

Informe anual Proyecto I+D y T

ALGAS Cliente: DMAPTAP

Contacto Neiker:	
Sonia Castañón de la Torre	
scdelatorre@neiker.net	
945 121 344	

Ref. NEIKER: 61.0192.0

Ejercicio: 2011

Ref. DMAPTAP:

Fecha: 10/2/2012

Acrónimo: ALGAS

Título: PRODUCCIÓN DE MICROALGAS: SOLUCIONES INTEGRALES

Jefe de proyecto: Sonia Castañón de la Torre

email: scdelatorre@neiker.net

Clasificación del proyecto:	Unidad de negocio: Innovación Agraria
Departamento: Biotecnología	Campos de aplicación: Producción de Biomoléculas
Área estratégica: Biotecnología	Línea: Microalgas
Tipo de proyecto: Estratégico	Origen: NEIKER

Palabras clave: Biomoléculas, microalgas, biodiesel,

Objeto: Microalgas

Aspecto: Bioenergía

Finalidad: Biomoléculas

Objetivo: Desarrollar un sistema de cultivo de microalgas para la obtención de bioenergía a través de la producción de biomasa rica en lípidos e hidratos de carbono, así como para la obtención de biomoléculas de interés

Objetivos específicos:

1. Desarrollo de una planta piloto para la producción de microalgas: (A) establecimiento de un cepario; (B) adquisición de FBR reactores 5-20 L y de 3000 L
2. Desarrollo de la línea de producción de lípidos con el fin de derivarlos hacia la obtención de biodiesel.
3. Establecimiento de estrategias de mejora de cepas empleando la ingeniería genética.
4. Difusión de resultados supeditado al establecimiento de convenios de colaboración con diferentes organismos y empresas.

Duración: 48 meses

Fecha de inicio: 1/01/2009

Fecha final: 31/12/2012

1. Equipo participante de NEIKER - Tecnalia

Participantes de NEIKER - Tecnalia

- **Jefe de Proyecto:** Sonia Castañón de la Torre
- **Otros participantes:** Sonia Suárez Álvarez, Ziortza Ikarán, Iratxe Urreta

Otras entidades participantes o colaboradoras:

2. Informe sobre las actividades más destacadas de la investigación en el proyecto y resultados obtenidos

Incluir en este apartado

- + Actividades más destacadas por objetivo
- + Otros resultados obtenidos (si es necesario)

2.1. Objetivos generales planteados en el proyecto

El objetivo del presente proyecto es el establecimiento de una planta piloto de cultivo de microalgas dirigida a la obtención de bioenergía mediante la producción de lípidos y carbohidratos. Alternativamente se valorará la obtención de biomoléculas de interés económico que revaloricen los costes de producción.

Los objetivos específicos planteados inicialmente en el Plan de Proyecto, a cubrir en 4 años, son:

1. Desarrollo de una planta piloto para la producción de microalgas de interés económico (productoras de lípidos, carbohidratos y biomoléculas).
2. Desarrollo de la línea de producción de lípidos neutros para obtención de biodiesel.
3. Establecimiento de estrategias de mejora de cepas empleando ingeniería genética.
4. Difusión de resultados.

A continuación se describen las actividades realizadas durante esta anualidad, que se enmarcan dentro del objetivo 3.

Actividades destacadas desarrolladas durante la anualidad 2012.

Dado que los resultados obtenidos en el periodo anterior no fueron los esperados, y dada la importancia de conseguir el objetivo final, se ha continuado investigando en la puesta a punto del método de transformación, así como en el sistema de detección empleado.

Además, durante esta anualidad se han identificado y aislado genes implicados en el metabolismo lipídico, con el fin de que durante el año 2013, solicitado como prórroga de este proyecto se plantee la transformación genética empleando dichos genes.

