



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Producción mixotrófica de ácido eicosapentaenoico (EPA) en cultivos de cepas
mutantes de *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 646

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

I.B.Q. Tomás García Beltrán

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Galindo Fentanes
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Alfredo Martínez Jiménez
[Instituto de Biotecnología](#)
Dr. Sergio Revah Moiseev
[Universidad Autónoma Metropolitana- Cuajimalpa](#)

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Septiembre de 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique Galindo Fentanes y la asesoría de la Dra. Tania Castillo Marengo. Durante la realización de este se contó con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). También se contó con el apoyo económico del proyecto P-9687 financiado por la empresa Fresenius Kabi GmbH.

Dedicatoria

A mis padres Antonia y Tomás, por su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos Karen, Vale y Toño, por siempre creer en mí, yo siempre los llevo en mi corazón.

A mis sobrinos Andy, Juanito y Ara. Esto es una pequeña muestra de que los sueños se vuelven realidad, los quiero mucho.

A mi familia, gracias por brindarme su apoyo emocional y por depositar su confianza en mis sueños.

A mis amigos de siempre: Edgar, Martin, Aarón, Dulce Miel, β-Tania, Emma, Zam, Zarco, Iván.

A mis amigos de Cuernavaca que ya no están en Cuernavaca: Esme, Vane, Anita, la Nahyeli, Óscar, Tanairí, Elsa, Kala.

A mis compis vecinos de GPR, en especial a Mariana, Miguel, Juan Carlos y Alberto.

A mis amigos de la maestría: Paco, Chava 🐶, Astrid 🐶, Diana, Marco, Ulises, y a todos mis compañeros de la maestría.

Agradecimientos

Al **Dr. Enrique Galindo Fentanes**, por permitirme formar parte de su grupo de investigación en estos últimos cuatro años, por su disponibilidad, tiempo y enseñanzas académicas. Gracias por todas las oportunidades que me ha brindado, por la confianza y por ser un excelente guía en mi camino.

A la **Dra. Tania Castillo Marengo**, por toda su asesoría, por su apoyo tanto académico, técnico y especialmente personal durante este proceso de formación. Gracias por siempre estar al tanto de mis avances, ser un guía, de apoyarme incondicionalmente y no dejar de creer en mí.

A la **Dra. Celia Flores Ocampo**, por su apoyo técnico en todas las áreas del laboratorio durante todo el proceso de la maestría y en especial durante la fase final de biología molecular de la misma. Le agradezco la confianza, su amistad y el apoyo moral cuando más lo necesite, sin duda las risas nunca faltaron.

A la **Biol. Elda Patricia Rueda Benítez**, por sus ideas, soporte, y apoyo técnico durante todo mi proceso de formación en la maestría. Por ser una excelente amiga estos últimos cinco años de mi vida que sin duda me han convertido en un mejor persona y profesional.

A mi paisano **IBQ. Alberto Porrás Sanjuanico**, por su apoyo técnico altamente especializado en todo el proyecto y en todos los equipos del laboratorio 10. Por guiarme en la preparación de mi examen de admisión, por siempre resolver mis dudas académicas en la maestría y lo más importante por ser un excelente amigo en Cuernavaca y Villagrán.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Dr. Sergio Revah Moiseev

por todas sus observaciones y efectivos comentarios, sin duda el haber elegido a especialistas en microalgas fue una excelente decisión.

A los miembros del jurado:

Dr. Daniel Genaro Segura González

Dr. Juan Carlos Sigala Alanís

Dra. María Luisa Villarreal Ortega

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Dr. Luis Caspeta Guadarrama

por todos los comentarios y aportaciones realizados durante la revisión final de este trabajo.

A la **Dra. Magdalena Brito Bazán**, por haber cambiado mi vida académica en los últimos cuatro años, por creer en mí y siempre apoyarme desde el inicio. Por haber iniciado este sueño desde mis tesis de licenciatura y que hoy culmina con una maestría en el IBT de la UNAM.

A la empresa **Fresenius Kabi** y al **Dr. Edmundo Brito de la Fuente**, por el apoyo económico y por creer en este proyecto desde el inicio de mi formación en el IBT.

A la recién **Dra. Liv Celin Krämer** y al **MC. Daniel Wasser** de la Universidad de Goethe (Frankfurt) por su apoyo en el proyecto de microalgas, intercambio de información y la valiosa donación de las cepas mutantes de *P. tricornutum*.

Al **QI. Diego Ramos Peralta**, por el apoyo técnico en el proyecto y en especial por las cinéticas en las épocas más críticas del COVID y en mi recuperación. Sin duda tu aporte facilitó mi trabajo, gracias, amigo.

Al grupo del Dr. Galindo, al laboratorio 10, muchas gracias, compañeros.

Índice general	Página
Resumen.....	1
Abstract	3
1. Introducción.....	5
2. Antecedentes.....	7
2.1 Ácidos grasos ω -3	7
2.2 Importancia y aplicaciones de los ácidos grasos EPA y DHA	8
2.3 Producción actual de EPA y DHA	9
2.4 Microalgas como fuente de EPA y/o DHA	10
2.4.1 Cepas productoras de DHA	10
2.4.2 Cepas productoras de EPA.....	11
2.5 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	13
2.5.1 Cepas mutantes de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 646 (HUP+ LK1 y LK2)15	15
2.6 Metabolismo de lípidos en las microalgas	15
2.6.1 Ruta de biosíntesis de ω -3.....	15
2.7 Cultivo de microalgas	18
2.7.1 Nutrición autotrófica.....	18
2.7.2 Nutrición heterotrófica	19
2.7.3 Nutrición mixotrófica	20
2.8 Parámetros de cultivo que afectan la producción de PUFAs	21
2.8.1 Limitación nutricional	21
2.8.2 Transferencia de masa.....	22
2.8.2.1 Oxígeno.....	24
2.8.2.2 Otras alternativas	24
3. Justificación	25

4. Hipótesis	26
5. Objetivos	26
5.1 Objetivo general.....	26
5.2 Objetivos específicos.....	26
6. Estrategia experimental	27
7. Material y métodos.....	29
7.1 Cepas.....	29
7.2 Medio de cultivo.....	29
7.3 Sistema de cultivo.....	30
7.4 Cultivos en matraces agitados	31
7.5 Cultivos lote en biorreactor	32
7.5.1 Medición del coeficiente de transferencia de oxígeno (kLa)	33
7.6 Métodos analíticos.....	34
7.6.1 Recuento celular (cámara de Neubauer).....	34
7.6.2 Cuantificación gravimétrica de biomasa	34
7.6.3 Cuantificación de glucosa	35
7.6.4 Lípidos totales.....	35
7.6.5 Cuantificación de ácidos grasos mediante cromatografía de gases.....	35
7.6.6 Análisis de transcripción mediante PCR en tiempo real.....	36
7.6.7 Análisis estadístico.....	37
8. Resultados y discusión	38
8.1 Cinéticas de crecimiento en condiciones de mixotrofia, selección de cepa mutante y producción de EPA.....	38
8.2 Evaluación en cultivo lote en biorreactor de 1 L	43
8.2.1 Efecto de la transferencia de oxígeno en la cepa mutante LK1	43
8.2.2 Expresión génica en la cepa mutante LK1	49
8.2.3 Efecto de la transferencia de oxígeno en la cepa silvestre	51

8.2.4	Expresión génica en la cepa silvestre.....	56
8.2.5	Comparación global de parámetros obtenidos en los cultivos de <i>P. tricornutum</i> a diferentes transferencias de oxígeno	58
9.	Conclusiones.....	61
	Bibliografía	62
	Anexos.....	74

Índice de figuras	Página
Figura 2.1. Estructura química de (A) EPA: Ácido eicosapentaenoico (20:5 ^{Δ5,8,11,14,17}) y (B) DHA: Ácido docosahexaenoico (22:6 ^{Δ4,7,10,13,16,19}). Adaptado de Moreno et al., 2012.	7
Figura 2.2 Micografía <i>P. tricornutum</i> UTEX 646 100X	13
Figura 2.3 La síntesis de ácidos grasos y ω-3 en <i>P. tricornutum</i> . La síntesis de estos ácidos grasos inicia con la conversión del acetil-CoA a malonil-CoA en el cloroplasto. En este organelo son sintetizados los ácidos grasos de cadena corta (C16-18) por la sintasa de ácidos grasos. Los ácidos grasos de cadena larga son extendidos por las elongasas (ELO) en el citosol. Los PUFAs de cadena corta son desaturados (FADs, por sus siglas en inglés fatty acid desaturases) en el cloroplasto y los de cadena larga (EPA, DHA) en el retículo endoplásmico (ER). Adaptado de Domergue et al., (2002) y Guschina & Harwood, (2006).....	17
Figura 6.1 Estrategia experimental desarrollada para el estudio del crecimiento y producción de EPA en cepas de <i>P. tricornutum</i> (Pt) UTEX 646 y las cepas mutantes LK1 y LK2.....	28
Figura 7.1. Imágenes del equipo diseñado para la realización de los cultivos en condiciones de mixotrofia de este trabajo: i) sistema biorreactor 3 L, ii) sistema biorreactor 1 L, iii) sistema agitación orbital matraces.	31
Figura 7.2. a) Biorreactor Duran (GL45) de 1L, integrado con agitador magnético de ancla (0-500 rpm); b) Esquema dimensión del biorreactor.	32
Figura 7.3 Biorreactor GL45.....	34
Figura 8.1 Cinética de crecimiento celular en condiciones de mixotrofia: medio ASP; volumen 50 mL; temperatura: 20 °C; pH: 7.7; 100 rpm; 30 μmol fotón m ⁻² s ⁻¹ ; 16 h luz-8 h oscuridad; 1 g L ⁻¹ glucosa; Wt (●); LK1(▲); LK2(■).	38
Figura 8.2 a) Perfil de ácidos grasos de <i>P. tricornutum</i> en cultivos mixotróficos evaluados al punto final de la cinética. En la figura se muestra el promedio de las mediciones, n=3. b) Porcentaje de ácidos grasos en términos de su clasificación.	41
Figura 8.3 Contenido de ácidos grasos de <i>P. tricornutum</i> en cultivos mixotróficos evaluados al punto final de la cinética. En la figura se muestra el promedio de las mediciones, n=3.	42

Figura 8.4 A) Cinética de crecimiento <i>P. tricornutum</i> UTEX 646 y B) glucosa; medio ASP; volumen 750 mL; temperatura: 20 °C; pH: 7.7; 16 h luz-8 h oscuridad; cepa mutante LK1 (■) $k_{La}=66\text{ h}^{-1}$; (■) 122.	44
Figura 8.5 Contenido de ácidos grasos ($\text{mg g}_{\text{bio}}^{-1}$) en la cepa mutante LK1 (■) $k_{La}=66\text{ h}^{-1}$; (■) 122 h^{-1}	46
Figura 8.6 Expresión relativa de <i>acc1</i> , <i>ptd5</i> , <i>me1</i> y <i>hup</i> en fase estacionaria en los cultivos de la cepa mutante LK1 en baja (■) y alta (■) transferencia de oxígeno. El análisis de la transcripción génica se realizó empleando al gen <i>tbh</i> como gen de referencia. Los datos están normalizados a la condición de baja transferencia de oxígeno.	51
Figura 8.7 A) Cinética de crecimiento <i>P. tricornutum</i> UTEX 646 y B) concentración de glucosa; medio ASP; volumen 750 mL; temperatura: 20 °C; pH: 7.7; 16 h luz-8 h oscuridad; cepa silvestre (■) $k_{La}=66\text{ h}^{-1}$; (■) 122 h^{-1}	52
Figura 8.8 Contenido de ácidos grasos ($\text{mg g}_{\text{bio}}^{-1}$) en la cepa silvestre (■) $k_{La}=66\text{ h}^{-1}$; (■) 122 h^{-1}	54
Figura 8.9 Expresión relativa de <i>acc1</i> , <i>ptd5</i> y <i>me1</i> en fase estacionaria en los cultivos de la cepa silvestre en baja (■) y alta (■) transferencia de oxígeno. El análisis de la transcripción génica se realizó empleando al gen <i>tbh</i> como gen constitutivo.	56
Figura A.1 Correlación de valoración con tiosulfato de sodio versus tiempo en la condición de (●) baja y (●) alta transferencia de oxígeno.	76

Índice de tablas

Página

Tabla 2.1. Ácidos grasos polinsaturados ω -3. Adaptado de Ward & Singh, (2005).	7
Tabla 2.2. Principales estudios sobre el efecto positivo de EPA y DHA en el tratamiento de enfermedades relacionadas al sistema cardiovascular. Adaptado de Kris-Etherton et al., (2019).	8
Tabla 2.3. Producción de ω -3 mediante diversas fuentes. Tabla adaptada de Finco et al., (2017).	9
Tabla 2.4 Resumen de investigaciones enfocadas en la producción industrial de DHA y EPA. Tabla adaptada de Ward & Singh, (2005).	11
Tabla 2.5. Principales investigaciones enfocadas en la producción de EPA, empleando cepas de <i>P. tricornutum</i> como modelo de estudio.	14
Tabla 7.1 Cepas donadas por la Universidad de Frankfurt	29
Tabla 7.2 Composición del medio ASP, soluciones stock.	30

Tabla 7.3 Solución Eisen III, en 100 mL de agua Milli-Q	30
Tabla 7.4 Soluciones de micronutrientes A y B, en 95 mL de agua Milli-Q.....	30
Tabla 7.5. Oligonucleótidos utilizados para los análisis de PCR en tiempo real.....	37
Tabla 8.1 Resumen de parámetros cinéticos y de producción de lípidos bajo condiciones de mixotrofia.	40
Tabla 8.2 Producción y productividad de EPA en cultivos de <i>P. tricornutum</i>	43
Tabla 8.3 Comparación de la velocidad específica de crecimiento y los parámetros de producción en la cepa LK1 a nivel biorreactor de 1 L.	46
Tabla 8.4 Contenido, producción y productividad de FAMES y EPA en cultivos de <i>P. tricornutum</i> LK1.	48
Tabla 8.5 Comparación de la velocidad específica de crecimiento y parámetros de producción en la cepa silvestre a nivel biorreactor 1 L.....	53
Tabla 8.6 Contenido, producción y productividad de FAMES y EPA en cultivos de <i>P. tricornutum</i> UTEX 646 Wt.	56
Tabla 8.7 Comparación global de la cepa mutante LK1 y la cepa silvestre a diferentes transferencias de oxígeno.....	59
Tabla A.1 Valores estimados del coeficiente global de transferencia de oxígeno.	76
Tabla A.2 Contenido de ácidos grasos [µg] por mg de biomasa seca analizado en el cultivo mixotrófico en matraces agitados a las 288 h.	77
Tabla A.3 Contenido de ácidos grasos [µg] por mg de biomasa seca analizado en el cultivo mixotrófico en cultivos de la cepa mutante LK1 en el biorreactor de 1L a las 288 h..	78
Tabla A.4 Contenido de ácidos grasos [µg] por mg de biomasa seca analizado en el cultivo mixotrófico en cultivos de la cepa silvestre UTEX 646 en el biorreactor de 1L a las 288 h.....	78

Resumen

Los ácidos grasos ω -3, entre los cuales destacan el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω -3) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω -3), tienen diversas propiedades benéficas para la salud. Por sus propiedades, estos ácidos ω -3 y sus derivados se han empleado como nutracéuticos. Las microalgas de la clase Bacillariophyceae (diatomeas), son uno de los principales organismos productores de ω -3. *Phaeodactylum tricornutum*, perteneciente al grupo de microalgas anteriormente mencionado, ha cobrado una mayor relevancia en los últimos años como plataforma para la producción de EPA.

En el desarrollo de procesos con microalgas las funciones objetivo han sido enfocadas en la optimización de la productividad de biomasa, y por ende de los metabolitos de interés. Las principales variables estudiadas en *P. tricornutum* para la producción de ácidos grasos son las siguientes: luz, nutrientes, temperatura, modalidad de cultivo (mixotrofia y heterotrofia) y niveles de CO₂. Debido al gran impacto que tienen sobre los procesos aerobios, la transferencia de oxígeno en biorreactores ha sido ampliamente estudiada en otros sistemas biológicos, siendo el coeficiente global de transferencia de oxígeno (k_La) una variable de proceso que engloba los efectos de la aireación y del mezclado, es un parámetro ampliamente empleado como criterio de escalamiento.

En este trabajo se examinó la influencia de la transferencia de oxígeno (k_La) en cultivos mixotróficos sobre la producción de biomasa, de lípidos, ácidos grasos y de EPA en la cepa *P. tricornutum* UTEX 646 y en una cepa mutante (*HUP+*). Asimismo, se estudió el efecto del k_La sobre la expresión de los genes *acc1*, *me1*, *ptd5* y *hup1* que codifican para las enzimas acetil-CoA carboxilasa, malonato deshidrogenasa, Δ 5-desaturasa y para el transportador de glucosa HUP+ (cepa mutante) respectivamente. Los resultados demostraron un importante efecto del k_La sobre la producción de biomasa y la producción volumétrica de EPA. En la cepa mutante LK1, los mejores resultados se obtuvieron en condiciones de baja transferencia de oxígeno (66 h⁻¹) con una producción volumétrica de 26.6 ± 2.3 mg_{EPA} L⁻¹ comparado con la condición de mayor transferencia. Estos resultados contrastan con los obtenidos con la cepa silvestre (UTEX 646), en donde la mayor producción de EPA se logró bajo condiciones de alta transferencia de oxígeno (122 h⁻¹) con un título de 21.4 ± 5.6 mg_{EPA} L⁻¹ comparado con la condición de menor transferencia. En ambos casos, la mayor producción de EPA estuvo asociada a una mayor producción de biomasa.

En *P. tricornutum* en lo que se refiere a la expresión de los genes: *acc1*, *me1*, y *ptd5*, se observó que los cambios en el k_La tuvieron un efecto importante en los niveles de transcritos ligados al contenido de ácidos grasos y de lípidos totales en las dos cepas evaluadas.

El conocimiento generado permitió seleccionar a la cepa mutante LK1 (*HUP+*), en una condición de baja transferencia de oxígeno (66 h^{-1}) como la mejor opción para lograr un mayor porcentaje de EPA en la mezcla total de ácidos grasos, así como para aumentar la síntesis de otros ácidos grasos insaturados (respecto a la cepa silvestre), además de requerir una menor cantidad de energía al disminuir los requerimientos de potencia del proceso.

