greenwell, H.C., L.M. Laurens, R.J. Shields, R.W. Lovitt, K.J. Flynn. 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J R Soc Interface.* 7(46):703-726.

Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. In: Stein, J.R. (ed). *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements.* University Press. Cambridge. pp 289-320.

Guillard, R.R.L. 2005. Purification methods for microalgae. In: Andersen, R.A. (ed). *Algal Culturing Techniques.* Elsevier Academic Press. Primera edición. Burlington. pp 123–124.

Guldhe, A., B. Singh, T. Mutanda, K. Permaul, F. Bux. 2015. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: novel and sustainable approaches. *Renew Sustainable Energy Rev.* 41:1447-1464.

Hurlock, A.K., R.L. Roston, K. Wang, C. Benning. 2014. Lipid trafficking in plant cells. *Traffic*. 15(9):915-932.

Ikaran-Zugazaga, Z. 2010. Transformación genética de *Neochloris oleoabundans* S.Chantanachat & H.C. Bold (Clorofita) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis (Maestría en Ciencias). Pamplona, Navarra. Universidad Pública de Navarra. 28 p.

Iskandarov, U., I. Khozin-Goldberg, Z. Cohen. 2011. Selection of a DGLA producing mutant of the microalga *Parietochloris incisa*: I. Identification of mutation site and expression of VLC-PUFA biosynthesis genes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90:249-256.

Islam, M.A., M. Magnusson, R.J. Brown, G.A. Ayoko, Md.N. Nabi, K. Heimann. 2013. Microalgal species selection for biodiesel production base don fuel properties derived from fatty acid profiles. *Energies* 6:5676-5702.

Keyser, A. 2011. Optimizing the electroporation of *Ettlia oleoabundans* protoplast. Thesis (Bachelor of Science). Worcester, MA. Faculty of Worcester Polytechnic Institute. 46 p.

Kibok, N., S. Won-Sub, J. Byerong-ryool, P. Min S., Y. Ji-Won, K. Jong-Hee. 2015. Use of a triidide resin for isolation of axenic cultures of microalgal *Nannochloropsis gaditana*. *Bioresour Technol*. 191:391-394.

Krzeminska, I., B. Pawlik-Skowronska., M. Trzcinska, J. Tys. 2014. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess Biosyst Eng*. 37:735-741.

La Russa, M., C. Bogen, A. Uhmeyer, A. Doebbe, E. Filippone, O. Kruse, J.H. Mussgnug. 2012. Functional analysis of the three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol*. 162(1):13-20.

Lam, M.K., K.T. Lee. 2012. Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the forward. *Biotechnol Adv*. 30(3):673-690.

Levine, R.B., M.S. Costanza-Robinson, G.A. Spatafora. 2011. *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Biomass Bioenerg*. 36(1):40-49.

Li, Q., W. Du, D. Liu. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 80(5):748-756.

Li, Y., D. Han, G. Hu, D. Dauvillee, M. Sommerfeld, S. Ball, Q. Hu. 2010. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metab Eng.* 12(4):387-391.

Lü, J., C. Sheahan, P. Fu. 2011. Metabolic Engineering of algae for fourth generation biofuels production. *Energy Environ Sci.* 4:2451-2466.

Mittelbach M., C. Remschidt. 2004. Biodiesel: the comprehensive handbook. Editorial M. Mittelbach. Primera edición. Austria. 332p.

Moellering, E.R., C. Benning. 2010. RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell.* 91(1):97-106.

Morales-Sánchez, D., R. Tinoco-Valencia, J. Kyndt, A. Martinez. 2013. Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as carbon source. *Biotechnol Biofuels.* 6:100.

Muge, I.H., A.T. Duygu, Z. Gokhan, E. Murat. 2013. Enhanced growth and lipid accumulation by a new *Ettlia texensis* isolate under optimized photoheterotrophic condition. *Bioresour Technol.* 131:258-265.

Mussnug, J.H., S. Thomas-Hall, J. Rupprecht, A. Foo, V. Klassen, A. McDowall, P.M. Schenk, O. Kruse, B. Hankamer. 2007. Engineering photosynthetic light capture: impacts on improved solar energy to biomass conversion. *Plan Biotechnol J.* 5(6):802-814.

Niu, Y.F., M.H. Zhang, D.W. Li, W.D. Yang, J.S. Liu, W.B. Bai, H.Y. Li. 2013. Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Drugs.* 11(11):4558-4569.