Se han estado desarrollando las siguientes tareas enmarcadas dentro del objetivo 3:

3.1. Desarrollo un protocolo de transformación genética estable para especies de microalga verdes lipogénicas empleando *Agrobacterium tumefaciens* como sistema de transformación para la inserción de un gen reporter en la especie de microalga seleccionada (*C.vulgaris*)

3.2. Identificación de enzimas implicadas en la ruta de oleogénesis de microalgas verdes y análisis de actividades enzimáticas durante el proceso de oleogénesis

3.3. Identificación y aislamiento de genes que codifican enzima/s clave/s en el suministro de precursores a la ruta lipogénica.

3.1. Desarrollo de un protocolo de transformación de *Chlorella vulgaris* y *Neochloris oleoabundans* mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

3.1.1. *Neochloris oleoabundans*.

Chlorella vulgaris y *Neochloris oleoabundans* (Chlorophyceae) se adquirieron del Banco Nacional de Algas (BNA) de La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las cepas se activaron por transferencia desde medio sólido a medio Bold Basal (MBB) (Andersen, 2005) líquido, y se dejaron crecer con agitación orbital (100 rpm) en cámara de cultivo a una temperatura de 22°C, con una irradiación de 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo 16:8 horas L:O.

Para los experimentos de transformación los cultivos a infectar se prepararon a partir de cultivos madre en fase de crecimiento exponencial, diluyéndolos con MBB (3mM de NO_3) a concentraciones finales de 15×10^6 cel/ml para *Neochloris oleoabundans* y 15×10^6 cel/ml para *Chlorella vulgaris*.

3.1.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Para los experimentos se empleó la cepa desarmada LBA4404 adquirida en la CECT (Colección española de cultivos tipo). La cepa, conservadas en glicerol (25%) a -80°C, se activó en medio de cultivo específico, medio YEB (Nutrient Broth 5g/l, Peptona 5g/l, Sacarosa 5g/l y Extracto de levadura 1g/l, pH=7).

Como vector binario se empleó el plásmido pCambia 1304 portador del gen de la higromicina-fosfotransferasa (*hpt*), que codifica para el marcador selectivo de resistencia a higromicina, controlado por el promotor del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV35S*) y la fusión de los genes informadores *gfp* que codifica la Green fluorescent protein (GFP) y *uidA* (*GUS*: beta-glucuronidase), también bajo control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV35S*). El plásmido contiene el gen neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que confiere resistencia a la kanamicina para su selección en bacterias (Figura 1).



Figura 1: Mapa del T-DNA del plásmido binario pCambia1304.

La transferencia del plásmido pCambia 1304 a la cepa LBA4404 se realizó mediante electroporación, empleando un MicroPulser™ de BIORAD (Lin, 1995). Para la preparación de células electrocompetentes de LBA4404, se inoculó una colonia aislada en 100 mililitros de medio de cultivo con los antibióticos apropiados y se incubó a 28° C a 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.5. Una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial se mantuvo el cultivo en hielo durante 10 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. El pellet se lavo tres veces con 50 mililitros de glicerol al 10% frío y finalmente se resuspendió en 1 ml de glicerol, también al 10%. Para la transformación se utilizaron 200ng del plásmido pCambia 1304 y una alícuota de 40ul de células electrocompetentes.

Las células electroporadas se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo y se incubaron durante 4 horas a 28° C y 180 rpm. Tras la incubación, las células se sembraron en

YEB agar suplementado con rifampicina (25mg/l) y kanamicina (100mg/l) y se incubaron durante 48 horas a 28°C. La presencia del plásmido pCambia 1304 en las colonias transformadas se analizó mediante amplificación por PCR de los genes *gfp* y *uidA* empleando cebadores específicos.