Abstract

Omega-3 (ω -3) fatty acids, especially docosahexaenoic acid (DHA 22:6(ω -3)) and eicosapentaenoic acid (EPA 20:5(ω -3)), have been associated to several health benefits. Therefore, omega-3 and their derivatives are important nutraceutical and pharmaceutical targets. Microalgae belonging to the class Bacillariophyceae (diatoms), are one of the main organisms that produce ω -3. *Phaeodactylum tricornutum* (belongs to that group) is a prominent candidate and has been investigated in the last years as a biofactory for ω -3 fatty acids focusing on EPA production.

In general, the development of processes based on algae has been focused to the increase in the biomass productivity and at the same time maximizing the yield of the high-value products. Commonly, the growth and the lipid content of diatoms are influenced by environmental factors, e.g. light, nutrients, temperature, culture mode (mixotrophic and heterotrophic mode) and CO₂ levels. Oxygen mass transfer coefficient (k_{La}) is an important variable in aerobic process in biological systems that incorporate mixing and aeration and has been studied for several years for scaling-up process.

In this work, we studied two levels of oxygen transfer (k_{La}) in mixotrophic cultures of *P. tricornutum* UTEX 646 and one transformant: *HUP+* (LK1), in terms of the production of biomass, lipids, fatty acids, and EPA. At the same time, we conducted a study of the expression of some important genes: *acc1*, *me1*, *ptd5*, and *hup1*, that encode for the enzymes: acetyl-CoA carboxylase, malonate dehydrogenase, Δ 5-desaturase and for the glucose transporter HUP+, respectively. In the mutant LK1, we obtained the best results under the low-oxygen mass transfer condition (66 h⁻¹) with a yield of 26.6 \pm 2.3 mg_{EPA} L⁻¹. In contrast, in the case of the wild-type strain (UTEX 646), the best results (21.4 \pm 5.6 mg_{EPA} L⁻¹) were obtained under the high-oxygen mass transfer condition (122 h⁻¹). In both cases, the highest EPA production was associated with the highest biomass production.

Regarding the expression of genes related to lipid metabolism (*acc1*, *me1* and *ptd5*), these showed important differences in transcripts levels under the two conditions of mass transfer, in the case of the mutant LK1, the normalized values of the transcripts were 5 times higher (even more in the case of *hup1* gene) in the high-oxygen mass transfer condition. in the case of the wild-type strain the transcripts levels were 0.5 times higher in low-oxygen mass transfer. We observed a possible relationship between the increase in

the total content of fatty acids and a higher transcripts level in the mutant LK1 in high-oxygen mass transfer and the rise in total lipids and the higher transcripts levels in the wild-type in low-oxygen mass transfer.

Based in our results, we selected the mutant strain LK1 (HUP+), under low oxygen mass transfer (66 h^{-1}) as the best option to obtain the highest percentage of EPA in the mixture of the total fatty acids. Also, the mutant strain showed a higher biosynthesis of unsaturated fatty acids, as compared to the wild type. The low oxygen mass transfer condition is also an advantage, as it implies a low power consumption in the culture process.

1. Introducción

El ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6) son ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés *polyunsaturated fatty acids*) pertenecientes a la familia ω -3, y a su vez pueden ser clasificados como ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs, por sus siglas en inglés *highly unsaturated fatty acids*) los cuales poseen 20 o más átomos de carbono y tres o más dobles enlaces. Estos desempeñan un papel de gran importancia en el mantenimiento y funcionamiento del sistema cardiovascular, así como de la retina y el cerebro (Sang et al., 2012). Estos ácidos grasos no son sintetizados en el humano, por lo que la fuente tradicional de PUFAs, proviene de una dieta rica en aceite de pescado. Sin embargo, los peces no son productores de PUFAs, ya que los acumulan a partir de su dieta. Además, las reservas de pescado han disminuido debido al aumento de la sobreexplotación pesquera, y presentan problemas relacionados con la acumulación de contaminantes liposolubles como metil mercurio, bifenilos policlorados (PCBs, por sus siglas en inglés *polychlorinated biphenyls*) y otras toxinas que han dificultado la purificación y los costos del proceso de obtención de estos ácidos grasos (Castilla-Casadiego et al., 2016).

Las microalgas pertenecientes al grupo de las diatomeas son microorganismos fotosintéticos que cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo la síntesis de EPA y DHA, siendo los productores primarios de estos metabolitos. Actualmente, la búsqueda de estrategias de cultivos que logren maximizar su producción se encuentra en proceso. La microalga *Phaeodactylum tricornutum* es un microorganismo que pertenece a la clase Bacillariophyceae, y es conocida por presentar una alta tasa de crecimiento y un elevado porcentaje de lípidos, especialmente de ácidos grasos ω -3, principalmente EPA (~ 35 % TFA), pero solo trazas de DHA (Yongmanitchai & Ward, 1991; Hamilton et al., 2014). Estas propiedades vuelven a esta especie atractiva para la producción industrial de EPA. Cabe mencionar que se cuenta con el genoma secuenciado de esta diatomea, lo que ha facilitado conocer en términos moleculares y bioquímicos los procesos involucrados en la biosíntesis de lípidos, lo cual podría emplearse como una herramienta para el diseño de estrategias de cultivo y de ingeniería metabólica para incrementar la productividad de EPA y DHA (Mühlroth et al., 2013).

Por lo anterior, en este proyecto se analizaron las condiciones de cultivo que permitan incrementar la acumulación de EPA en dos cepas mutantes de *P. tricornutum* en cultivos mixotróficos mediante la manipulación de la disponibilidad de oxígeno. El desarrollo de este proyecto fue posible gracias a la donación de las cepas mutantes (*HUP+*) LK1 y LK2, a través de la colaboración de la universidad de Goethe (Frankfurt), las cuales mediante expresión heteróloga del gen *hup1* de la microalga *Chlorella kessleri* que codifica para el transportador de glucosa *HUP+* y por ende de incrementar la velocidad de internalización de glucosa en el citoplasma, la cual es utilizada para desarrollar cultivos en nutrición mixotrófica (Kramer, 2022). Respecto a la transferencia de oxígeno (k_{La}) en el sistema de cultivo de microalgas, se ha reportado por Shi et al., (2017) la importancia del oxígeno en la biosíntesis de PUFAs (ω -3) que tiene lugar en el retículo endoplásmico, durante la formación de los dobles enlaces de estos ácidos grasos (Shi et al., 2017). En general, un mayor suministro de oxígeno incrementa el crecimiento celular y el contenido de ácidos grasos saturados pero obstruye la biosíntesis de PUFAs (Sun et al., 2018). Los resultados obtenidos permitieron generar información necesaria para realizar procesos de escalamiento.

2. Antecedentes

2.1 Ácidos grasos ω -3

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) ω -3 son compuestos hidrocarbonados de 18 o más carbonos, los cuales poseen más de un doble enlace entre los carbonos adyacentes, y un grupo carboxilo terminal. Los ácidos grasos denominados ω -3 presentan su primer doble enlace entre el tercer y cuarto carbono del extremo metilo terminal. En la Tabla 2.1, se enlistan los principales ácidos grasos ω -3, ordenados por número de carbonos e insaturaciones; también se describe su fuente de obtención (Ward & Singh, 2005).

Tabla 2.1. Ácidos grasos poliinsaturados ω -3. Adaptado de Ward & Singh, (2005).

Nombre	Nomenclatura	Fuente de obtención
Ácido α -linolénico	ALA (C18:3)	Nueces, linaza, soya, canola.
Ácido eicosapentaenoico	EPA (C20:5)	Aceite de pescado, microalgas.
Ácido docosapentaenoico	DPA (C22:5)	Aceite de pescado, microalgas.
Ácido docosahexaenoico	DHA (C22:6)	Aceite de pescado, microalgas.

Dentro de este grupo de ácidos grasos ω -3, destacan el ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5) y docosahexaenoico (DHA; C22:6) por su amplia gama de aplicaciones y estudios que han demostrado efectos positivos sobre la salud, como se describirá en la sección 2.2. En la Figura 2.1. se presenta la estructura química de EPA y DHA, los cuales son de interés comercial (Ward & Singh, 2005).

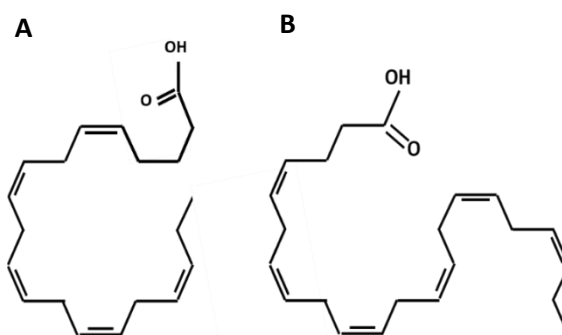


Figura 2.1. Estructura química de (A) EPA: Ácido eicosapentaenoico ($20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$) y (B) DHA: Ácido docosahexaenoico ($22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$). Adaptado de Moreno et al., 2012.

2.2 Importancia y aplicaciones de los ácidos grasos EPA y DHA

En humanos, la síntesis de EPA y DHA se inicia a partir del ácido alfa-linolénico (ALA), el cual se obtiene a través de la dieta. Sin embargo, la velocidad de desaturación/elongación es demasiado lenta y dependiente de la edad y género. Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera crítico el consumo de ω -3 en porcentajes del 6-11 %, y de EPA/DHA entre 0.5-2 % (~500 mg día⁻¹) de la ingesta diaria de alimentos (Stark et al., 2016). Se han realizado diversos estudios en el ser humano con el objetivo de entender el papel de estos ácidos grasos ω -3. Ello debido a que se sabe que son necesarios para el mantenimiento de las membranas celulares, el funcionamiento del cerebro y la división celular (Gogus & Smith, 2010). Adicionalmente, se ha reportado que estos ácidos grasos ω -3 son precursores de la biosíntesis de eicosanoides y leucotrienos que participan como moléculas señalizadoras que desencadenan efectos fisiológicos y bioquímicos relacionados a los procesos antiinflamatorios principalmente asociados a la inhibición de citoquinas TNF- α , IL-6, y IL-8; y que podrían ayudar principalmente en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Tabla 2.2; Funk, 2001; Simopoulos, 2002; Cottin et al., 2011; Pinazo-Duran & Boscá-Gomar, 2012; Kris-Etherton et al., 2019).

Tabla 2.2. Principales estudios sobre el efecto positivo de EPA y DHA en el tratamiento de enfermedades relacionadas al sistema cardiovascular. Adaptado de Kris-Etherton et al., (2019).

Estudio (Años de seguimiento)	País	Dosis EPA+DHA (mg/ día)	Muestra/ Condiciones	Hallazgos	Referencia
ASCEND* (7.4)	U.K.	840	15, 480/ pacientes con diabetes tipo 2	Reducción de la tasa de mortalidad en un 19 % por ataque al corazón; 25 % de reducción de eventos cardiovasculares mayores (dosis 4 g _{EPA} día ⁻¹).	Bowman et al., 2018.
VITAL* (5.3)	U.S.A.	840	25, 871/ adultos mayores sin enfermedades cardiovasculares	Reducción del 28 % en el riesgo de paro cardíaco; 50 % de reducción de ataque fatal al corazón; 17 % de reducción de riesgo de ataque al corazón por enfermedad coronaria.	Manson et al., 2019.
REDUCE-IT* (4.9)	11 países	3,600 (solo EPA)	8,179/ Pacientes con niveles medianos de triglicéridos 216 mg dL ⁻¹ .	Reducción del 26 % en eventos cardiovasculares en el tratamiento médico para pacientes con hipertrigliceridemia.	Bhatt et al., 2018.

*Nomenclatura de la tabla: Ascend: *A study of cardiovascular events in diabetes*; VITAL: *the vitamin D and omega-3 trial*; REDUCE-IT: *Reduction of cardiovascular events with icosapent ethyl-intervention trial*.

2.3 Producción actual de EPA y DHA

La creciente demanda de aceite de pescado a nivel mundial (~ 900,000 toneladas anuales) tiene un importante impacto en el ambiente, principalmente por el incremento en el consumo de recursos naturales y espacio (Finco et al., 2017). Sin embargo, el principal problema de obtención de ω -3 es la baja sustentabilidad del proceso ya que los peces solo acumulan estos ácidos grasos ω -3, lo cual ha generado una disminución (al punto de extinción) de algunas especies de peces, lo que podría eventualmente crear un desbalance entre las especies y tener un severo impacto en la biodiversidad (Kitessa et al., 2014). Por consiguiente, se han incrementado los esfuerzos para producir estos lípidos a escala industrial empleando microorganismos oleaginosos, los cuales son definidos como aquellos con la capacidad de producir y almacenar lípidos en un alto porcentaje (30-70%) en condiciones de limitación nutricional, entre estos se encuentran algunas bacterias, hongos y principalmente, microalgas (Pal et al., 2019). Las microalgas presentan ventajas para lograr posicionarse como una alternativa para la producción de ω -3, ya que poseen la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo la biosíntesis de ω -3 y de HUFAs (cadena extralarga) (Mühlroth et al., 2013). Por otro lado, también se encuentran las plantas que han sido modificadas genéticamente con el objetivo de alcanzar altos niveles de EPA y DHA (Adarme-Vega et al., 2014). Sin embargo, a pesar de que las plantas genéticamente modificadas (GM) ya son una alternativa para la producción de ácidos grasos ω -3 para consumo humano, sus niveles de DHA/EPA son menores en comparación con los de los microorganismos oleaginosos. Como se muestra en la Tabla 2.3, la producción de aceite y los porcentajes de ω -3 presentes en el aceite vegetal en plantas de *Camelina sativa* GM es menor en un 41 % y 83 % respecto a lo producido por la microalga *Schizochytrium* sp.

Tabla 2.3. Producción de ω -3 mediante diversas fuentes. Tabla adaptada de Finco et al., (2017).

Parámetro	Aceite vegetal <i>Camelina sativa</i> GM	Aceite microbiano <i>Schizochytrium</i> sp.
Biomasa (kg)	1000	1000
Aceite (kg)	350	600
ω -3 (kg)	49	300
ω -3 PUFA (% TFA)	14	50

Por estas razones, la producción de ω -3 mediante microorganismos, específicamente microalgas, puede proveer niveles sustentables de EPA y/o DHA, antes que otros microorganismos con mayores tasas de crecimiento, y a través de la ingeniería genética logren establecerse en el mercado. Thiyagarajan et al., (2020) reportó en *E. coli* la producción de EPA a través de la expresión heteróloga del gen $\Delta 5des-iso$ que codifica para la enzima $\Delta 5$ desaturasa de la microalga *Isochrysis* sp. obteniendo resultados interesantes de producción de EPA. No obstante, la producción específica de EPA en *E. coli* se encuentra muy por debajo (4 veces menos) respecto a la de *Isochrysis* sp. de forma nativa.

2.4 Microalgas como fuente de EPA y/o DHA

Las microalgas, como microorganismos oleaginosos, han sido estudiadas como fuentes potenciales para la producción de EPA/DHA. Existe una amplia variedad de especies con gran versatilidad metabólica y con la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar EPA y/o DHA (Kelly et al., 1959; Kendrick & Ratledge, 1992).

2.4.1 Cepas productoras de DHA

En las últimas dos décadas se han evaluado diversas especies con la capacidad de producir DHA (Singh & Ward, 1997). Dentro de estas, dos de ellas se han establecido en el mercado para su comercialización industrial (Barclay et al., 1994). Kyle et al. en 1992, empleando cultivos heterótrofos de la cepa *Cryptothecodinium cohnii* en lote alimentado con glucosa, con tiempos de cultivo superiores a las 400 h, reportaron productividades de 1-1.5 g_{DHA} L⁻¹día⁻¹. Por otra parte, Bailey et al. en el 2003 mediante el uso de estrategias de limitación de oxígeno en la cepa de *Schizochytrium limacinum* perteneciente a la familia Thraustochytriaceae, reportaron una productividad de aproximadamente 10 g_{DHA} L⁻¹ día⁻¹, en un tiempo menor de cultivo (90-100 h) en comparación de *C. cohnii*. En la Tabla 2.4 se muestran la producción de biomasa y DHA de estas cepas, en donde además se incluye el estudio realizado por Bajpai et al. (1991) con la cepa *Thraustochytrium aureum*, la cual destaca por su alto porcentaje de DHA en la composición total de sus ácidos grasos (>50 %) y mayor en comparación de las cepas *S. limacinum* y *C. cohnii* con un 38 % y 29 %, respectivamente. Sin embargo, la productividad de DHA reportada para esta cepa fue menor en comparación con las primeras dos cepas mencionadas.

Tabla 2.4 Resumen de investigaciones enfocadas en la producción industrial de DHA y EPA. Tabla adaptada de Ward & Singh, (2005).

Microorganismo	Biomasa (g L ⁻¹)	DHA			Productividad (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	Referencia
		mg L ⁻¹	%/Biomasa	%/TFA		
<i>T. aureum</i>	4.9	510	10.4	57	90	Bajpai et al., 1991
<i>C. cohnii</i>	20-40	2000	5.7	35	500	Kyle, 1992
<i>Schizochytrium</i>	20	4000	20	40	1000	Bailey et al., 2003
Microorganismo	Biomasa (g L ⁻¹)	EPA			Productividad (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	Referencia
		mg L ⁻¹	%/Biomasa	%/TFA		
<i>N. alba</i>	40-50	500	3.0	4.0	100	Boswell et al., 1992
<i>N. laevis</i>	22.1	700	1.4	19.4	30	Wen & Chen, 2003
<i>P. tricornutum</i>	4-6	700	3.3	28-35	25	Yongmanitchai & Ward, 1991

2.4.2 Cepas productoras de EPA

Dentro de las especies productoras de EPA se encuentran las diatomeas pertenecientes a la clase Bacillariophyceae, ampliamente distribuidas tanto en hábitats marinos como de agua dulce, y que contienen entre un 15-30 % de EPA en la mezcla total de ácidos grasos.