Polle, J.E., S.D. Kanakagiri, A. Melis. 2003. Tla1, a DNA insertional transformant of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with a truncated light-harvesting chlorophyll antenna size. *Planta* 217:49-59.

Popovich, C.A., C. Damiani, D. Constenla, A.M. Martínez, H. Freije, M. Giovanardi, S. Pancaldi, P.I. Leonardi. 2012. *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: Evaluation of its growth and biochemical composition. *Bioresour Technol.* 114:287-293.

Pruvost, J., G. Van Vooren, C.J. Legrand. 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresour Technol.* 100: 5988-5995.

Radakovits, R., P.M. Eduafo, M.C. Posewitz. 2011. Genetic Engineering of fatty acid chain length in *Phaeodactylum tricornutum*. *Metab Eng.* 13:89-95.

Radakovits, R., R.E. Jinkerson, A. Darzins, M.C. Posewitz. 2010. Genetic engineering of algae for enhanced biosuel production. *Eukaryot Cell.* 9(4). 486-501.

Ramazanov, Z., A. Ramazanov. 2006. Isolation and characterization of starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI with a high growth rate, and high Protein and polyunsaturated fatty acid content. *Phycol Res.* 54:255-259.

Rismani-Yazdi, H., B.Z. Haznedarogly, C. Hsin, J. Peccia. 2012. Transcriptomic analysis of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* reveals metabolic insights into triacylglyceride accumulation. *Biotechnol Biofuels.* 5:7-89.

Rodríguez-Silva, H., C.E. Cavenaghi-Prete, F. Zambrano, V.H. de Mello, C.A. Tischer, D. Souza-Andrade. 2016. Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *Neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions. *AMB Expr.* 6:10-21.

Rojas-Arzaluz, M. 2012. Caracterización funcional del gen que codifica para una proteína transportadora de lípidos de *Opuntia streptacantha* bajo estrés abiótico. Tesis (Maestría en ciencias). La Paz, Baja California Sur. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 90 p.

Santos, A.M., M. Janssen, P.P. Lamers, W.A.C. Evers, R.H. Wijffels. 2012. Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. *Bioresource Technol.* 104:593-599.

Santos, A.M., R.H. Wijffels, R. H, P.P. Lamers. 2014. pH upshock yields more lipids in nitrogen-starved *Neochloris oleoabundans*. *Bioresource Technol.* 152:299-306.

Schenk, P.M., S.R. Thomas-Hall, E. Stephens, U.C. Marx, J.H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse, B. Hankamer. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg Res.* 1(1):20-43.

Schuhmann, H., D.K.Y. Lim, P.M. Schenk. 2012. Perspectives on metabolic engineering for increased lipid contents in microalgae. *Biofuels* 3(1):71-86.

Sensen, C.W., K. Heimann, M. Melkonian. 1993. The production of clonal and axenic cultures of microalgae using fluorescence-activated cell sorting. *Eur J Phycol.* 28(2):93-97.

Sharma, K.K., H. Schuhmann, P.M. Schenk. 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 5:1532-1553.

Tabatabaei, M., M. Tohidfar, G.S. Jouzani, M. Safarnejad, M. Pazouki. 2011. Biodiesel production from genetically engineered microalgae: future of bioenergy in Iran. *Renew Sustainable Energy Rev.* 15(4): 1918-1927.

Tornabene, T.G., G. Holzer, S. Lien, N. Burris. 1983. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb Tech.* 5(6):435-440.

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

Work, V.H., R. Radakovits, R.E. Jinkerson, J.E. Meuser, L.G. Elliott, D.J. Vinyard, L.V.L. Laurens, G.C. Dismukes, M.C. Posewitz. 2010. Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* *sta7-10* starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains. *Eukaryot Cell.* 9(8):1251-1261.

Yang, Y., B. Mininberg, A. Tarbet. 2013. At high temperature lipid production in *Ettlia oleoabundans* occurs before nitrate depletion. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:2263-2273.

Yu, W.W, Ansari, N.G. Schoepp, M.J. Hannon, S.P. Mayfield, M.D. Burkat. 2011. Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. *Microb Cell Fact.* 10:91-101.

Zaslavskaja, L.A., J.C. Lippmeier, C. Shih, D. Ehrhardt, A.R. Grossman, K.E. Apt. 2001. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Sci.* 292(5524):2073-2075.