La cepa con el vector binario pCambia 1304 se activó en YEB (pH 7,4) líquido suplementado con los mismos antibióticos, y se cultivó durante 48 horas a 28°C, y 180 rpm. Partiendo de este cultivo que alcanza una DO de aproximadamente 2 se prepararon tres cultivos independientes para la posterior infección de las microalgas:

1. Un volumen del cultivo madre se centrifugó y se resuspendió en medio de inducción (MI), MBB suplementado con acetosiringona 100µM, dejándolo a una DO final de 0,5.
2. El cultivo madre se diluyó con el mismo medio hasta una DO de 0.3 y se incubó en las mismas condiciones durante 4-5 horas más hasta alcanzar una OD 600 de 0,5 aproximadamente. Este cultivo se centrifugó y se resuspendió. Esta dilución se cultivó hasta alcanzar una DO de 0.5 y se centrifugó para resuspenderlo en el mismo volumen de medio de inducción y se utilizó para infectar.
3. En este caso se diluyó el cultivo del tratamiento 2 hasta una OD de 0,1 y se utilizó para infectar.

3.1.3. Proceso de infección.

Para la infección se emplearon placas de microtitulación. Los cultivos a infectar se prepararon a partir de los cultivos madre, dispensando 200µl de cultivo en cada réplica de infección lo que correspondería a 3×10^6 células en el caso de *N. oleoabundans* y 6×10^6 células en el caso de *Chorella vulgaris*. Una vez de dispensar los cultivos a infectar en las placas estas se centrifugaron y se retiró el sobrenadante dejando un tapiz de células. En cada réplica a infectar se añadió 100 µl de cultivo de *Agrobacterium* cultivado según lo que se indica en el apartado anterior y se incubaron durante 48 horas a 25°C, en oscuridad.

3.1.4. Estudio de la expresión de los genes informadores GFP y GUS.

Transcurrido el tiempo de cocultivo las placas se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. Una vez de eliminar el sobrenadante las células se sometieron a tres lavados sucesivos con MBB con cefotaxima (500mg/l) y vancomicina (300mg/l) y se procedió al analizar la actividad de los genes informadores GFP y GUS.

La expresión del gen GFP se determinó por microscopia y para determinar la expresión GUS las infecciones previamente lavadas se resuspendieron en tres tipos de sustratos y se incubaron a 37°C durante toda la noche para su posterior análisis mediante microscopia. En los casos en los que se utilizó el reactivo FDglcU además de análisis microscópico las células se analizaron por citometría de flujo.

1. X-Gluc (cromogénico): Partiendo de un stock a 10mM en DMSO se utilizaron dos soluciones de 0.5 y 1mM de sustrato en el buffer 50mM NaH₂PO₄ (pH 7).
2. MUGlcU (fluorogénico): Partiendo de un stock a 10mM en DMSO se utilizó una solución a 2mM de sustrato en el buffer 50mM NaH₂PO₄ (pH 6,5).
3. FDglcU (fluorogénico): Se utilizó a la concentración de 1,5mM en 50%DMSO y 50% de H₂O (pH 9).

No se pudo observar la fluorescencia del gen GFP al microscopio, sin embargo la expresión del gen GUS se pudo observar con los tres sustratos utilizados en *Neochloris oleoabundans* (Figuras 2 y 3).