En esta clase de microalgas se encuentran *Nitzschia alba* y *Nitzschia laevis* (diatomeas marinas) que inclusive cuenta con la capacidad de crecer bajo condiciones de heterotrofia y producir grandes cantidades de EPA (35.08 mg_{EPA} L⁻¹; Wen & Chen, 2000). En la Tabla 2.4 se muestra un resumen de las principales especies productoras de EPA y sus principales parámetros de producción de este ácido graso. Boswell et al. en 1992, realizaron un estudio con la cepa *N. alba* en cultivo en lote alimentado con glucosa,

obteniendo una concentración de biomasa de 40-50 g L⁻¹ (~40 % lípidos) en 100 h de cultivo y una producción de 1.25 g L⁻¹ de EPA. Sin embargo, la fracción de EPA en la mezcla lipídica fue solo del 4 %, por lo que, a pesar de ser una buena cepa en términos de obtención de biomasa, no lo es respecto al contenido de EPA. Wen y Chen en el 2003, empleando a la cepa de *N. laevis* en condiciones de heterotrofia en cultivo en lote alimentado con glucosa, obtuvieron cultivos de alta concentración celular y una productividad de 73 mg L⁻¹ día⁻¹ de EPA en 14 días de cultivo, además de obtener un mayor porcentaje de EPA en la mezcla lipídica, respecto a la cepa de *N. alba*. El problema de *N. laevis* reside en las condiciones de optimización para maximizar la concentración de EPA a través de la limitación nutricional con la fuente de nitrógeno, condiciones donde existe una mayor producción de metabolitos que causan un efecto nocivo a las células, reduciendo la productividad de EPA a solo 30 mg L⁻¹ día⁻¹, menor a lo alcanzado por *N. alba* (Ward & Singh, 2005).

Por último, en la Tabla 2.4 también se muestran los parámetros de producción de la especie *Phaeodactylum tricornutum*, la cual puede alcanzar un porcentaje de EPA en peso seco entre 2.6 y 3.1 % y una producción de 235 ± 68 mg_{EPA} L⁻¹, correspondiente a un 30 % en el porcentaje total de ácidos grasos (Yongmanitchai & Ward, 1991). Es decir, un 40 y 90 % mayor que en *N. laevis* y *N. alba*, respectivamente, convirtiéndose en la principal especie de estudio para la obtención de EPA en la última década (Steinrücken et al., 2018). No obstante, la productividad de EPA de la cepa de *P. tricornutum* en cultivos continuos autótrofos ha sido limitada (<100 mg_{EPA} L⁻¹día⁻¹) por lo que en términos comerciales, en la actualidad no es una opción viable para su comercialización industrial. Es por ello por lo que las condiciones de cultivo y la modificación genética de las cepas se han vuelto herramientas indispensables para maximizar la producción de EPA.

Hasta hace poco, la producción de aceite de algas rico en EPA se había restringido a escala de laboratorio. En el año 2011, la empresa Aurora Algae, dedicada a la producción de biodiesel, emprendió la comercialización de A2 EPA Pure™ con un porcentaje de EPA mayor al 65 % del total de los ácidos grasos; sin embargo, un reporte (Lane, 2015), indica que esta empresa entró en crisis económica; y de ahí la importancia en la búsqueda y exploración de condiciones de cultivo como nicho de oportunidad en procesos biotecnológicos en diversas especies de microalgas productoras de EPA que logren superar o alcanzar el porcentaje de EPA en el proceso de obtención y purificación reportado por Aurora Algae con la microalga *Nannochloropsis* sp. Es importante resaltar la

ausencia de procesos de producción de EPA como componente principal de la mezcla de ácidos grasos totales (Winwood, 2013).

2.5 *Phaeodactylum tricornutum*

P. tricornutum, es una diatomea que posee una frústula atípica pues su estructura y composición carecen de silicato (Fig. 2.2). Esta variación, en comparación con otras diatomeas, hace que esta especie no necesite silicio en el medio para crecer, disminuyendo los costos en la formulación del medio. Se han descrito múltiples morfologías: fusiforme, triadas y ovales (Martino et al., 2011). Sin embargo, las únicas formas aisladas y que han logrado crecer en cultivo sumergido son las primeras dos (Tesson et al., 2009). Asimismo, su genoma ya fue secuenciado (Bowler et al., 2008) lo cual ha permitido la generación de cepas transformadas por biobalística y electroporación, incrementando así la versatilidad de este organismo para la producción de ácidos grasos ω -3 (Mühlroth et al., 2013) y de igual manera gracias al desarrollo de herramientas moleculares, ahora es posible modificar las rutas metabólicas ω -3 y ω -6 específicas para incrementar la producción de ácidos grasos de alto valor agregado, por ejemplo, en la formación de triacilgliceroles (TAGs) y ω -3 (Hamilton et al., 2016).



Figura 2.2 Micografía *P. tricornutum* UTEX 646 100X

En la Tabla 2.5 se muestra un resumen de las investigaciones recientemente publicadas, enfocadas en la producción de EPA en *P. tricornutum* como modelo de estudio, mismos que han reportado una abundancia de EPA relativa a la cantidad de ácidos grasos totales del 14 % al 32 %. Un trabajo preliminar del grupo del Dr. Galindo en colaboración con L. Kramer, mostro una abundancia relativa de EPA del 28 %, es decir, un 12 % menor a lo reportado por Cerón-García et al. en el 2013, que es el autor que ha reportado el máximo nivel de EPA hasta el momento (32 %).

Las principales diferencias en el porcentaje de EPA, reportado por los diferentes autores radica en las variaciones que presenta la cepa de *P. triornutum* en los diferentes sistemas de cultivo, así como de las condiciones operacionales del mismo. En la sección 2.7, se discutirá a detalle los sistemas empleados para el cultivo de microalgas. En general, la cepa UTEX 640 se ha empleado con mayor frecuencia para la obtención de EPA y mediante esta se han reportado las mejores productividades (56 mg_{EPA} L⁻¹d⁻¹; Fernández-Sevilla et al., 2004) en comparación de la cepa UTEX 646, siendo esta última de mayor uso como modelo en la ingeniería genética para la obtención de cepas modificadas para la producción de metabolitos de interés comercial por ejemplo: para la síntesis de ácidos grasos libres antibacterianos para el tratamiento de infecciones bacterianas (Desbois et al., 2008), la degradación del plástico tereftalato de polietileno (PET) (Moog et al., 2019) o como fuente de poliéster sintético a partir de aceite de algas (Roesle et al., 2014). Para la mayoría de las aplicaciones, las condiciones del cultivo son optimizadas para lograr una alta producción de biomasa. No obstante, para la obtención de altas productividades de lípidos en *P. triornutum*, la manipulación del metabolismo juega un papel importante en el aumento tanto de la biomasa como del porcentaje de los lípidos (Butler et al., 2020).

Tabla 2.5. Principales investigaciones enfocadas en la producción de EPA, empleando cepas de *P. triornutum* como modelo de estudio.

Cepa	%EPA*	Condiciones de cultivo	Referencia
<i>P. triornutum</i> UTEX 640	30.5	Medio Yongmanitchai & Ward, (1991); 4000 luxes; Autotrofia; 20 °C; 5 % CO ₂	Yongmanitchai & Ward, 1991
<i>P. triornutum</i> (SCUN/SCUEC)	14.0	Medio f/2; 165 μmol fotón m ⁻² s ⁻¹ ; Autotrofia; 20 °C.	Wang et al., 2012
<i>P. triornutum</i> UTEX 640	32.0	Medio reportado por Cerón et al., 2013; 280 μmol fotón m ⁻² s ⁻¹ ; Mixotrofia; 50 % CO ₂ ; glicerol 0.1 M; 20 °C.	Cerón et al., 2013
<i>P. triornutum</i> UTEX 646	23.0	Medio ESAW; 60 μmol fotón m ⁻² s ⁻¹ ; Disminución de la temperatura de 20 a 16 °C.	Hamilton et al., 2014
<i>P. triornutum</i> ECS	21.0	Medio f/2; 100 μmol fotón m ⁻² s ⁻¹ ; Autotrofia; 20 °C; 0.15 % CO ₂	Wu et al., 2015
<i>P. triornutum</i> M28	28.9	Medio Walne's; 100 μmol fotón m ⁻² s ⁻¹ ; 15 °C; 1 % CO ₂	Steinrücken et al., 2018
<i>P. triornutum</i> cepa (Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences)	26.0	Medio f/2; 100 μmol fotón m ⁻² s ⁻¹ ; Autotrofia; 20 °C; 0.15 % CO ₂	Wu et al., 2019
<i>P. triornutum</i> UTEX 646	28.0	Medio ASP; 30 μmol fotón m ⁻² s ⁻¹ ; Autotrofia; 18 °C.	Kramer, 2022

*Abundancia relativa de EPA respecto a la mezcla de total de ácidos grasos.

2.5.1 Cepas mutantes de *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 646 (HUP+ LK1 y LK2)

En el departamento de biociencias moleculares de la universidad de Goethe en Frankfurt (Alemania). Se generaron dos cepas mutantes LK1 y LK2, utilizadas en este estudio, de *P. tricornutum* UTEX 646 (wt), y que expresan el transportador de glucosa HUP+ (proteína, 534 aminoácidos) de la clorofita *Chlorella kessleri*, este transportador de hexosas demostró estar situado correctamente en la membrana plasmática mediante ensayos de localización *in situ* y de mejorar un 20 % la producción de biomasa en cultivos en mixotrofia respecto a la cepa silvestre (UTEX 646, utilizada también en este estudio) (Kramer, 2022). Sin embargo, debido al método de transformación por biobalística las dos cepas mutantes (LK1 y LK2) han mostrado tener fenotipos diferentes (velocidad de transporte de glucosa, producción de biomasa, porcentaje de lípidos) debido a los eventos de recombinación del gen *hup1*. Respecto a lo reportado Liv Kramer en 2022, estas cepas mutantes LK1 y LK2 presentan una velocidad de transporte de glucosa promedio de 45 nmol 10⁸cel⁻¹ al medio intracelular es decir 16 veces más, respecto a los estudios reportados por Zaslavskaja et al., en 2001 con el transportador de glucosa Glut1. Por último, en términos de producción biomasa en las cepas mutantes LK1 y LK2, estas produjeron un 20 % más de biomasa respecto a los cultivos de la cepa silvestre UTEX 646 en condiciones de autotrofia.

2.6 Metabolismo de lípidos en las microalgas

Las vías de biosíntesis de ácidos grasos y lípidos en microalgas son similares a las rutas presentes en plantas, las cuales incluyen vías reportadas en eucariotas y procariotas (Hu et al., 2008). Estas rutas están distribuidas en los diversos orgánulos de las microalgas: cloroplasto, citosol y retículo endoplásmico. Sin embargo, se desconoce cómo estas células regulan el flujo de la fuente de carbono para la producción de lípidos. Se ha observado que bajo condiciones de limitación nutricional y en autotrofia, el crecimiento se ve comprometido e inicia la acumulación de lípidos (Cheng & He, 2014).

2.6.1 Ruta de biosíntesis de ω -3

El primer paso para la biosíntesis de ácidos grasos ω -3 en microalgas, es la conversión del acetil-CoA a malonil-CoA. Este paso es realizado en el cloroplasto por la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) (Huerlimann & Heimann, 2013), se ha reportado que en este paso limitante de la biosíntesis de ácidos grasos, el radical hidroxilo (\bullet OH) participa en el sitio activo de la enzima ACCase, regulando así su actividad, y a su vez conduce al incremento de la acumulación de lípidos en niveles más altos de especies reactivas de oxígeno

(ERO) (Sun et al., 2018). Posteriormente, en el cloroplasto se lleva a cabo el primer paso para la biosíntesis de los ácidos grasos a través de la condensación de una molécula de acetil-CoA y de una de malonil-CoA para luego de ello formar el acetoacetil y llevar a cabo el proceso de elongación, en donde el malonil-CoA dona dos de sus tres átomos de carbono al esqueleto del ácido graso en crecimiento (Zulu et al., 2018). Las cadenas de ácidos grasos son elongadas (hasta un total de 18 átomos de carbono) por el complejo multienzimático de la sintasa de ácidos grasos (FAS, por sus siglas en inglés *fatty acid synthase*), como se muestra en la Figura 2.3. los ácidos grasos de 18 carbonos se pueden extender hasta 20-24 carbonos por elongasas de ácidos grasos situadas en el retículo endoplásmico (RE). Por último, la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados ω -3 de cadena larga (20-24 carbonos) es completada por una serie de desaturasas (ubicadas en el retículo endoplásmico), las cuales introducen dobles enlaces en los carbonos en la posición 5,8,11,14,17 dando lugar a la formación de EPA (C20:5).

El aislamiento de las desaturasas y elongasas ha sido utilizado para la caracterización metabólica de la síntesis de ácidos grasos. Se ha estudiado a la enzima desaturasa PtFAD6 proveniente de la cepa *P. tricornutum*, que ha sido caracterizada y presenta relación en la síntesis de GLA (ácido γ -linoleico) a partir del HDA (ácido hexadecadienoico) (Domergue et al., 2003). Las desaturasas solubles están involucradas en la conversión del ácido esteárico (C18:0) al ácido oleico (C18:1 ω -9), mediante la liberación de dos átomos de hidrógeno que son transferidos al oxígeno molecular, al mismo tiempo se transfieren dos electrones y dos protones desde el NADH, que reducen al O₂ en moléculas de H₂O, formando así un doble enlace en la cadena carbonada del ácido graso. Primeramente, se da la introducción de un primer doble enlace en la posición 12-13 de la cadena del ácido oleico (C18:1 ω -9). Una segunda desaturación en los carbonos 15-16 de la cadena, da origen al ácido α -linolénico (C18:3 ω -3). Posteriormente, se presenta una elongación de la cadena y dos desaturaciones adicionales, que dan origen al ácido eicosapentaenoico (C20:5 ω -3). Por la adición de dos carbonos se origina el ácido docosapentaenoico (C22:5 ω -3) que es desaturado y da lugar al ácido docosahexaenoico (C22:6 ω -3) (Villanova et al., 2017). Los genes que codifican para las enzimas Δ 4, Δ 5 y Δ 6 desaturasas, implicadas en la síntesis de DHA, ya han sido caracterizadas en *T. pseudonana* (Tonon et al., 2005). Asimismo, los genes que codifican para las enzimas Δ 6 y Δ 5 desaturasas, involucradas en la síntesis de EPA e identificadas en las cepas *O. tauri* (Domergue et al., 2005) y *P. tricornutum* (Domergue et al., 2003), respectivamente, también han sido caracterizadas.

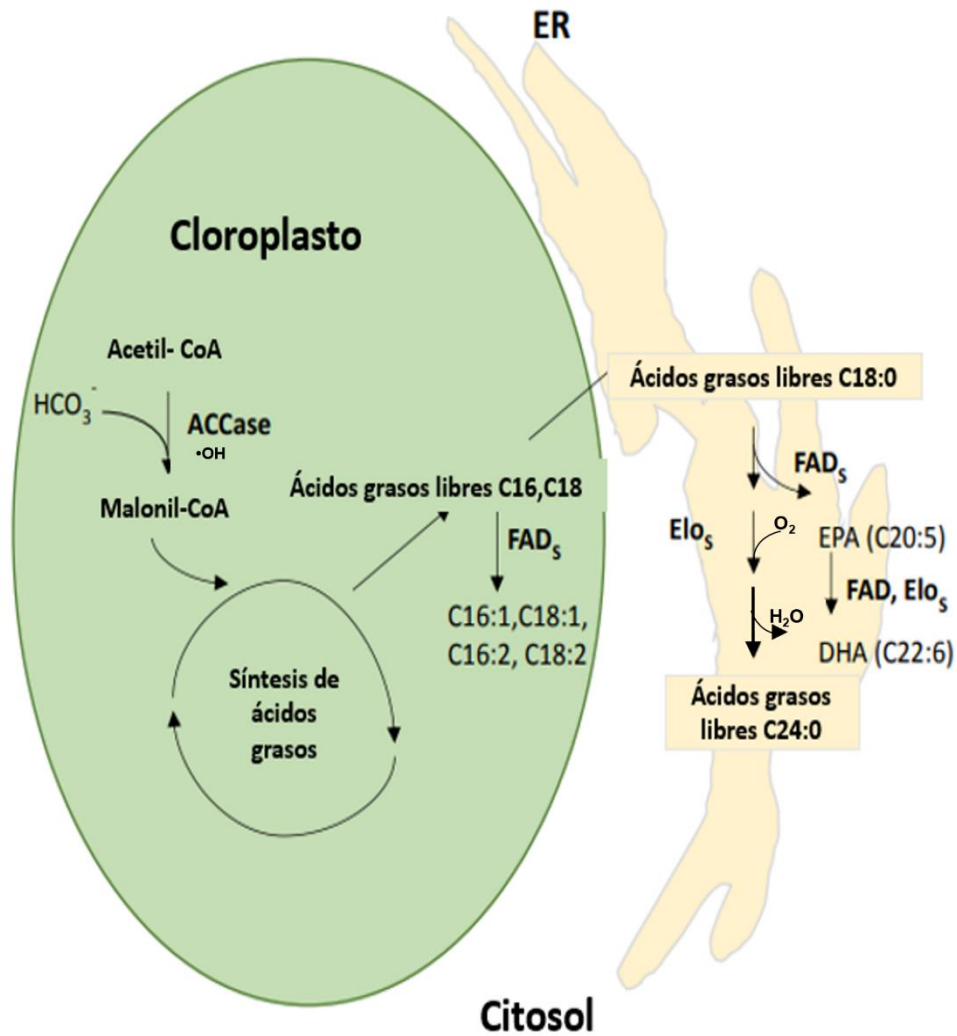


Figura 2.3 La síntesis de ácidos grasos y ω -3 en *P. tricornutum*. La síntesis de estos ácidos grasos inicia con la conversión del acetil-CoA a malonil-CoA en el cloroplasto. En este organelo son sintetizados los ácidos grasos de cadena corta (C16-18) por la sintasa de ácidos grasos. Los ácidos grasos de cadena larga son extendidos por las elongasas (ELO) en el citosol. Los PUFAs de cadena corta son desaturados (FADs, por sus siglas en inglés *fatty acid desaturases*) en el cloroplasto y los de cadena larga (EPA, DHA) en el retículo endoplásmico (ER). Adaptado de Domergue et al., (2002) y Guschina & Harwood, (2006).

2.7 Cultivo de microalgas

Las microalgas están adaptadas para acceder a los nutrientes que le permitan su crecimiento y supervivencia, así como para incrementar la eficiencia de utilización de esos nutrientes, en condiciones extremas o de limitación nutricional. En general, en el caso del crecimiento autótrofo, las microalgas dependen de un suministro de dióxido de carbono y luz para llevar a cabo la fotosíntesis. No obstante, las microalgas son capaces de crecer en heterotrofia y mixotrofia, en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo (Wen & Chen, 2003; Chen & Chen, 2006; Morales-Sánchez et al., 2015).

Las diatomeas son reconocidas por exhibir una gran flexibilidad en su modo de cultivo (Wen & Chen, 2003). La mayor parte de estas son autótrofas y utilizan CO₂ como fuente de carbono el cual fijan mediante la fotosíntesis. Sin embargo, algunas de estas microalgas son capaces de utilizar fuentes orgánicas de carbono (ej. fructosa, glicerol, glucosa, acetato) en condiciones heterótrofas o en presencia de luz (mixotrofia o fotoheterotrofia) (Vazhappilly & Chen, 1998; Chen & Chen, 2006).

2.7.1 Nutrición autotrófica

En la actualidad, la forma más común de cultivar microalgas es a través de la autotrofia, debido a su capacidad de utilizar el CO₂ como fuente de carbono y fijarlo a través del proceso de fotosíntesis, y de requerimientos mínimos de los medios de cultivo. Varias tecnologías de cultivo han sido desarrolladas por investigadores y productores comerciales. Las microalgas autótrofas son comúnmente cultivadas en estanques abiertos al ambiente y en fotobiorreactores cerrados. Dentro de las ventajas de los cultivos en estanques abiertos se incluye su sencillez y bajos costos de inversión (Wen & Chen, 2003). Sin embargo, los costos de producción se incrementan al considerar el uso de terrenos, disponibilidad de agua y, debido a que son abiertos al ambiente, son dependientes de las condiciones climatológicas y son susceptibles de contaminación por hongos o bacterias (Morales-Sánchez et al., 2015). Además, estos sistemas presentan problemas como pérdidas de agua por evaporación, transferencia limitada de CO₂ al cultivo por su baja concentración en el aire (300-500 ppm) y en sistemas con burbujeo de CO₂ su baja solubilidad por el efecto de la temperatura (Pérez-García et al., 2011).

En el caso particular de *P. tricornutum* cultivada en condiciones de autotrofia, Wu et al. en 2015 reportaron el efecto de la concentración de CO₂, encontrando una mayor productividad de biomasa, en comparación a los cultivos en donde se usó una menor concentración de CO₂. Asimismo, Gardner et al. en el 2012, reportaron efectos similares en la productividad de biomasa mediante la adición de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), además de una mayor acumulación de triacilglicérols (TAGs). El uso de fuentes orgánicas de carbono será abordado en las secciones siguientes.

2.7.2 Nutrición heterotrófica

Algunas especies de diatomeas pueden crecer de forma heterótrofa utilizando fuentes orgánicas de carbono como sustrato, en condiciones de oscuridad. Este grupo de microalgas heterótrofas pueden ser clasificadas en dos categorías: i) heterótrofas obligadas, es decir son capaces de crecer en ausencia luz, metabolizando fuentes orgánicas de carbono a través del proceso aerobio (Lee, 2001) y ii) heterótrofos facultativos, los que pueden llevar a cabo de forma separada el proceso de fotosíntesis y la oxidación de compuestos orgánicos de carbono como fuente de energía, en presencia de luz (Pérez-García et al., 2011).

Los equipos utilizados en este sistema de cultivo son biorreactores de tanque agitado, similares a los fermentadores utilizados para otros microorganismos que no requieren luz. Entre las ventajas de la heterotrofia se cuentan: escalamiento sencillo, incluyendo consideraciones como el tamaño del reactor, el mezclado, la transferencia de masa y la productividad (Eriksen, 2008). Además, ofrecen la posibilidad de incrementar en forma importante la producción de biomasa y la productividad de lípidos con bajos costos a través de cultivos alimentados, continuos o cultivos de perfusión (Wen & Chen, 2003).

Algunas especies de microalgas heterótrofas han sido utilizadas para la producción de DHA (*S. limacinum*, *C. cohnii*) y EPA (*N. laevis*, *N. alba*) utilizando diversas fuentes de carbono (acetato, glicerol, glucosa, fructosa y almidón), como se describió en las secciones 2.4.1 y 2.4.2, respectivamente. Sin embargo, sólo los cultivos para la producción de DHA han logrado su comercialización industrial (Barclay et al., 1994). Una de las limitantes para la producción heterótrofa de EPA reside en el número de cepas que pueden crecer bajo esas condiciones, el costo de la adición de la fuente orgánica de carbono, la contaminación y competencia con otros microorganismos, la inhibición por el exceso de la fuente de carbono y, principalmente, en la disminución de intermediarios y metabolitos involucrados en la síntesis de ácidos grasos (Chen, 1996; Wen & Chen, 2003;

Pérez-García et al., 2011). Por ejemplo, la microalga *Nitzschia laevis* disminuye la productividad de EPA un 68 % en condiciones de cultivo heterótrofas, respecto a los cultivos en mixotrofia en donde la velocidad específica de crecimiento aumenta un 26 %, respecto al cultivo en heterotrofia (Wen & Chen, 2000).

En este sentido, la ingeniería metabólica ha surgido como una herramienta potencial para el uso biotecnológico de estos organismos manipulando las rutas metabólicas de las microalgas para mejorar el crecimiento fotosintético en condiciones específicas y para lograr la conversión trófica (nutrición autótrofa a nutrición heterótrofa). Aunque estas vías no están estrictamente relacionadas con los metabolitos secundarios, los enfoques de la biología sintética podrían potencialmente trasladarse a este campo y de esta forma lograr incrementar la productividad de biomasa y la producción de metabolitos de interés mediante el consumo de fuentes orgánicas de carbono (Zaslavskaja et al., 2001; Gimpel et al., 2015).

Respecto a la especie *P. tricornutum* Bohlin, ha sido posible modificarla, con la finalidad de incorporar el gen *Glut 1*, proveniente de eritrocito humano, que codifica para el transportador de glucosa (Glut 1). De esta forma se obtuvieron cepas transformadas de *P. tricornutum* Bohlin que incrementan el transporte de glucosa, resultando en cultivos de alta concentración celular en ausencia de luz, con respecto a los cultivos de la cepa silvestre en autotrofia (Zaslavskaja et al., 2001).

2.7.3 Nutrición mixotrófica

El cultivo mixotrófico surge como una variante del cultivo heterotrófico, donde el CO₂ y la fuente orgánica de carbono son asimilados simultáneamente por el microorganismo a través del proceso de respiración y fotosíntesis (Lee, 2001; Bailleul et al., 2015). Esta estrategia de cultivo se ha utilizado con la finalidad de incrementar la concentración de biomasa debido a una mayor eficiencia fotosintética y a la disminución del efecto de fotooxidación (Lee, 2001; Pang et al., 2019).

Dentro de las ventajas en el sistema de cultivo en mixotrofia se han reportado una mayor producción de biomasa y un aumento en la velocidad específica de crecimiento (equivalente, en algunos casos, a la suma de la velocidad específica de crecimiento en autotrofia y heterotrofia), además de incrementar la biosíntesis de ácidos grasos (Pérez-García et al., 2011; Morales-Sánchez et al., 2015).

Algunas especies de microalgas pueden metabolizar fuentes orgánicas de carbono, dependiendo de las condiciones de cultivo. Wood et al. en 1999, reportaron el uso preferencial del glicerol como fuente orgánica de carbono en condiciones de mixotrofia en las cepas *Nannochloropsis* sp., *Rhodomonas reticulata*, y *Cyclotella cryptica*.

En general, los estudios de nutrición mixotrófica en diatomeas es escasa (Villanova et al., 2017) en el caso de *P. tricornutum*, se ha reportado, que ésta tiene la capacidad de crecer en condiciones de mixotrofia. Cerón-García et al.,(2000) analizaron la capacidad de *P. tricornutum* UTEX 640, para crecer en presencia de diversas fuentes de carbono como glicerol, glucosa, acetato y almidón. Sin modificaciones genéticas y con la adición de 0.1 M de glicerol al medio de cultivo y con una intensidad luminosa de 165 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$, alcanzó la mayor productividad de biomasa: 74 % mayor respecto a las condiciones de autotrofia. Respecto al uso de glucosa como sustrato, se observó que a una concentración de 5 g L⁻¹, la generación de biomasa fue 30 % mayor respecto a los cultivos control sin glucosa. Sin embargo, cuando se empleó almidón (0-5 g L⁻¹) y acetato (0-0.1 M) en la cepa UTEX 640, no se evidenció un cambio en la producción de biomasa, respecto a lo observado en los cultivos en condiciones de autotrofia (Cerón-García et al., 2013).

La mayor parte de las vías síntesis de PUFAs se lleva a cabo en el cloroplasto y en el retículo endoplásmico, mismas que se mantienen con mayor actividad en condiciones de autotrofia, por lo que a través de cultivos en mixotrofia (modalidad de cultivo que mantiene activa las rutas autótrofas y heterótrofas), se ha logrado incrementar la concentración de biomasa y la síntesis de precursores de lípidos, así como una mayor acumulación de PUFAs (Cerón-García et al., 2005).

2.8 Parámetros de cultivo que afectan la producción de PUFAs

2.8.1 Limitación nutricional

Una de las principales estrategias utilizadas para incrementar la producción de lípidos es la limitación nutricional. El nitrógeno, como uno de los principales macro componentes en los medios de cultivos en microalgas, se ha visto que este en limitación tiene efectos fisiológicos y morfológicos al ser uno de los principales formadores de macromoléculas como son proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, además de estar involucrado en varios procesos metabólicos dentro de las células (Litchman et al., 2009). Se ha reportado que en especies de *Schizochytrium* sp. la limitación de nitrógeno activa a la enzima AMP

deaminasa, que reduce la concentración intracelular de AMP (Heggeset et al., 2019). Cuando hay niveles bajos de AMP en la mitocondria, se inicia una cascada de reacciones que causan la acumulación de citrato. Cuando el citrato se transloca al citosol, éste sirve como precursor del acetil-CoA, que a su vez funciona como un precursor para la síntesis de lípidos (Jakobsen et al., 2008). En *P. tricornutum*, se han descrito diversos efectos en condiciones de limitación de nitrógeno, las cuales van desde mecanismos de degradación de proteínas con el objetivo de mantener el metabolismo basal (Villanova et al., 2017), por otra parte en limitación de nitrógeno los sistemas fotosintéticos suelen verse afectados debido a la disminución de las proteínas LHC (por sus siglas en inglés, *light-harvesting complexes*) inhibiendo la eficiencia fotosintética debido a la disminución en la biosíntesis de pigmentos (Alipanah et al., 2015). Asimismo, Alipanah et al., en 2015 observaron que en condiciones de estrés por limitación de nitrógeno el crecimiento celular en *P. tricornutum* puede verse afectado y la energía derivada por el proceso de fijación de carbono suele dirigirse a la acumulación de lípidos, principalmente de triacilgliceroles (TAG). Bajo estas condiciones de cultivo, se ha reportado un incremento de EPA del 27 %, respecto a los cultivos sin limitación nutricional. Sin embargo, la producción de EPA se ve afectada por la baja productividad de biomasa que induce la limitación de nitrógeno en el medio (Cerón-García et al., 2005).

2.8.2 Transferencia de masa

Una de las variables más importantes en el cultivo de microalgas que incide en el crecimiento y producción de metabolitos, y que pocas veces suele ser considerado, es la transferencia de masa, misma que engloba tanto la transferencia de O₂ como la de CO₂ (Sobczuk et al., 2005). Esta variable de cultivo está implicada en tres procesos celulares que se encuentran en constante interacción: fotosíntesis, fotorrespiración y la respiración celular.

Los fotobiorreactores ofrecen un ambiente cerrado. En estos sistemas se protege a los cultivos de las condiciones ambientales e invasión de microorganismos no deseados, las condiciones de cultivo son controladas, hay un aumento en la fijación de CO₂, el cual es burbujeadado a través del medio de cultivo y se pueden obtener productividades de EPA 5 veces más en comparación con los cultivos en estanques abiertos (Wen & Chen, 2003). Este sistema de cultivo es más costoso comparado con los estanques abiertos, debido al alto costo de inversión en la infraestructura. No obstante, permiten una mejora en la transferencia de masa en el sistema (Sobczuk et al., 2005).

Durante la fotosíntesis las microalgas hacen uso de energía lumínica y del CO₂ para producir energía y liberar oxígeno (O₂) como subproducto. Sin embargo, a altas concentraciones de oxígeno disuelto (OD), la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa, que es la principal enzima encargada de fijar el CO₂ en el ciclo de Calvin, cambia su actividad enzimática y procede a utilizar el O₂ para producir CO₂ a través de la fotorrespiración (Contreras et al., 1998).

Además, gran parte del O₂ que se libera como subproducto de la fotosíntesis se puede acumular (8-10 mg O₂ L⁻¹min⁻¹; Weissman et al., 1988) en el cultivo y causar un alto nivel de toxicidad que puede amenazar la supervivencia de las microalgas. Se ha reportado que una acumulación de oxígeno disuelto (OD) podría dar paso a la inhibición del crecimiento celular, especialmente en sistemas cerrados donde el OD acumulado se elimina con el intercambio de gases desde la zona de mayor concentración a la de menor concentración y de a través del desgasificador por efecto de la transferencia de masa. El OD puede oxidar una o más enzimas, también puede afectar la cadena transportadora de electrones, y suprimir el proceso de fotosíntesis. Es por ello, que los cultivos de microalgas en biorreactores tubulares o cerrados deben limitarse en un cierto intervalo el cual no exceda el 400% (32 ppm) del valor de saturación del aire por efecto de la acumulación de O₂ durante los cultivos (Sobczuk et al., 2005), esto contrasta con los cultivos en estanques abiertos, donde la concentración de O₂ siempre se encuentra por debajo de la concentración en biorreactores tubulares de menor diámetro.

En cuanto al CO₂, se utiliza habitualmente como fuente de carbono en el cultivo de microalgas y este suministro puede ser un factor limitante si su concentración en la fase líquida es demasiado baja (por ejemplo, cuando se usa aire como gas de alimentación) o si la mezcla en el biorreactor es insuficiente (Molina et al., 1999). Se ha reportado que el CO₂ debe suministrarse en concentraciones suficientemente altas para evitar limitar el crecimiento celular (Contreras et al., 1998). Por lo tanto, se recomienda que la presión parcial de CO₂ sea superior a 0.2 kPa (equivalente a 3.3 mg L⁻¹). Dado que la presión parcial de CO₂ en la atmósfera es 0.04 kPa, el aire puro (es decir, con un contenido de CO₂ de 0.035% por volumen) es insuficiente para el suministro de CO₂ y por lo tanto se requiere una mezcla de gases enriquecida con CO₂.

2.8.2.1 Oxígeno

Por otro lado, se han llevado a cabo estudios sobre el efecto de la limitación de oxígeno, condición que induce una mayor acumulación de lípidos, sin comprometer la concentración de biomasa en cultivos heterótrofos y/o mixotróficos. Respecto a esta variable de cultivo, se han reportado estudios en *Schizochytrium sp* y *Aurantiochytrium sp*, en los que se ha logrado incrementar la producción de DHA estableciendo diferentes tasas de aireación (vvm). En estos casos, la condición de limitación de O₂ disminuyó la actividad de las desaturasas dependientes de oxígeno y se favoreció la síntesis de PUFAs, independiente del nivel de oxígeno disuelto (Bailey et al., 2003; Ren et al., 2010).

2.8.2.2 Otras alternativas

Otra de las alternativas para incrementar el contenido de lípidos en *P. tricornutum* es a través de la sobreexpresión de enzimas como la G6PD, involucrada en la ruta de las pentosas fosfato y principal generadora de NADPH, el cual es utilizado para la síntesis de ácidos grasos, ya que es una ruta altamente reductora. En cultivos de *P. tricornutum*, empleando cultivos enriquecidos con CO₂ y desplazando el O₂, se ha logrado incrementar la producción de lípidos así como de los ácidos grasos de cadena corta, larga e insaturados (EPA; C20:5, ω-3), inhibiendo las rutas involucradas en la degradación de ácidos grasos, reduciendo el flujo de electrones hacia la cadena respiratoria al no estar presente el oxígeno como último aceptor de electrones (Wu et al., 2019).

3. Justificación

El EPA es precursor de eicosanoides y leucotrienos los cuales son metabolitos bioactivos involucrados en diversas funciones fisiológicas, principalmente asociada a los procesos antiinflamatorios como respuesta a la inhibición de citoquinas en el cuerpo humano. La evidencia médica de los efectos del consumo de EPA sobre la salud humana ha llevado a que este ácido graso capte la atención de los mercados de nutraceuticos y de farmaceuticos. La creciente demanda de EPA y el hecho que las fuentes convencionales (aceite de pescado) son insuficientes e inadecuadas para ciertas aplicaciones, han llevado a una búsqueda extensa de fuentes alternativas, entre ellas las microalgas. Estos microorganismos bajo condiciones de mixotrofia promueven el crecimiento celular y la acumulación de lípidos. Debido al desarrollo de cepas mutantes de *P. triornutum* UTEX 646, productoras de EPA, que expresan el transportador de glucosa HUP+ con lo que se ha logrado una mayor internalización de la fuente de orgánica de carbono e incrementar la producción de biomasa, vuelve a estas mutantes una opción interesante para la producción de EPA en condiciones de mixotrofia. Asimismo, existe poca información publicada sobre cultivos de la cepa UTEX 646 en condiciones de mixotrofia y del estudio del efecto de la transferencia de oxígeno (variable utilizada en el escalamiento de procesos) tanto en la cepa silvestre como de cepas mutantes y cómo estas condiciones podrían afectar directamente la producción de EPA.

Respecto al oxígeno en cultivo de *P. triornutum*, Song et al.,(2014) evaluaron el efecto de la tasa de aireación (vvm) en siete niveles en el intervalo de 0 a 2.5 vvm, los resultados de este estudio conducen a una clara relación entre el porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados mismos que se producen a mayor y menor tasa de aireación respectivamente, asimismo en se determinó que en las condiciones de mayor aireación (2.5 vvm) la producción de los ácidos grasos totales fue 35 % mayor, respecto a las condiciones de menor aireación.