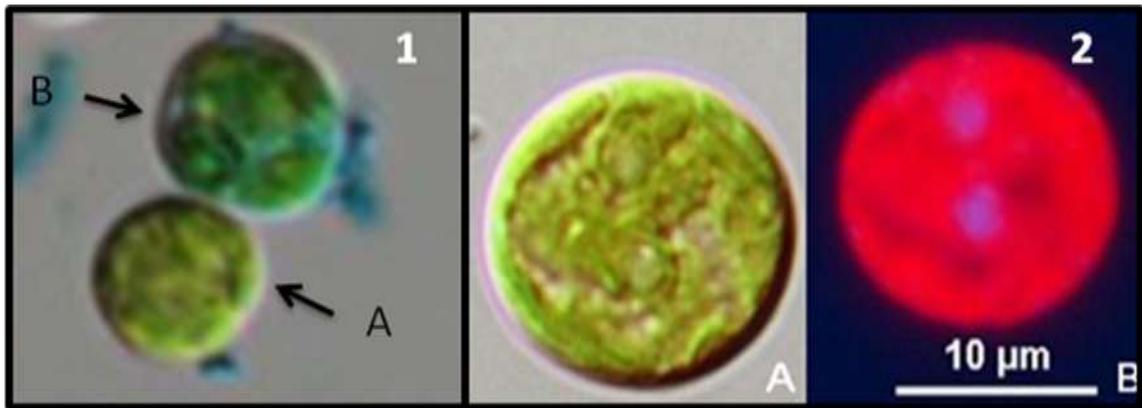


Figura 2: Células sin transformadas (A) y transformadas (B) observadas al al microscopio tras incubarlas con el sustrato X-Gluc (1) y MUGlcU (2).

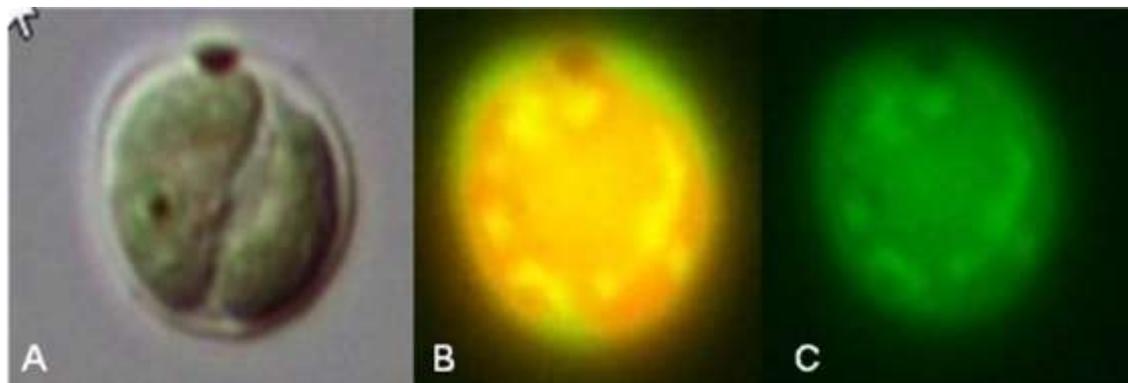


Figura 3: Imagen del microscopio de célula transformada de *N. oleoabundans* en campo claro (A) con el filtro Ex450/50 LP515 (B) y con el filtro Ex450/50 500/550 (C).

3.2. Identificación de enzimas implicadas en la ruta de oleogénesis de microalgas verdes y análisis de actividades enzimáticas durante el proceso de oleogénesis

Para aumentar la producción de lípidos a través de la mejora genética es indispensable comprender los procesos de síntesis de ácidos grasos y posterior acumulación de TAGs en el citoplasma de las especies oleaginosas, empezando por identificar que genes codifican enzimas claves en este proceso. Las enzimas implicadas directa o indirectamente en la síntesis de acetil-CoA y el poder reductor NADPH parecen ser los puntos clave sobre los que actuar si se pretende conseguir una mayor productividad de lípidos. La formación de acetil-CoA en microorganismos oleaginosos se le atribuye a la enzima ATP citrato liasa (ACL) aunque también se ha podido ver la actividad de esta enzima en microorganismos que no son capaces de acumular lípidos (Ratlidge, 2004). La enzima málica (EM), (que cataliza la descarboxilación de malato a piruvato generando poder reductor en forma de NADPH) también parece jugar un papel clave en el proceso de lipogénesis de microorganismos oleaginosos (Ratlidge & Wynn, 2002). Los resultados publicados de un completo trabajo de investigación llevado a cabo con hongos oleaginosos, en el que la sobreexpresión de la EM permitió obtener cepas que mostraron un aumento significativo del contenido final en lípidos con respecto a la cepa salvaje (Zhang *et al.*, 2007) confirman su implicación en la lipogénesis. En caso de las microalgas esta vía para la mejora de cepas no ha sido aún explotada a pesar de que los resultados obtenidos con hongos filamentos ofrecen una valiosa base para trabajar en esta dirección.