4. Hipótesis

Bajo condiciones de mixotrofia y de baja transferencia de oxígeno, en cepas mutantes (HUP+) de *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 646, se favorecerá la acumulación de EPA y de biomasa, con respecto a cultivos de la cepa silvestre en condiciones de mixotrofia y de baja transferencia de oxígeno.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Estudiar condiciones de cultivo que incrementen la acumulación de EPA en cepas mutantes de *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 646 (HUP+).

5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar y seleccionar cepas mutantes de *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 646, a través de cultivos en condiciones de mixotrofia en matraces agitados mediante sus cinéticas de crecimiento, productividad de biomasa, consumo de glucosa y producción de PUFAs.

Con la cepa seleccionada (HUP+) de *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 646:

2. Analizar el efecto en la producción de EPA y su relación con el crecimiento en cultivos lote en biorreactor de 1 L de *P. tricornutum* en mixotrofia, en función de dos niveles del coeficiente global de transferencia de oxígeno (k_{La}).
3. Analizar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos ω -3.

6. Estrategia experimental

La estrategia experimental se esquematiza en el diagrama de flujo ilustrado de la Figura 6.1.

Etapa 1:

En la primera etapa se realizó el estudio cinético de la cepa silvestre *P. tricornutum* UTEX 646 y dos cepas mutantes HUP+ LK1 y LK2, en condiciones de mixotrofia, en cultivos en matraces agitados. Esto se llevó a cabo con el fin de evaluar la velocidad específica de crecimiento de las microalgas, la concentración de biomasa y PUFAs, así como los rendimientos y consumos respectivos, que permitieron seleccionar entre una de las dos cepas mutantes de *P. tricornutum* UTEX 646 con mayor potencial para llevar a cabo los cultivos en el biorreactor.

Etapa 2:

En esta segunda etapa, la cepa seleccionada se evaluó en cultivos en biorreactor de 1 L. Se evaluó la influencia del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, k_{La} (establecido mediante agitación y aireación) en dos niveles (66 y 122 h^{-1}), sobre los parámetros cinéticos, la concentración celular y la producción de EPA. Mediante estos experimentos, se llevaron a cabo dos condiciones de cultivo por triplicado con un total de 4 experimentos, con variación del k_{La} , como se muestra en la Figura 6.2. Asimismo, se realizó, en fase estacionaria, el análisis de expresión de los principales genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos. Los resultados obtenidos se compararon con respecto a la cepa silvestre bajo las mismas condiciones de cultivo.

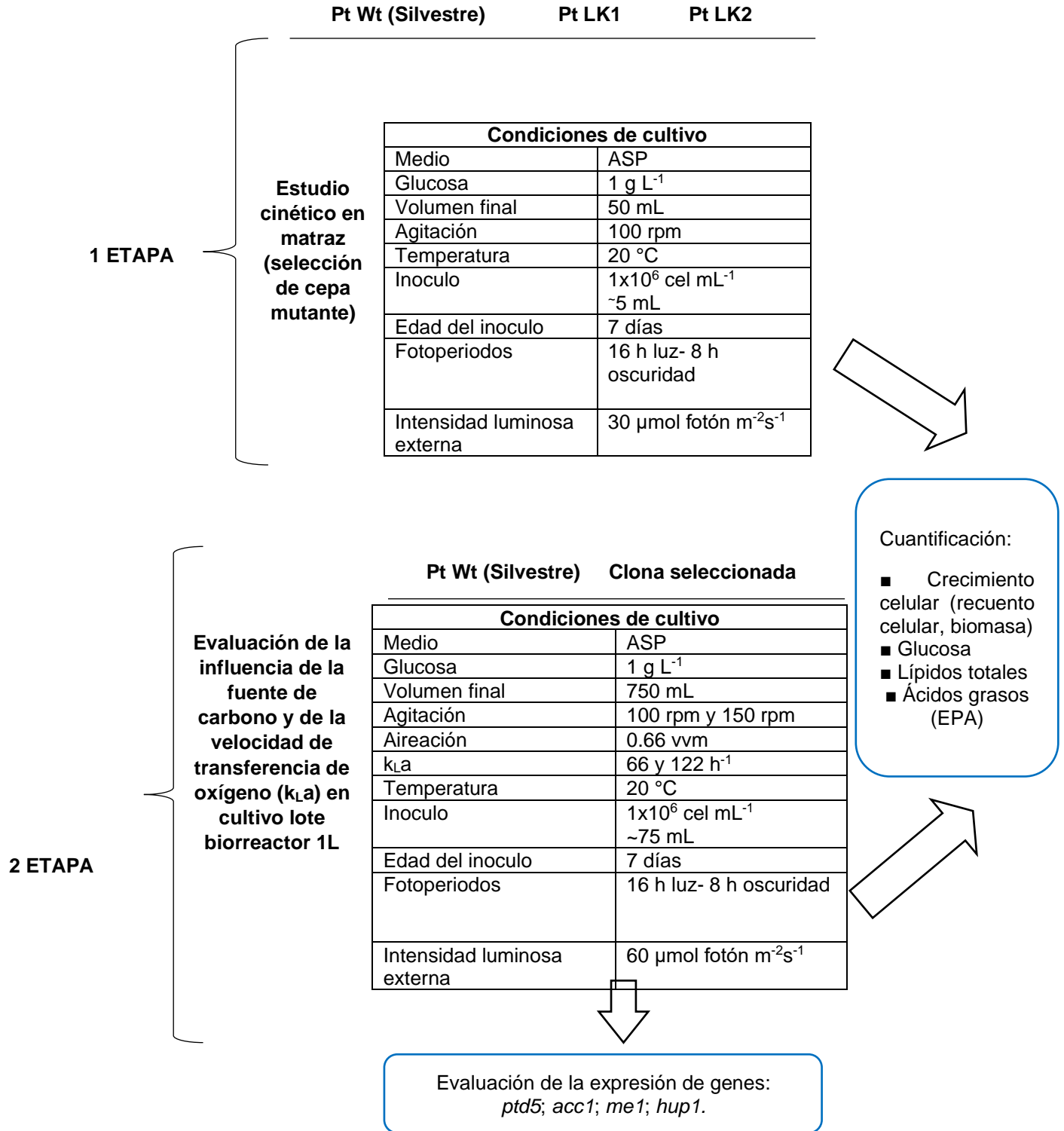


Figura 6.1 Estrategia experimental desarrollada para el estudio del crecimiento y producción de EPA en cepas de *P. tricornutum* (Pt) UTEX 646 y las cepas mutantes LK1 y LK2.

7. Material y métodos

7.1 Cepas

Recientemente, en 2018, en la Universidad de Goethe en Frankfurt, Alemania, se construyeron cepas de *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 646 con la incorporación del gen *hup1*, proveniente de *Chlorella kessleri*, que codifica para el transportador de glucosa (HUP+), obteniendo cepas de *P. tricornutum* (HUP+) que han mostrado la capacidad de crecer en condiciones de mixotrofia, en presencia de una baja intensidad luminosa (Kramer, 2022).

La cepa de *P. tricornutum* UTEX 646, así como las cepas transformadas (HUP+ LK1 y LK2; Tabla 7.1), fueron proporcionadas por L. Krämer (Krämer, 2022) a través de una colaboración con la Universidad de Goethe de Frankfurt (Alemania). Las cepas se conservaron en medio ASP líquido y sólido (1.3 % agar) a 20 °C, e intensidad luminosa de 30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Tabla 7.1 Cepas donadas por la Universidad de Frankfurt

Cepas	Origen del transportador de glucosa	Promotor	Vector	Gen resistencia	Crecimiento
<i>P. tricornutum</i> UTEX 646 (wt)	-	-	-	-	Autotrofia
<i>P. tricornutum</i> UTEX 646 (HUP+1)- cepa LK1	Hup 1- <i>Chlorella kessleri</i>	FcpA	pPHAN-nat	Zeocina	Mixotrofia
<i>P. tricornutum</i> UTEX 646, (HUP+1)- cepa LK2	Hup 1- <i>Chlorella kessleri</i>	FcpA	pPHAN-nat	Zeocina	Mixotrofia

7.2 Medio de cultivo

El medio ASP fue utilizado para llevar a cabo los cultivos en matraz y biorreactor. La composición del medio se muestra en la Tabla 7.2. Las soluciones *stock* se prepararon utilizando agua Milli-Q, y se adicionaron a 940 mL de agua Milli-Q con 5 g de NaCl. Para evitar precipitación, los *stocks* del medio de cultivo fueron disueltos y esterilizados por separado a 121 °C por 15 min a excepción de las soluciones de Eisen III (Tabla 7.3) y micronutrientes A (Tabla 7.4), las cuales fueron esterilizadas mediante filtros con tamaño de poro de 0.22 μm y posteriormente se adicionaron 1 mL de estas soluciones al medio ASP, en campana de flujo laminar. El pH del medio se ajustó, antes de esterilizar, a un valor de 7.7, mediante la adición de H_2SO_4 concentrado.

Tabla 7.2 Composición del medio ASP, soluciones stock.

Solución	Volumen de stock al medio (mL)
KCl (21 mM)	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O (8.1 mM)	10
Tris (4 mM)	10
NaNO ₃ (11.8 mM)	10
K ₂ HPO ₄ (0.58 mM)	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O (2.72 mM)	10
H ₃ BO ₃ (0.16 mM)	1

Tabla 7.3 Solución Eisen III, en 100 mL de agua Milli-Q

Compuesto	Cantidad (mg)
EDTA	465
FeCl ₃	198

Tabla 7.4 Soluciones de micronutrientes A y B, en 95 mL de agua Milli-Q

Solución micronutrientes A (pH 5.5, NaOH)		Solución micronutrientes B	
Compuesto	Cantidad	Compuesto	Cantidad
EDTA	3000 mg	CoCl ₂ ·H ₂ O	48 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	405 mg	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	24 mg
ZnCl ₂	30 mg	CuCl ₂ ·2H ₂ O	12 mg
micronutrientes B	5 mL	H ₂ O	200 mL

7.3 Sistema de cultivo

En la primera parte de este trabajo, fue necesario el diseño de un equipo (Fig. 7.1) debido a que en el Instituto de Biotecnología, no se contaba con un equipo que cubriera las condiciones de cultivo necesarias, es decir, con una temperatura menor a los 25 °C, control de fotoperiodos, intensidad luminosa homogénea menor a 150 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y el espacio físico para montar el diseño experimental por triplicado en biorreactores de 1 L. Con este equipo fue posible llevar a cabo cultivos en condiciones de mixotrofia con un sistema de control de temperatura a 20 °C, intervalo de intensidad luminosa de 0 a 150 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mediante el uso de lámparas LED (por sus siglas en inglés, *light emitting diode*), ajuste de fotoperiodos y opción para el monitoreo del CO₂ (biorreactor).



Figura 7.1. Imágenes del equipo diseñado para la realización de los cultivos en condiciones de mixotrofia de este trabajo: i) sistema biorreactor 3 L, ii) sistema biorreactor 1 L, iii) sistema agitación orbital matraces.

El sistema cuenta con tres opciones para realizar los cultivos: i) cultivo en biorreactor de 3 L (Applikon, Schiedam), ii) sistema de agitación magnética para realizar por triplicado cultivos en biorreactor de 1 L (Duran, GL 45) y iii) sistema de agitación orbital para cultivos en matraz. Este equipo permitió llevar a cabo el diseño de experimentos de forma paralela por triplicado para cada condición, lo que aseguró una mayor reproducibilidad de los experimentos en comparación con la realización de estos de forma separada.

7.4 Cultivos en matraces agitados

Las dos cepas mutantes y la cepa silvestre fueron cultivadas en el medio ASP, descrito en la sección 7.2. Los cultivos se mantuvieron a una intensidad luminosa de $30 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$, con ciclos de 16 h luz y 8 h de oscuridad a 100 rpm en agitación a 20°C . Se utilizó 1 g L^{-1} de glucosa como fuente orgánica de carbono en los cultivos en mixotrofia; en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 45 mL de medio de cultivo, se agregaron 5 mL de inóculo en fase exponencial (7 días).

Los cultivos se mantuvieron durante dos semanas, y se tomó muestra cada 48 h para realizar los análisis correspondientes. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

7.5 Cultivos lote en biorreactor

Los cultivos se realizaron en biorreactores Duran (GL 45) de 1 L de volumen nominal (Fig. 7.2a) y con un volumen de trabajo de 750 mL, equipado con agitadores magnéticos montados en el centro de la tapa del biorreactor, con una relación diámetro del impulsor/diámetro del tanque (D/T) de 0.18, un difusor de aire con un orificio y una distancia mínima entre el fondo del reactor y el impulsor de 5 cm (Fig. 7.2b). Los cultivos se realizaron bajo las mismas condiciones operacionales para los cultivos en mixotrofia descritos en la sección 7.3, para la cepa transformada seleccionada y la cepa silvestre.

Con la finalidad de establecer dos condiciones de transferencia de oxígeno dentro de nuestro sistema experimental, con base en las características y limitaciones operaciones del biorreactor GL45, se estableció como una variable fija a la velocidad de aireación en 0.66 vvm. Este valor de aireación se ha reportado previamente por Song et al., en 2014 en cultivos de *P. tricorutum*, donde el menor porcentaje de ácidos grasos saturados se encuentra dentro del intervalo (0.5-1 vvm).

Respecto a la agitación en el sistema, la primera condición se fijó en 150 rpm, donde se aseguró (visualmente) que las células permanecieran en suspensión, fijando esta misma como la condición de menor transferencia. La segunda condición de agitación en el sistema se estableció a 250 rpm, con el fin de lograr un $k_L a$ de al menos el doble de aquel logrado a 150 rpm (ver sección 7.4.1). En esta condición se observó un vortex pronunciado, lo que se sabe que incrementa el área interfacial.

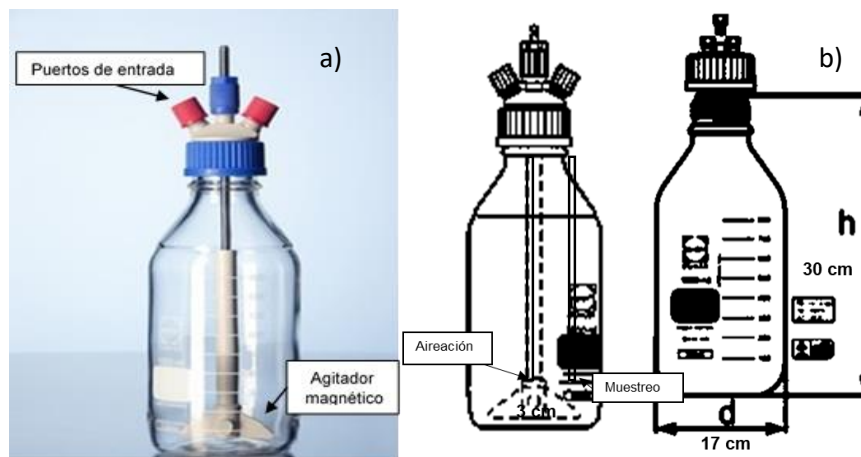
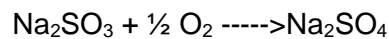


Figura 7.2. a) Biorreactor Duran (GL45) de 1L, integrado con agitador magnético de ancla (0-500 rpm); b) Esquema dimensión del biorreactor.

7.5.1 Medición del coeficiente de transferencia de oxígeno (kLa)

La caracterización del k_La para este sistema se realizó mediante el método del sulfito, mismo que permite determinar la eficiencia en fermentación mediante el empleo de soluciones de sulfito de sodio catalizadas con iones cobre (García-Ochoa et al., 2009). Este es un método indirecto, que se lleva a cabo en agua y que se sabe que los coeficientes de transferencia k_La , no son los mismos que se obtendrían durante la realización del proceso de fermentación (Ertola et al., 1965), pero que sin embargo permiten la comparación entre diferentes condiciones de fermentación.

Se utilizó el método de Cooper et al., (1944) para calcular el coeficiente de transferencia de oxígeno para los biorreactores de 1 L (Fig. 7.3). Este método implica la determinación de la tasa máxima de oxidación de sulfito de sodio a sulfato de sodio en presencia de catalizador de iones Cu^{2+} o Co^{2+} :



Cuando la concentración de Cu^{2+} está en el orden de $0.5 - 2 \times 10^{-3}$ M, y el pH se mantiene neutro o ligeramente alcalino, esta reacción es suficientemente rápida como para que en el tiempo cero, la concentración de oxígeno en la fase líquida (C_L) sea prácticamente nulo, pero no tan rápida como para que afecte el espesor de la película. Además se debe cumplir que:

- La velocidad de la reacción no dependa de la concentración de SO_3^{2-} (reacción de orden cero). Para ello, ésta debe ser mayor que 0.015 M.
- El volumen ocupado por la película líquida debe ser muy pequeño con relación al volumen total de la fase líquida. Esto hace que el O_2 , luego de difundir a través de la película, pueda reaccionar con un gran volumen de solución de Na_2SO_3 , garantizando así que $C_L = 0$.

En estas condiciones la reacción de oxidación ocurrirá totalmente en el seno del líquido, y la velocidad de reacción estará controlada por la velocidad máxima de difusión de O_2 , es decir:

$$r = k_L a \cdot C^*$$

Dónde r es la velocidad de reacción del sulfito en el seno del líquido. Si se conoce C^* podemos estimar el coeficiente de transferencia a partir de r . La velocidad de oxidación

del sulfito puede estimarse mediante la determinación del sulfito residual mediante yodometría.

La estimación del coeficiente global de transferencia de oxígeno (k_La) con el método del sulfito se muestra en el anexo 2.



Figura 7.3 Biorreactor GL45

7.6 Métodos analíticos

7.6.1 Recuento celular (cámara de Neubauer)

El conteo celular se utilizó para evaluar el crecimiento de las microalgas y se realizó con una periodicidad de toma de muestra de 48 h durante dos semanas del cultivo (en matraz y biorreactor) utilizando la cámara de Neubauer con la metodología reportada por Camacho-Fernández et al., en 2018. En condiciones de esterilidad, se tomaron 200 μ L de la suspensión de células a analizar. Con los datos obtenidos de la cámara de Neubauer, se calculó la concentración celular, de acuerdo con la siguiente ecuación 1.

$$\text{Concentración celular (cel/mL)} = \frac{\text{células totales}}{\text{cuadrantes contados}} \cdot \text{factor de dilución} \cdot 10^4 \quad (1)$$

7.6.2 Cuantificación gravimétrica de biomasa

La evaluación del crecimiento de la biomasa se llevó a cabo a través de gravimetría, determinando la concentración de biomasa por peso seco utilizando la metodología previamente reportada por Breuer et al., en el 2013. Se tomaron 10 mL de suspensión de células en condiciones asépticas en tubos Falcon de 15 mL. Se separó el sobrenadante y el paquete celular se filtró al vacío a través de membranas de acetato de celulosa de 0.45 μ m de tamaño de poro, previamente taradas (24 h a 70 °C). Las muestras fueron secadas en estufa (24 h a 70 °C) para la obtención de un peso constante. Las muestras se

mantuvieron en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente (aprox. 1.5 h). Finalmente las muestras se pesaron y por diferencia de peso se obtuvo la cantidad de biomasa.