Es probable que además de la enzima málica existan vías alternativas para generar el NADPH necesario para la síntesis de lípidos. Un ejemplo de estas vías alternativas se ha podido ver en el alga *Chlorella protothecoides*, ya que en esta alga se ha observado la falta de actividad de la enzima málica y sin embargo demuestra una gran capacidad para acumular lípidos (Xiong et al, 2010). En esta alga parece que el NADPH necesario se genera sobre todo mediante la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato mediante la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) (Xiong et al, 2010). Una vez de disponer de los precursores para la síntesis de lípidos, la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC), es la que cataliza la primera reacción de la síntesis de ácidos grasos convirtiendo el acetil-CoA en malonil-CoA. A esta reacción le siguen una serie de reacciones de condensación, reducción, deshidratación y reducciones donde se emplea el NADPH para obtener finalmente los ácidos grasos.

El acumulamiento de TGAs puede ocurrir por la biosíntesis “de novo” por la vía del glicerol o por la conversión de lípidos polares en triglicéridos (Hu et al., 2008). En la vía de glicerol los acil-CoA que se producen en el cloroplasto se unen al glicerol-3-fosfato en la posición 1 y 2 para dar lugar ácido fosfatídico. Al defosforilar esta molécula se obtiene el diacilglicerol. Partiendo del diacilglicerol la enzima diacilglicerol acil transferasa (DGAT) cataliza la última reacción en la síntesis de triglicéridos donde una tercera molécula acil-CoA se une al diacilglicerol para formar triglicéridos. Esta reacción parece ser la clave en la síntesis “de novo” de TGAs. Dahlqvist et al. 2000 describieron un mecanismo distinto, donde los acyl-Coa que se unen al diacilglicerol provienen de los fosfolípidos. Esta reacción la cataliza la enzima fosfolipid:diacilglicerol aciltransferasa (PDAT). Este mecanismo puede jugar un papel muy importante en la regulación de la composición de lípidos de membrana en respuesta a factores medioambientales y de crecimiento (Hu et al., 2008). La ruta de síntesis de lípidos y los principales enzimas implicados en el proceso de almacenamiento de TGAs se muestran en la figura 1.

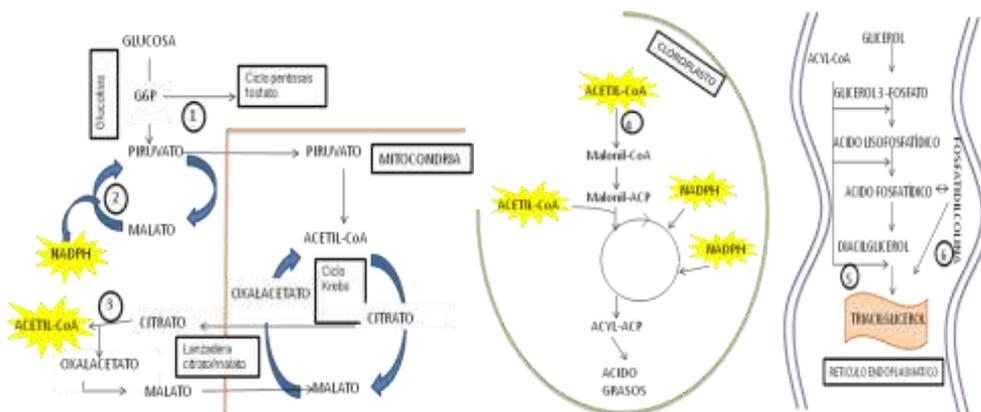


Figura 1. Esquema de las principales reacciones que garantizan el suministro continuo de Acetil-CoA y NADPH para la lipogénesis, la síntesis de ácidos grasos y la síntesis de triglicéridos. Enzimas: 1, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD); 2, enzima málica (ME); 3, ATP citrato liasa (ACL); 4, acetil-CoA carboxilasa (ACC); 5, diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) y 6, fosfolipid:diacilglicerol aciltransferasa (PDAT).

3.3. Identificación y aislamiento de genes que codifican enzima/s clave/s en el suministro de precursores a la ruta lipogénica en *C.vulgaris*.

3.3.1. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Para la extracción de RNA se utilizó un cultivo en fase de acumulación de lípidos de *C.vulgaris*. Se centrifugaron 5 ml de cultivo, el pellet se lavó dos veces con agua destilada para eliminar las sales y se congeló en nitrógeno líquido. Se procedió a la ruptura y la homogenización celular se realizó por abrasión mecánica, empleando un émbolo adaptado a la pared del tubo. La extracción de RNA se llevó a cabo empleando el kit comercial RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen). La concentración y la pureza del RNA obtenido se cuantificaron mediante espectrofotómetro NanoDrop 2000.

El cDNA se sintetizó a partir del RNA extraído empleando el kit comercial SuperScript VILO cDNA Síntesis (Invitrogen).

3.3.2. Diseño de cebadores y amplificación de los genes mediante PCR

Para amplificar la enzima málica en la microalga *C.vulgaris* se utilizaron los mismos cebadores que se diseñaron anteriormente para la amplificación de esta enzima en la microalga *Neochloris oleoabundans* y distintas cantidades de cDNA como molde con el fin de optimizar la reacción de amplificación. Como control positivo de amplificación se utilizó DNA de la microalga *Neochloris oleoabundans*. Los productos de PCR obtenidos se separaron en electroforesis en gel de agarosa mediante tinción con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).

Para la amplificación del resto de los genes se partió de secuencias previamente identificadas en otras especies de microalgas. Las secuencias se alinearon para determinar las zonas conservadas y los cebadores se diseñaron en estas zonas conservadas.

En el caso de obtener fragmentos del tamaño esperado, las bandas se cortaron y se purificaron con el kit comercial Nucleospin (Macherey-Nagel) para clonarlos en células competentes de *E.coli* mediante el kit comercial TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen). Tras seleccionar las colonias con el fragmento de interés mediante amplificación por PCR del fragmento, se extrajo el plásmido con el kit Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (Biorad) y se enviaron a secuenciar.

3.3.3. Análisis de las secuencias obtenidas

Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el programa Ridom TraceEdit (<http://www.ridom.de/traceedit/>), para localizar los extremos del fragmento amplificado, y a continuación se alinearon utilizando el programa ClustalW con otras secuencias de la base de datos.

Mediante esta forma se amplificaron los siguientes fragmentos de los genes clave en el suministro de precursores a la ruta lipogénica en *C.vulgaris*.

Gen	Cebadores	Tamaño (pb)
EM 1	ME-S1AF / ME-S2CR	226
EM 2	S2AECFor / S3BEMR	356
ACL	ACLsubB-For / ACLsubB-Rev	188
ACC	ACC-For2 / ACC-Rev2	400
G6PD	G6PDH-For 3 / G6PDH-Rev 3	387
DGAT	DGAT For3 / DGAT Rev3	270
NITRATO REDUCTASA (NR)	NR For /NR Rev	289
ACTINA (ACT)	ACT For 3 / ACT Rev 3	638
RUBISCO (RB)	RUB-For / RUB Rev	207

Bibliografía

Andersen, RA, 2005. Algal culturing techniques. 578pp, *Elsevier Academic Press*, London.

Dahlqvist A, stahl U, lenman M, Banas A, Lee M, Sandager I, Ronne H & Stymne S, 2000. Phospholipid. Diacylglycerol acyltransferase. An enzyme that catalyzes the acyl-Coa-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *PNAS* 97: 6487-6492.

Hu Q., Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A, 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54:621.

Ratledge C, Wynn JP, 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 51: 1- 51.

Ratledge C., 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86, 807-815.