7.6.3 Cuantificación de glucosa

Para la cuantificación de la glucosa se recuperó 1 mL de caldo de cultivo en tubos Eppendorf de 1.5 mL. La cuantificación se realizó por HPLC empleando una columna aminex HPX-87H (300 y 7.8 mm) (Biorad, Hércules, CA, USA) y H₂SO₄ 0.014 N como fase móvil a un flujo de 0.65 mL min⁻¹ y una temperatura de análisis de 50 °C. Las muestras se diluyeron en agua Milli-Q para alcanzar las concentraciones en la curva de calibración (2.5-20 mM). Para la cuantificación de la glucosa se utilizó el detector de índice de refracción (IR; Waters 2414) (Castillo et al., 2013).

7.6.4 Lípidos totales

La obtención y cuantificación de lípidos totales se fundamenta en un procedimiento de extracción con solventes, seguido de un análisis gravimétrico (Khoomrung et al., 2013). Las muestras fueron pesadas en la balanza analítica (OHAUS PA114, repetibilidad (desviación estándar) \pm 0.1 mg; linealidad \pm 0.2 mg). En el caso particular de cultivos de *P. tricornutum*, los lípidos totales se determinaron a partir de muestras liofilizadas (5-20 mg).

Se agregaron 3 mL de cloroformo-metanol (2: 1, v / v) al tubo, para evitar la oxidación de los lípidos totales, las muestras se asperjaron con N₂ por 30 s para mantener atmósfera inerte y se cerró herméticamente con un tapón de rosca de teflón. El tubo se agitó con vórtex y posteriormente los tubos se llevaron a 60 °C durante 1 h, lo que permitió el proceso de extracción. Después de 1 h, se agregaron 0.72 mL de NaCl (0.73% w/v) en el tubo, luego se agitó con vórtex y se centrifugó a 3000 rpm a 4 °C durante 10 min. Posteriormente, se recuperó la fase orgánica, se volvió a adicionar nitrógeno y se evaporaron los solventes a 60 °C. Los lípidos obtenidos se mantuvieron en un desecador hasta adquirir temperatura ambiente (aprox. 1.5 h). Finalmente las muestras se pesaron y por diferencias de peso se obtuvo la concentración de lípidos.

7.6.5 Cuantificación de ácidos grasos mediante cromatografía de gases

Las muestras se liofilizaron, fueron puestas a peso constante y se pesaron en tubos de 5 mL. Se agregaron 25 μ L de heptadecanoato (C17:0; 4 mg mL⁻¹) como estándar interno a cada muestra, como analito patrón debido a que *P. tricornutum* no sintetiza este ácido

graso (Qiao et al., 2015). Las muestras se mantuvieron en atmósfera de N₂ para evitar la oxidación. La derivatización de los ácidos grasos se realizó con base en el protocolo previamente reportado por Liu et al. en 2015: a cada muestra se le añadieron 2.5 mL de H₂SO₄ (2%) en metanol, y las muestras fueron agitadas en un vórtex durante 30 s; después de eso, la reacción se mantuvo durante 1 h a 70 ° C. Luego, se añadieron 2 mL de n-hexano y 750 µL de agua y fueron agitadas en vórtex durante 30 s y centrifugadas para permitir la separación del hexano. Se recuperaron 1500 µL de n-hexano en un vial limpio. La fase de hexano se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno, para concentrar los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES). Los FAMES fueron resuspendidos en 200 µL de n-hexano.

Se utilizó el equipo de cromatógrafo de gases (Agilent, 6890) y la columna DB FATWAX UI (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). La temperatura del inyector fue de 250 °C y se utilizó helio como gas acarreador, con una proporción de Split 15:1. La temperatura del detector fue de 250 °C, con el flujo de H₂ de 35 mL min⁻¹, flujo de aire 350 mL min⁻¹ y flujo de helio de 1 mL min⁻¹. El volumen de inyección de la muestra fue de 1 µL. Las condiciones del horno fueron de 55 °C por 7 min, con una rampa de temperatura de 5°C min⁻¹ de 55 °C a 230 °C, y se mantuvo a 230 °C por 15 min. Los FAMES fueron analizados mediante un detector de ionización de flama (FID) a 250 °C. El tiempo total de cada corrida fue de 69.75 min.

7.6.6 Análisis de transcripción mediante PCR en tiempo real

Recuperación de células. 50 mL del cultivo de los cultivos en biorreactor fueron tomados en fase estacionaria (288 h de cultivo) y fueron centrifugadas a 4000 rpm, 20 min, a 4 °C. El paquete celular (~ 5x10⁷ cel.) fue congelado a -20 °C, hasta la realización de la extracción de RNA.

Extracción, purificación de RNA y análisis por PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Extracción del RNA. Las células fueron lisadas mediante sonicación a baja temperatura. Posteriormente, se empleó el Kit RNeasy Plant Mini para la extracción total de RNA según las instrucciones del proveedor (QIAGEN). La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría a 260 nm. La descripción de la técnica para la extracción del RNA presenta en el anexo 1. **Síntesis de cDNA.** Para la transcripción reversa se utilizó 1 µg de RNA de cada condición y se empleó el kit QuantiTect Rev. Transcription (QIAGEN), según la metodología recomendada por el proveedor. Los detalles de la técnica para la

extracción de RNA se presentan en el anexo 1. **PCR de tiempo real.** Se utilizó un equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer/ Applied Bio-systems) usando SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas Llife Science), de acuerdo con el procedimiento descrito en el anexo 1. La secuencia de cada uno de los oligonucleótidos utilizados para para el análisis del RT-qPCR se presenta en la Tabla 7.5. El gen *tbp* fue usado como gen de expresión constitutiva.

Tabla 7.5. Oligonucleótidos utilizados para los análisis de PCR en tiempo real.

Gen	Proteína codificada	Vía/Función	Oligonucleótido sentido (5' a 3')	Oligonucleótido antisentido (5' 3')
<i>tbp</i>	proteína de unión a la caja TATA	factor de transcripción	ACCGGAGTCAAGAG CACACAC	CGGAATGCGCGTATAC CAGT
<i>ptd5</i>	Δ 5-desaturasa	síntesis de ω -3	ATGCATGTACCTTA CCGTAGACA	AAAAAGACCCGGTGAAC CTGT
<i>acc1</i>	acetil-CoA carboxilasa	enzima con actividad carboxilasa (síntesis de malonil-CoA)	CACATTCTTGCCGG ATACCA	CGAACGACATCGTCCA AGAG
<i>me1</i>	malato deshidrogenasa	cataliza la reacción de oxidación de malato a oxalacetato	TTGCAAAAAGAGCG ATTCCT	TGTCGCGAACTCCATAC AAG
<i>hup1</i>	proteína membranal HUP+	transportador de hexosas / H +	GCGAGGTTGACGC TGAGT TT	GATGACAAAGCTGGTCA G TAG CT

7.6.7 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de los parámetros cinéticos, de la producción de biomasa, de lípidos y de los ácidos grasos utilizando el software Microsoft Excel V14. a estas variables respuesta se les aplicó un análisis ANOVA de un factor y una comparación de medias de Tuckey, con una confianza del 95% ($\alpha = 0.05$).

8. Resultados y discusión

8.1 Cinéticas de crecimiento en condiciones de mixotrofia, selección de cepa mutante y producción de EPA.

Con el objetivo de caracterizar y seleccionar de entre dos cepas mutantes de *P. tricorutum* UTEX 646 (LK1 y LK2) que expresan el gen *hup1* que codifica para el transportador de glucosa HUP+ de la microalga *C. kessleri* que permite una mayor velocidad de transporte de glucosa y por ende una mayor producción de biomasa, en comparación de la cepa silvestre (Krämer, 2022) y debido a las diferencias fenotípicas de estas. Se decidió realizar en una primera etapa la evaluación cinética de crecimiento, de producción de lípidos y de ácidos grasos de estas dos cepas mutantes, utilizando a la cepa silvestre UTEX 646 como cultivo control en condiciones de mixotrofia con una concentración de 1 g L⁻¹ de glucosa como fuente orgánica de carbono, se realizaron cultivos por triplicado a nivel de matraz. Para determinar la velocidad específica de crecimiento en *P. tricorutum*, se graficó en escala logarítmica respecto a la concentración celular inicial de células y mediante el modelo empírico reportado por Cerón-García en 2006 para crecimiento sigmoideal (Ecuación 2), en donde la Cf y Co son las concentraciones celulares en la fase exponencial e inicial del cultivo, respectivamente.

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{1}{t_i - t_f} [\text{Ln}(C_f/C_o)] \quad (2)$$

En la Figura 8.1 se presentan las cinéticas de crecimiento de los cultivos de las tres cepas evaluadas.

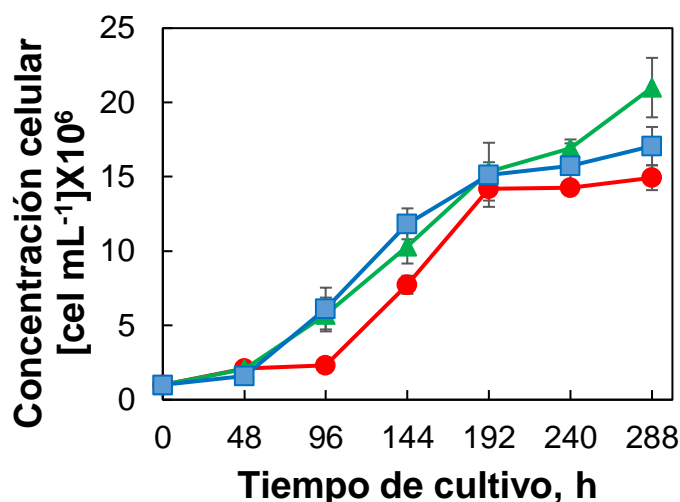


Figura 8.1 Cinética de crecimiento celular en condiciones de mixotrofia: medio ASP; volumen 50 mL; temperatura: 20 °C; pH: 7.7; 100 rpm; 30 μmol fotón m⁻²s⁻¹; 16 h luz-8 h obscuridad; 1 g L⁻¹ glucosa; Wt (●); LK1 (▲); LK2 (■).

En términos generales, en el crecimiento se puede observar como la cepa mutante LK1 se mantuvo ligeramente por encima de la cepa silvestre durante toda la cinética de crecimiento. Asimismo, a las 288 h la relación del crecimiento respecto a la concentración celular inicial ($\ln C/Co$) fue mayor para el caso de la cepa LK1, respecto a lo calculado en la cepa LK2 y la Wt. Los datos de crecimiento obtenidos en matraces son comparables a los obtenidos por Cerón-García en 2006 en cultivos de *P. tricornutum* UTEX-640 en condiciones de mixotrofia en presencia de glucosa. Sin embargo, tales cultivos fueron prolongados hasta las 500 h donde observaron un incremento del 20 % respecto a lo obtenido a las 288 h y según el patrón observado en la cinética de crecimiento se podría esperar un comportamiento similar.

La Tabla 8.1 resume los parámetros evaluados en cada cepa transformada y la cepa silvestre. Con respecto a la velocidad específica de crecimiento, las cepas mutantes LK1 y LK2 tuvieron un valor de 0.48 d^{-1} , el cual no fue significativamente mayor al obtenido en la cepa silvestre ($p \geq 0.05$). Cabe mencionar que la concentración celular máxima se obtuvo en la cepa LK1 ($21 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$), esto puede asociarse a un mayor consumo de glucosa 0.27 g L^{-1} al final de los cultivos a las 288 h, el cual fue estadísticamente mayor para la cepa LK1 ($p \text{ valor} \leq 0.05$), en comparación de la cepa LK2 (33 % menos) y la cepa silvestre (41 % menos) respecto a la concentración inicial de 1 g L^{-1} . Es importante mencionar que, en el cultivo con la cepa silvestre, se observó un consumo de glucosa alrededor del 14 % de la concentración inicial. Estos resultados de consumo de glucosa son comparables por los datos reportados por Krämer en 2022 para estas mutantes (LK1 y LK2) en una intensidad luminosa tres veces mayor a la utilizada en este estudio. Anteriormente, el consumo de glucosa por la cepa UTEX 646 no había sido reportado. No obstante, Cerón-García et al. en el 2006 reportaron la asimilación de esta fuente de carbono en la cepa de *P. tricornutum* UTEX 640, la cual presenta una alta proximidad a la UTEX 646. No obstante, se ha reportado por Villanova et al., en 2017 que *P. tricornutum* posee un sistema de transporte del tipo acuaporinas que permiten la asimilación de fuentes orgánicas de carbono (incluyendo a la glucosa) en la cepa silvestre. Por otra parte Patel et al., en 2019 para la misma cepa silvestre UTEX 646, pero cultivada en condiciones de cultivo diferentes en general, reportaron una mayor acumulación de biomasa en presencia de glucosa en comparación de cultivos en autotrofia.

Tabla 8.1 Resumen de parámetros cinéticos y de producción de lípidos bajo condiciones de mixotrofia.

Cepa	μ (d ⁻¹)	C _{máx} (cel mL ⁻¹) x10 ⁶	Ln (C/Co)	DW (g L ⁻¹)	Lípidos/ DW (% w/w)	Glc (g L ⁻¹)
Wt	0.40± 0.08 ^a	14.9 ±0.3 ^a	2.7±0.05 ^a	0.6 ± 0.07 ^a	18 ± 2 ^{ab}	0.86 ± 0.015 ^a
LK1	0.48± 0.04 ^a	21.6± 0.6 ^b	3.0±0.08 ^b	0.75 ± 0.04 ^b	23 ± 3 ^a	0.73 ± 0.020 ^b
LK2	0.48± 0.03 ^a	17.1± 0.6 ^a	2.8±0.04 ^c	0.58 ± 0.06 ^a	14± 2 ^b	0.82 ± 0.014 ^c

Las letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA1 factor con prueba Tukey al 95 % de confiabilidad.

La producción de biomasa, al final del cultivo (12 días) fue de 0.75 ± 0.04 y 0.58 ± 0.06 g L⁻¹ para las cepas mutantes LK1 y LK2, respectivamente. Esta producción de biomasa en la cepa LK1 fue 0.25 veces mayor a lo obtenido en la cepa silvestre. Cabe mencionar que, en condiciones de mixotrofia, en las cepas mutantes LK1, LK2 y en la Wt se obtuvieron porcentajes de lípidos de alrededor del 23,14 y 18 % respecto a la biomasa total seca, respectivamente.

El porcentaje de los ácidos grasos presentes en cada una de las evaluaciones, se muestran en la Figura 8.2a. en las cepas mutantes LK1 y LK2 se presentaron diferencias opuestas respecto a la cepa silvestre en el porcentaje de los ácidos grasos de cadena corta (C14 a C17), mismos que se encuentran presentes en mayor abundancia en la formación de triacilgliceroles en *P. tricornutum* (Lupette et al., 2019), mientras que los ácidos grasos de mayor longitud e insaturaciones (>C18) en las cepas mutantes permanecieron sin cambios en el porcentaje de estos ácidos grasos respecto a la cepa silvestre. Se ha reportado por Lupette et al., (2019) que los porcentajes de los ácidos grasos de mayor longitud (>C18) se encuentran en menor abundancia en la formación de los triacilgliceroles en *P. tricornutum* lo que podría sugerir la ausencia de diferencias en los porcentajes de ácidos grasos de mayor longitud (incluyendo EPA). Estos cambios entre las mutantes y la cepa silvestre podrían estar relacionados principalmente a las diferencias fenotípicas debido a la inserción del transportador de glucosa HUP+ mismas que permitieron un incremento en la producción de biomasa y de lípidos en la cepa LK1, respecto a la cepa LK2 (Tabla 8.1) y posiblemente estén afectando el flujo de carbono a la biosíntesis de ácidos grasos en las cepas mutantes.

Cabe resaltar que las mayores diferencias se observaron en el perfil de FAMES de la cepa LK1, con respecto a la cepa LK2 y la Wt, principalmente la disminución en el porcentaje de ácidos grasos saturados, el cual fue del 19 % (Fig. 8.2b). En contraste, en la cepa silvestre y la cepa LK2 este valor fue de 30 y 40 %, respectivamente. Por otro lado, se encontró un aumento (de 13%, respecto a la cepa silvestre) en el porcentaje de ácidos grasos insaturados en la mezcla lipídica de la cepa LK1. Por último, el porcentaje de EPA y DHA en la mezcla de ácidos grasos se mantuvo constante tanto en las cepas mutantes LK1 y LK2, respecto a los porcentajes obtenidos en la cepa silvestre. Lo que podría sugerir que la actividad de las enzimas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas para la biosíntesis de EPA y DHA respectivamente no se vean afectadas por los cambios en los porcentajes de los ácidos grasos saturados e insaturados en la cepa mutante LK2 y LK1 respectivamente y en comparación con la cepa silvestre.

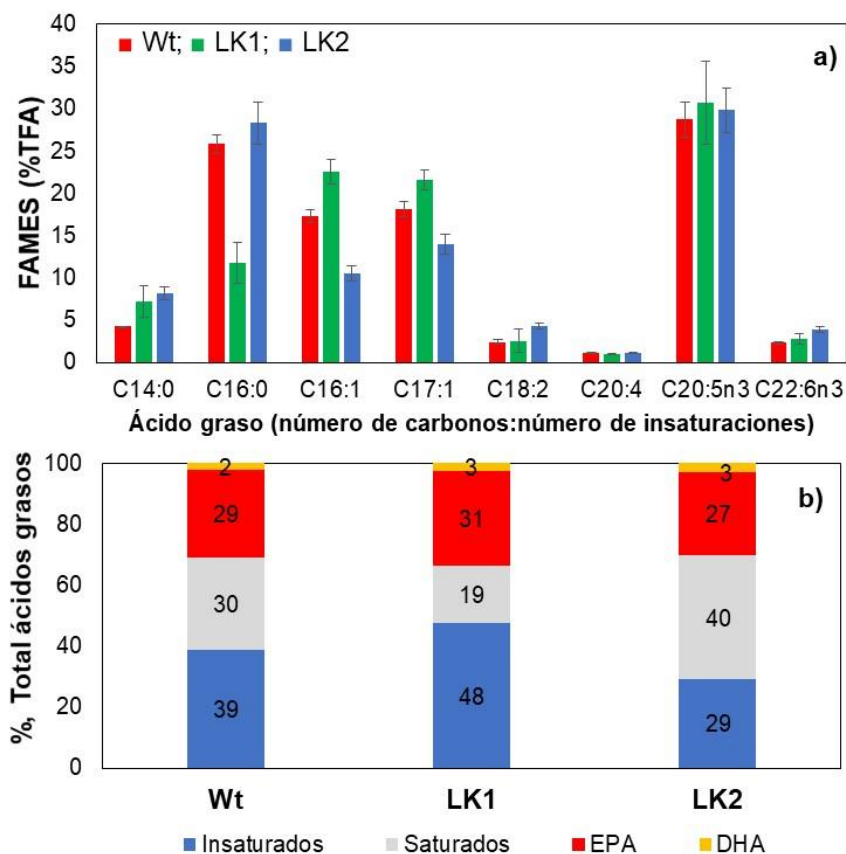


Figura 8.2 a) Perfil de ácidos grasos de *P. tricornutum* en cultivos mixotróficos evaluados al punto final de la cinética. En la figura se muestra el promedio de las mediciones, n=3. b) Porcentaje de ácidos grasos en términos de su clasificación.

Como se muestra en la Figura 8.3, en términos de la producción específica de ácidos grasos (respecto a la biomasa) se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de los siguientes ácidos grasos C14:0; C16:0; C16:1; C17:1 para las diferentes cepas. Dentro de estas diferencias, en el caso de la cepa LK1 cabe resaltar una disminución del 55 % en el contenido de ácido palmítico (C16:0), respecto al contenido en la cepa silvestre y la cepa LK2. Estos cambios en el contenido de ácidos grasos saturados en la cepa LK1 podrían tener relación directa a los incrementos en el contenido de MUFAs y PUFAs. Sin embargo, la concentración específica de C18:2; C20:4; C20:5 (EPA); y C22:6 en la cepa LK1 no mostró cambios en su contenido en los cultivos ($p > 0.05$), respecto a lo observado en la cepa silvestre y la cepa LK2 (Tabla A.2).

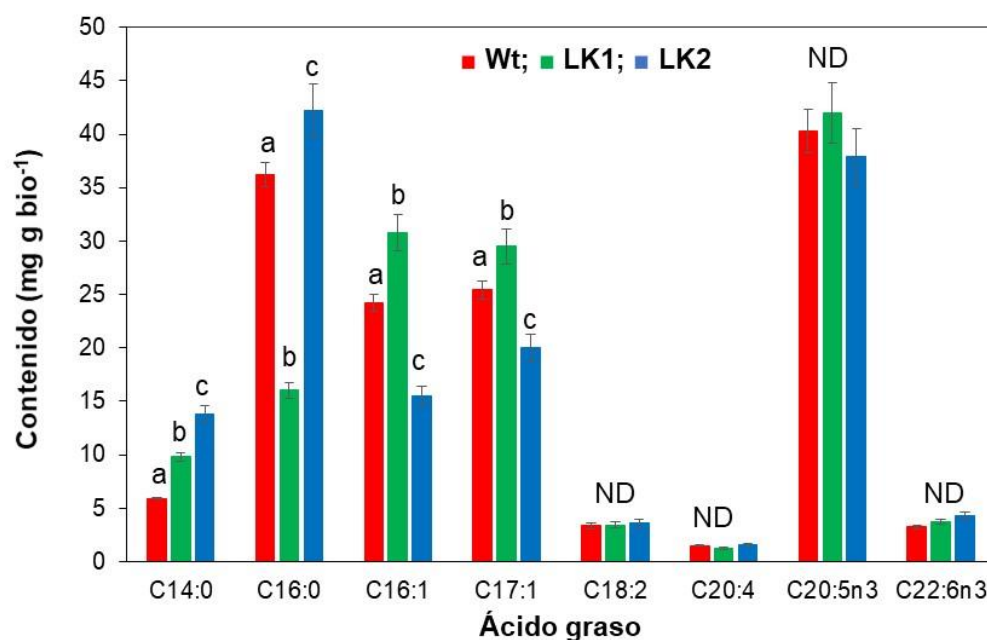


Figura 8.3 Contenido de ácidos grasos de *P. tricornutum* en cultivos mixótrofos evaluados al punto final de la cinética. En la figura se muestra el promedio de las mediciones, n=3.

ANOVA 1 factor con prueba Tukey al 95 % de confiabilidad.

Como se mencionó anteriormente, la producción y acumulación de ácidos grasos difiere entre cada especie de microalga y en función de las condiciones de cultivo. Se ha reportado que la síntesis de EPA es mayor cuando las condiciones de cultivo son favorables para incrementar la concentración de biomasa y por ende del contenido de ácidos grasos en la misma (Adarme-Vega, 2014). En nuestro caso particular, como se muestra en la Tabla 8.2, en la cepa mutante LK1 se alcanzó una producción específica de $41.94 \pm 2.83 \text{ mg}_{\text{EPA}} \text{ g}_{\text{Bio}}^{-1}$, misma que no evidenció diferencias respecto a la cepa LK2 y la Wt. Sin embargo, la producción volumétrica de EPA y la productividad de EPA de 31.4

$\pm 3.4 \text{ mg L}^{-1}$ y $2.61 \pm 0.28 \text{ mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$, respectivamente fueron superiores a lo obtenido en la cepa mutante LK2 y la silvestre debido principalmente a una mayor producción de biomasa (Tabla 8.1). En términos de productividad de EPA, nuestros resultados fueron 30 % y 26 % menores, respecto a la productividad reportada por Cerón-García en 2005 en cultivos en matraces para la cepa UTEX 640 en ausencia y presencia de glucosa, respectivamente. Es importante resaltar que para la condición de mixotrofia probada a nivel de matraz existen diferencias significativas en la producción volumétrica del 23 % y 27 % alcanzados por la cepa mutante LK1, en comparación a la cepa silvestre y la cepa mutante LK2 respectivamente ($p \leq 0.05$).

Debido a estas ventajas en la producción volumétrica de EPA y a la mayor producción de biomasa, así como la disminución en el porcentaje de ácidos grasos saturados, se seleccionó la cepa mutante LK1 para su posterior evaluación en biorreactor de 1L.

Tabla 8.2 Producción y productividad de EPA en cultivos de *P. tricornutum*

Cepa	Contenido ($\text{mg}_{\text{EPA}} \text{g}_{\text{Bio}}^{-1}$)	EPA (mg L^{-1})	%EPA/Lípidos totales	Productividad ($\text{mg}_{\text{EPA}} \text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$)
Wt	40.26 ± 2.04^a	24.1 ± 2.3^a	17 ± 2^a	2.01 ± 0.19
LK1	41.94 ± 2.83^a	31.4 ± 3.4^b	21 ± 2^a	2.61 ± 0.28
LK2	38.96 ± 2.73^a	22.7 ± 2.4^a	28 ± 4^b	1.89 ± 0.2

ANOVA 1 factor con prueba Tukey al 95 % de confiabilidad.

8.2 Evaluación en cultivo lote en biorreactor de 1 L

Para estudiar el efecto de la transferencia de oxígeno (k_{La}) sobre la producción de EPA y ω -3 en *P. tricornutum*, se evaluaron la cepa mutante LK1 y la cepa silvestre por triplicado en biorreactores de 1L. En una segunda etapa se estimaron los coeficientes globales iniciales de transferencia de oxígeno mediante el método del sulfito (Anexo 2). Se utilizaron dos condiciones de agitación (150 y 250 rpm) y una condición de aireación (0.66 vvm); los valores de k_{La} fueron 66 y 122 h^{-1} . Estos valores fueron definidos como condición de baja y alta transferencia de oxígeno, respectivamente.

8.2.1 Efecto de la transferencia de oxígeno en la cepa mutante LK1

Como se puede apreciar en la Figura 8.4A, el crecimiento celular de la cepa LK1 en las dos condiciones de transferencia de oxígeno fue similar. Sin embargo, se puede observar

que en condiciones de baja transferencia de oxígeno (66 h^{-1}) los valores de la concentración fueron superiores luego de las 144 h del cultivo, respecto a la condición de alta transferencia de oxígeno. Este comportamiento en el crecimiento puede deberse al hecho de que en alta transferencia de oxígeno se vea afectado el proceso de fijación de carbono. En *P. tricornutum* se ha descrito que en condiciones de alta aireación el proceso de fijación de carbono se ve mitigado por la actividad oxigenasa de la enzima RuBisCo que induce al proceso de fotorrespiración (Villanova et al., 2017).

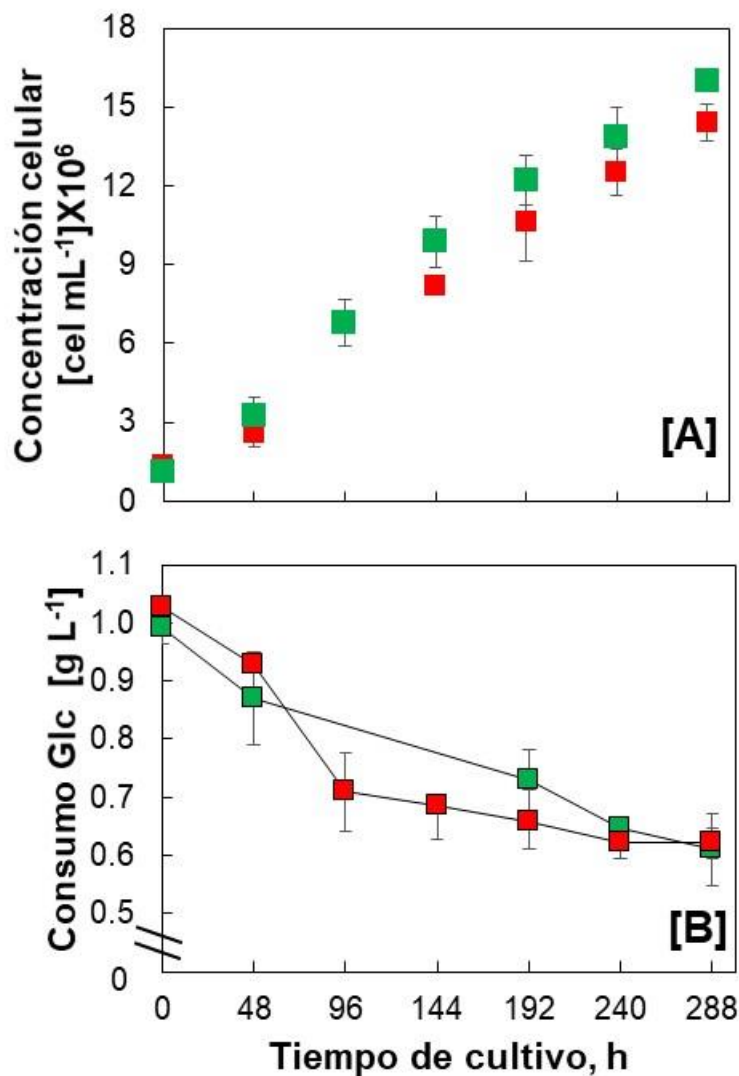


Figura 8.4 A) Cinética de crecimiento *P. tricornutum* UTEX 646 y B) glucosa; medio ASP; volumen 750 mL; temperatura: 20 °C; pH: 7.7; 16 h luz-8 h oscuridad; cepa mutante LK1 (■) $k_{La}=66 \text{ h}^{-1}$; (■) 122 h^{-1} .

En cuanto al consumo de glucosa (Fig 8.4B), se puede observar que para ambas condiciones de transferencia de oxígeno la cepa LK1 no logró agotar el contenido inicial de glucosa, obteniéndose un porcentaje del consumo total del 40 y 38% en baja y alta transferencia de oxígeno, respectivamente. Los cambios en crecimiento celular podrían estar asociados a los cambios de pH que se observaron al final de los cultivos; en baja transferencia de oxígeno se observaron valores de pH de 8.1 y de 8.6 en la condición de alta transferencia de oxígeno, los cuales determinan a su vez la solubilidad del CO₂.

La velocidad específica de crecimiento para el cultivo de la cepa mutante LK1 tanto en baja y en alta transferencia de oxígeno se mantuvo con un valor de 0.5 d⁻¹. Lo anterior indica que la cepa LK1 se mantuvo con un comportamiento similar durante toda la cinética de crecimiento. No obstante, luego de las 144 h, la concentración celular de los cultivos en baja transferencia de oxígeno permaneció por encima de la condición de mayor transferencia. Respecto a lo reportado para *P. tricornutum* en condiciones de mixotrofia con la adición de glucosa, se observó un aumento del 38 % en la concentración celular (Hamilton et al., 2016). Tales autores llevaron a cabo sus experimentos a 60 rpm y a una intensidad luminosa constante de 60 μmol fotón m⁻²s⁻¹. Este incremento podría deberse a una mayor eficiencia en el metabolismo por el uso de fotoperíodos (16 h luz- 8 h oscuridad) y a una mayor aireación en el sistema (0.66 vvm), respecto a lo observado por Hamilton.

Por otra parte, como se muestra en la Tabla 8.3, respecto a la producción de biomasa en la cepa LK1 en baja transferencia de oxígeno, se logró producir 0.8 ± 0.2 g L⁻¹, es decir un 16% más respecto a lo obtenido en la condición de alta transferencia de oxígeno, pese a que las concentraciones celulares son estadísticamente diferentes, no se observó una relación directa entre el peso seco y el recuento celular, esto podría explicarse a la limitación de la técnica de recuento celular la cual no discrimina el tamaño celular entre las poblaciones, cabe señalar que en las condiciones operacionales en las que se realizaron los cultivos se presentó una gran variedad en el tamaño de las células en alta transferencia de oxígeno (122 h⁻¹), posiblemente al estrés generado por los cambios en la hidrodinámica del sistema (Contreras et al., 1998). Asimismo, se obtuvo un porcentaje del 26 ± 3 % de lípidos respecto a la biomasa total seca en la condición de baja transferencia de oxígeno, es decir, se enriqueció la fracción lipídica en un 27 % en comparación a lo obtenido en la cepa LK1 en alta transferencia de oxígeno.

Tabla 8.3 Comparación de la velocidad específica de crecimiento y los parámetros de producción en la cepa LK1 a nivel biorreactor de 1 L.

k_{La} , h^{-1}	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d^{-1})	$C_{m\acute{a}x}$ ($cel\ mL^{-1}$) $\times 10^6$	Ln (C/Co)	DW ($g\ L^{-1}$)	Lípidos/DW (% w/w)	Consumo Glc (%)
122	0.48 ± 0.03^a	14 ± 0.1^a	2.34	0.4 ± 0.1^a	19 ± 3^a	38 ± 2^a
66	0.52 ± 0.03^a	16 ± 0.4^b	2.65	0.8 ± 0.2^b	26 ± 3^b	40 ± 3^a

Las letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA 1 factor con prueba Tukey al 95 % de confiabilidad.

En lo que se refiere al contenido de ácidos grasos totales, en la Figura 8.5 una de las diferencias más evidentes fue un menor contenido de ácidos grasos en la condición de baja transferencia de oxígeno, respecto a la condición de mayor transferencia. En este sentido, en trabajos previos de Song et al., (2014) reportaron un comportamiento semejante en lo que se refiere al contenido total de ácidos grasos en cultivos de *P. tricornutum* a diferentes tasas de aireación y al contenido total de ácidos grasos, el cual a menor transferencia de masa obtuvieron un menor contenido de ácidos grasos.

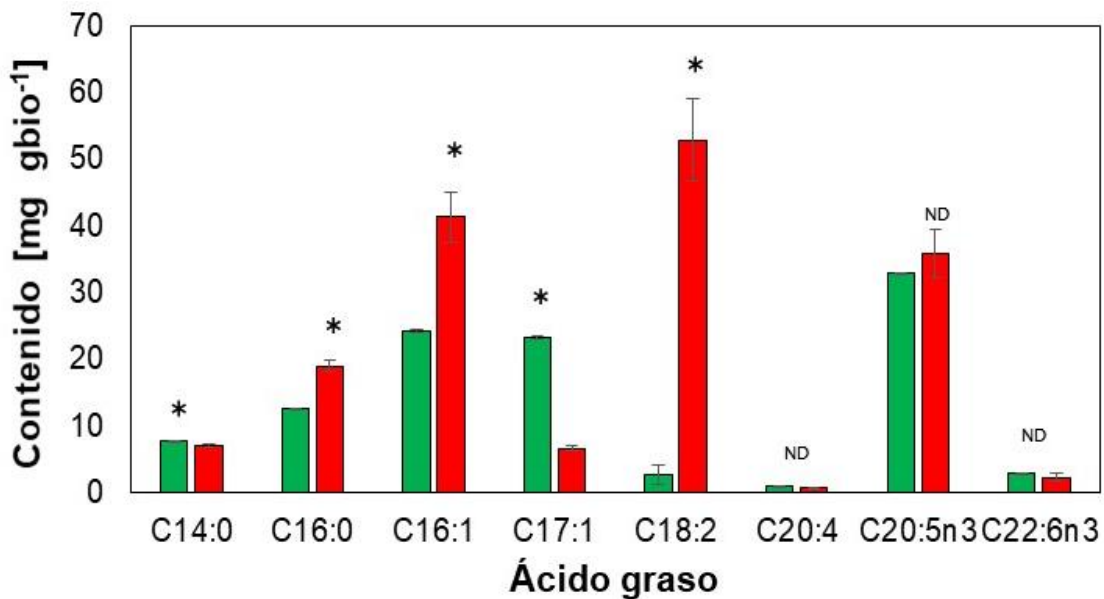


Figura 8.5 Contenido de ácidos grasos ($mg\ g\ bio^{-1}$) en la cepa mutante LK1 (■) $k_{La}=66\ h^{-1}$; (■) $122\ h^{-1}$.