Xiong W, Liu L, Wu C, Yang C, & Wu Q, 2010. ¹³ C-Tracer and Gas Chromatography-mass spectrometry Analyses Reveal Metabolic Flux Distribution in the Oleaginous Microalga *Chlorella protothecoides*. *Plant Physiology* 154 1001-1011.

Zhang Y, Adams IP, Ratledge C, 2007. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production?. Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5 fold increase in lipid accumulation. *Microbiology*, 153:2013-2025.

3. Información científica generada

Publicaciones Científicas Internacionales

- + Publicaciones Científicas Nacionales
- + Comunicaciones a Congresos, Reuniones, Simposios
- + Artículos de Divulgación
- + Monografías
- + Informes Técnicos

Los resultados generados se han presentado en la Tesis de Máster: Transformación genética de Neochloris oleoabundans S.Chantanachat & H.C. Bold mediada por A.tumefaciens de la Lic. Ziortza Ikarán. Defendida en 2011 en la Universidad del País vasco.

Secuencias bases de datos:

-Suarez-Alvarez,S., Urreta,I., Ikarán,Z. and Castanon,S. *Ettlia oleoabundans* strain UTEX 1185 18S ribosomal RNA gene . **NCBI DATA *SECQUENCE*** Enero 2013. JX978410

Comunicaciones en congresos:

Autores: Suarez, S; Ikarán, Z.; Castañón, S.

Título: Microalgae: genetic engineering approaches for lipid production and agrifood applications

Tipo de participación: Proceedings y posters

Congreso: 5th Internacional Meeting on Biotechnology/Biospain-Biotec 2010

Lugar celebración: Pamplona

Fecha: 2010

Autores: S. Suárez-Álvarez, Z. Ikarán, I. Urreta, I. Janices, S. Castañón de la Torre

Título: Multi-parameter flow cytometry as tool to monitor outdoor cultures of *Chlorella vulgaris* for oil productions

Tipo de participación: Proceedings y posters

Congreso: 6th Internacional Meeting on Biotechnology/Biospain-Biotec 2012

Lugar celebración: Bilbao

Fecha: 2012

Autores: Z. Ikarán S. Suárez-Álvarez and S. Castañón de la Torre

Título: Genetic transformation of the green microalga *Neochloris oleoabundans* by *Agrobacterium tumefaciens*

Tipo de participación: Proceedings y posters

Congreso: 6th Internacional Meeting on Biotechnology/Biospain-Biotec 2012

Lugar celebración: Bilbao

Fecha: 2012

4. Actividades de formación y transferencia realizadas

Se ha participado periódicamente en las reuniones del *Subgrupo de Trabajo con Microalgas*, dentro de la Plataforma Tecnológica Española de Biomasa (BIOPLAT). En estas reuniones se han establecido contactos con otros grupos que trabajan el cultivo de microalgas con fines energéticos y se tiene conocimiento acerca del interés de las empresas del sector biocarburantes en la producción de microalgas así como de los proyectos en los que están involucradas dichas empresas actualmente.

Además, se están desarrollando trabajos que conformarán la Tesis Doctoral de Ziortza Ikarán, becaria de Doctorado del DMAPTAP de Gobierno Vasco.

Respecto a la transferencia de resultados, los objetivos desarrollados en este trabajo han permitido establecer contactos con diferentes empresas y elaborar propuestas de proyectos donde se amplíe el alcance de los trabajos desarrollados en esta propuesta

5. Desviaciones con respecto a la memoria del proyecto

Incluir en este apartado sólo las relativas al plan de trabajo

Dado que los resultados obtenidos en el periodo anterior no fueron los esperados, y dada la importancia de conseguir el objetivo final, se ha continuado investigando en la puesta a punto del método de transformación, así como en el sistema de detección empleado.

Además, durante esta anualidad se han identificado y aislado genes implicados en el metabolismo lipídico, con el fin de que durante el año 2013, solicitado como prórroga de este proyecto se plantee la transformación genética empleando dichos genes.