Los asteriscos en la parte superior de las barras indican diferencias significativas según ANOVA, $p=0.05$. ND: Indica no diferencias entre los ácidos grasos evaluados. Las barras de error indican la desviación estándar de muestras tomadas de tres experimentos independientes.

En cuanto al contenido de EPA y DHA, estos se mantuvieron constantes para ambas condiciones de cultivo: un contenido promedio de $35 \text{ mg}_{\text{EPA}} \text{ g}_{\text{bio}}^{-1}$ y de $3 \text{ mg}_{\text{DHA}} \text{ g}_{\text{bio}}^{-1}$ para la cepa LK1. Este comportamiento constante en el contenido de EPA y DHA bajo diferentes condiciones de transferencia de masa ha sido reportado anteriormente por Wu et al., (2019).

Sin embargo, en cuanto al porcentaje de EPA respecto al total de ácidos grasos, se observaron claras diferencias: un 30 % EPA TFA⁻¹ en baja transferencia y un 21 % EPA TFA⁻¹ en alta transferencia de oxígeno. Estos cambios en la composición de estos ácidos grasos insaturados tienen un papel relevante en el proceso de división celular y en la composición de las membranas de algunos organelos (Olofsson et al., 2012). Esta relación de producción de biomasa/ácidos grasos insaturados concuerda con nuestros datos obtenidos de crecimiento en la condición de baja transferencia de oxígeno (66 h^{-1}).

En cuanto al contenido de otros ácidos grasos sintetizados en *P. tricornutum* (Fig. 8.5), en la condición de alta transferencia de oxígeno se favoreció un incremento de 0.5 veces en el contenido de C16:0, de 0.7 veces de C16:1 y de 18 veces de C18:2, respecto a la condición de baja transferencia de oxígeno. Asimismo, el único ácido graso que incrementó su contenido en la condición de baja transferencia de oxígeno fue el C17:1 (2.4 veces), respecto a la condición de alta transferencia de oxígeno.

Con base a los resultados obtenidos en los perfiles de ácidos grasos en el intervalo de transferencia de oxígeno probado en estos experimentos, existe una clara diferencia en el contenido total de ácidos grasos (Tabla 8.4). Se observó un incremento en el contenido total de ácidos grasos (0.5 veces) en la condición de alta transferencia de oxígeno, respecto a la condición de menor transferencia. No obstante, la producción volumétrica de ácidos grasos se vio favorecida un 23 % en la condición de baja transferencia de oxígeno, respecto a los $66.5 \pm 6.2 \text{ mg}_{\text{TFA}} \text{ L}^{-1}$ obtenido en la condición de mayor transferencia de oxígeno. Esto puede explicarse debido a una mayor producción neta de biomasa en la condición de baja transferencia de oxígeno en comparación de la condición de mayor transferencia. Se ha reportado por Kazbar et al., (2019) que el incremento en la transferencia de oxígeno puede inhibir el crecimiento en los cultivos fotosintéticos de microalgas.

Tabla 8.4 Contenido, producción y productividad de FAMES y EPA en cultivos de *P. tricornutum* LK1.

$k_L a, h^{-1}$	TFA		Contenido ($mg\ g_{Bio}^{-1}$)	EPA/TFA (%)	EPA	
	$mg\ g_{Bio}^{-1}$	$mg\ L^{-1}$			Producción ($mg\ L^{-1}$)	Productividad ($mg_{EPA}\ L^{-1}d^{-1}$)
122	166.3 ± 15.6^a	66.5 ± 6.2^a	35.9 ± 3.5^a	21.6	14.5 ± 4.9^b	1.2 ± 0.41
66	107.7 ± 2.3^b	86.8 ± 1.8^b	33.2 ± 1.7^a	30.8	26.6 ± 2.3^a	2.21 ± 0.19

Las letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA 1 factor con prueba Tukey al 95 % de confiabilidad. Producción total de ácidos grasos (TFA).

En contraste, la producción de EPA incrementó (0.83 veces) en la condición de baja transferencia de oxígeno, respecto a la condición de mayor transferencia. De nueva cuenta, esto coincide con el trabajo de Yongmanitchai & Ward (1991) donde observaron una dependencia lineal entre la producción de EPA y de biomasa. Por último, la productividad aumentó un 45 % en la condición de baja transferencia de oxígeno, respecto a la condición de alta transferencia.

De los experimentos realizados en biorreactor con la cepa mutante LK1, se puede concluir que la condición de transferencia de oxígeno afecta el contenido total de los ácidos grasos en la condición de mayor transferencia ($122\ h^{-1}$) en la cual se obtuvo un mayor contenido (alrededor de $166\ mg_{TFA}\ g_{Bio}^{-1}$) mientras que para la condición de baja transferencia el contenido total de ácidos grasos fue menor ($107\ mg_{TFA}\ g_{Bio}^{-1}$). Este incremento en el contenido de ácidos grasos totales en condiciones de alta transferencia podría estar asociado con el incremento de la producción de ácidos grasos saturados (Anexo 3: Tabla A.3). Este efecto fue descrito anteriormente por Shi et al., en 2017 donde se proponen mecanismos de señalización donde el estrés oxidativo generado por el alto contenido de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de oxígeno generan estrés en el retículo endoplásmico lo cual está ligado a la formación de TAGs, lo cual podría explicar un mayor contenido de ácidos grasos totales en la condición de alta transferencia de oxígeno. No obstante, el porcentaje de EPA dentro de la mezcla total de ácidos grasos fue 0.3 veces mayor en baja transferencia de oxígeno, respecto a la condición de alta transferencia. Shi et al., (2017) y Sun et al., (2018) reportaron que para contener el efecto del estrés oxidativo, las microalgas pueden emplear a los PUFAs como antioxidantes, que posteriormente son llevados a la degradación de estos hasta alcanzar la homeostasis.

Por otro lado, para la cepa LK1 la condición de transferencia de oxígeno parece no tener un papel relevante en el contenido de EPA. El contenido de EPA permaneció relativamente constante para ambas condiciones de cultivo. Sin embargo, como se comentó anteriormente, en la condición de baja transferencia de oxígeno (66 h^{-1}) se favoreció la producción de biomasa, impactando directamente a una mayor producción de EPA un 45 % más respecto a la condición de alta transferencia de oxígeno.

8.2.2 Expresión génica en la cepa mutante LK1

Con el objetivo de entender el posible efecto de la transferencia de oxígeno en la producción de ácidos grasos se decidió realizar un acercamiento en la evaluación de la expresión de algunos genes, mediante RT-qPCR, involucrados en la biosíntesis de estos. Como se describió en la hipótesis de este trabajo en condiciones de baja transferencia de oxígeno esperamos un mayor nivel de transcritos en comparación de los cultivos a mayor transferencia. Se decidió medir los niveles de los transcritos de los genes *acc1*, *ptd5*, *me1* y *hup1*, los cuales codifican para las enzimas acetil-CoA carboxilasa, $\Delta 5$ -desaturasa, malato deshidrogenasa y la proteína HUP+ del transportador de glucosa de la cepa mutante LK1. En el caso de los genes que codifican para las enzimas se seleccionaron debido a que con anterioridad se han reportado trabajos de ingeniería genética en donde a mayor sobreexpresión de estos transcritos mayor producción de EPA en *P. tricornutum* (Domergue et al., 2002; Peng et al., 2014; Xie et al., 2013). Los resultados de la expresión génica en estos cultivos fueron normalizados tomando como referencia la expresión génica de los cultivos desarrollados en baja transferencia de oxígeno (66 h^{-1}). Se evaluó la expresión génica en la fase estacionaria (288 h de cultivo). Como se muestra en la Figura 8.6, la expresión de todos los genes fue significativamente más alta en los cultivos desarrollados en alta transferencia de oxígeno (122 h^{-1}) estos resultados bajo esta condición podrían tener una posible relación a un mayor contenido de ácidos grasos totales ($\text{mg}_{\text{TFA}} \text{g}_{\text{bio}}^{-1}$; Tabla 8.4) y a un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados (C16:1 y C18:2; Fig. 8.5). Esto podría deberse a una mayor expresión de los genes *acc1*, *ptd5* y *me1*; y posiblemente al efecto del oxígeno en los cultivos. Cabe destacar que a pesar de una mayor expresión del gen *ptd5* en la condición de alta transferencia (122 h^{-1}), éste no tuvo un efecto directo en el contenido y producción de EPA, en comparación con lo obtenido bajo la condición de menor transferencia. Este efecto entre la producción de EPA y la expresión génica del gen *ptd5* ha sido estudiado por Peng et al., en 2014 y por

Domergue et al., en 2002, donde se ha visto que la sobreexpresión del gen *ptd5* podría tener un papel más relevante en la producción de ácidos grasos insaturados como C16:1, C18:2, C20:1, además de destacar que otros factores de regulación ligados principalmente al crecimiento podrían afectar la producción de EPA en *P. tricornutum*.

En el caso del gen *hup1*, recientemente en los experimentos realizados en la tesis de doctorado de Liv Krämer en 2022, se determinó que la expresión del gen *hup1* no se ve inducida por efecto de la concentración de glucosa en el medio, asimismo se observó que la expresión de este gen se ve afectada por la longevidad de los cultivos, y por último, se observó que la expresión del gen *hup1* y la función del transportador de glucosa HUP+ al cual codifica, está ligado a los cambios en el pH en los cultivos a valores por encima de pH 8 este incrementa el transporte de glucosa al medio celular. Respecto a los resultados obtenidos el gen *hup1*, este se sobre expresó en mayor medida en la condición de mayor transferencia de masa (122 h^{-1}) en el medio lo que sugiere exista un mayor transporte de la glucosa dentro del medio citoplasmático en esta condición. En la Figura 8.4b se observa que la velocidad de consumo de glucosa durante las primeras 96 h del cultivo fue considerablemente más alta que la observada en la condición de baja transferencia de oxígeno. Sin embargo, el incremento en la expresión de este gen no está ligada directamente al consumo de glucosa de la microalga (Fig. 8.4B) al final del cultivo (288 h). Una posible explicación podría ser que exista una inhibición de la enzima glucosa-6-fosfato a mayores concentraciones de glucosa incorporada al citoplasma, lo que se podría ver reflejado en el consumo de glucosa a partir de las 96 h en la condición de k_{La} de 122 h^{-1} (Fig. 8.4B).

Se puede destacar un efecto claro en la expresión génica en respuesta a las condiciones de transferencia de oxígeno probadas. Sin embargo, este efecto no determinó de forma concomitante los niveles de producción de EPA en los cultivos de *P. tricornutum*. Ello podría deberse al tiempo en que los análisis fueron llevados a cabo, al final de los cultivos en fase estacionaria tardía donde la actividad de la $\Delta 5$ desaturasa encargada de formar dobles enlaces para la formación de EPA puede presentar una menor actividad (Peng et al., 2014), es decir, una regulación a nivel traducción. Es importante mencionar que se requiere de estudios más específicos a nivel transcriptómica y lipidómica para dilucidar estos aspectos.

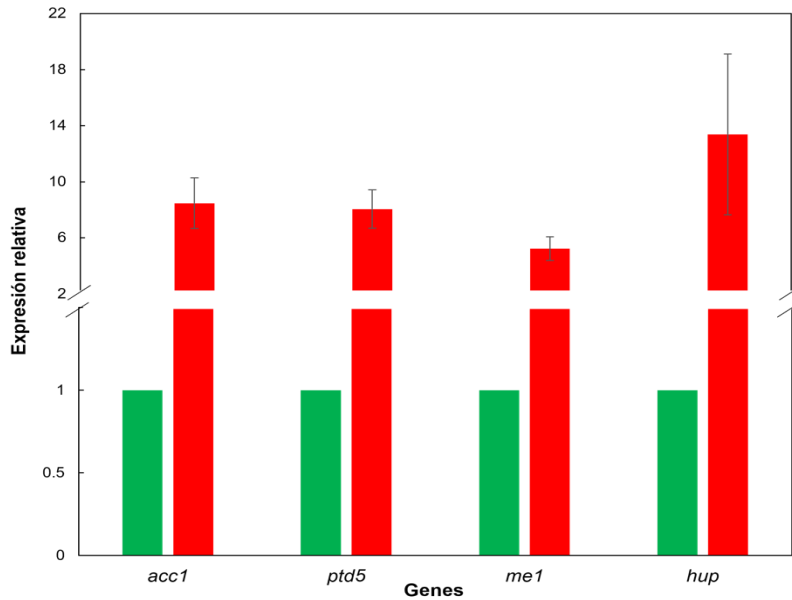


Figura 8.6 Expresión relativa de *acc1*, *ptd5*, *me1* y *hup* en fase estacionaria en los cultivos de la cepa mutante LK1 en baja (■) y alta (■) transferencia de oxígeno. El análisis de la transcripción génica se realizó empleando al gen *tth* como gen de referencia. Los datos están normalizados a la condición de baja transferencia de oxígeno.

8.2.3 Efecto de la transferencia de oxígeno en la cepa silvestre

Después de analizar el efecto de la transferencia de oxígeno en la cepa mutante LK1, se decidió evaluar a la cepa silvestre bajo las mismas condiciones de cultivo en el biorreactor de 1L con el objetivo de comparar este efecto en ambas cepas. Como se observa en las Figura 8.7A, las condiciones de transferencia de oxígeno no impactaron en el crecimiento de la cepa silvestre en los intervalos probados en las 288 h del cultivo. Este comportamiento fue similar a lo observado en la cepa LK1 (Fig. 8.4A) mientras que las concentraciones celulares fueron ligeramente menores en la cepa silvestre, respecto a la concentración observada en la cepa LK1 (comparación sobre la misma condición de cultivo).

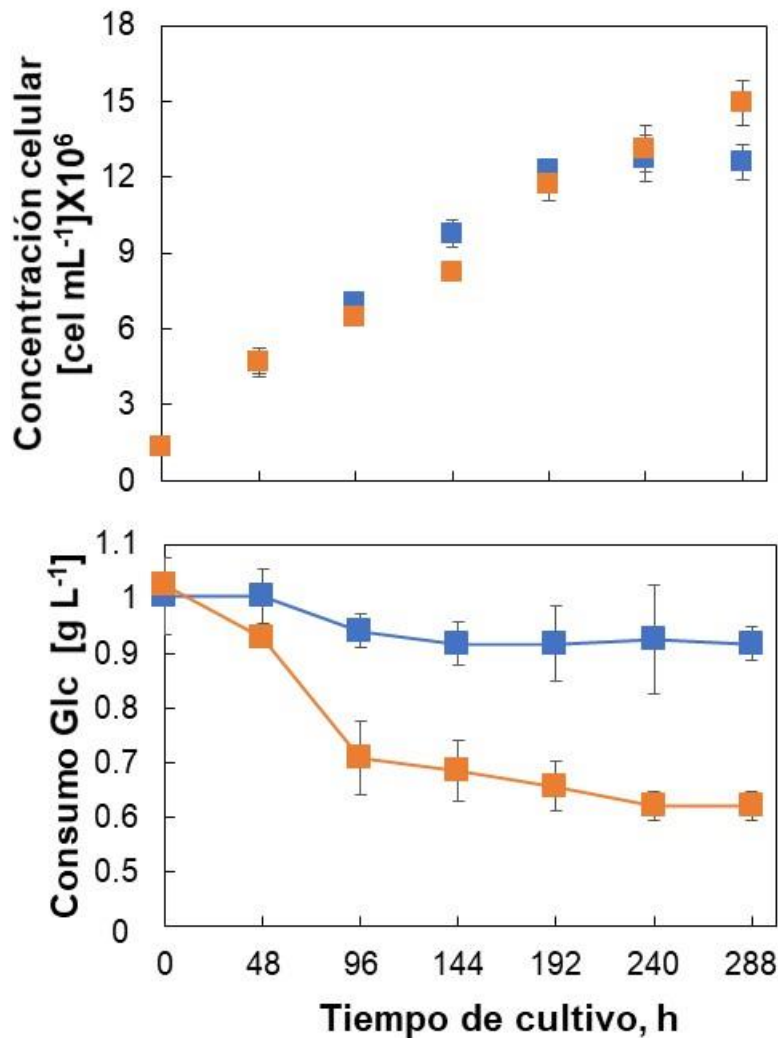


Figura 8.7 A) Cinética de crecimiento *P. tricornutum* UTEX 646 y B) concentración de glucosa; medio ASP; volumen 750 mL; temperatura: 20 °C; pH: 7.7; 16 h luz-8 h oscuridad; cepa silvestre (■) $k_L a = 66 \text{ h}^{-1}$; (■) 122 h^{-1} .

En relación con el consumo de glucosa en la cepa silvestre (Fig. 8.7B), se observaron diferencias a partir de las 48 h del cultivo en la condición de alta transferencia (122 h^{-1}). Al final de los cultivos, en la condición de $k_L a$ alto la cepa consumió el 38% de la glucosa disponible mientras que a $k_L a$ de 66 h^{-1} sólo consumió el 9 % de ella. Este efecto podría estar relacionado al incremento de la transferencia de CO_2 en el medio y por ende al proceso de fijación de este en la fotosíntesis; por lo que al disponer de la fuente inorgánica de carbono se ve reflejado en la preferencia de esta fuente de carbono, en

comparación de la glucosa. Este comportamiento se ha reportado con anterioridad por Yongmanitchai & Ward en 1991 evidenciando cambios en el pH al final de los cultivos que favorecen la solubilidad del CO₂ en la fase líquida y por ende de su consumo en cultivos de *P. tricornutum*. Asimismo, Matsui et al., en 2018 reportaron la presencia de transportadores del tipo acuaporinas en *P. tricornutum* que permiten una mayor eficiencia en metabolismo autótrofo, facilitando el proceso de fotosíntesis a mayor transferencia de masa, evitando el efecto de fotorrespiración. Es importante remarcar que en la condición de baja transferencia de oxígeno (66 h⁻¹) a pesar de no haber altos consumos de glucosa el crecimiento celular en términos de concentración celular fue similar al observado en la condición de mayor transferencia, lo que podría explicarse en función de una alta fijación de CO₂ debido a mecanismos concentradores de esta fuente inorgánica y a la actividad de la enzima carbono anhidrasa (CA) que incrementan el proceso energético y el flujo de CO₂ durante la fotosíntesis en *P. tricornutum* en bajas concentraciones de CO₂ en el medio (Tsuji et al., 2017).

En la Tabla 8.5 se presenta un resumen de los parámetros cinéticos de los cultivos de la cepa silvestre en biorreactor para ambas condiciones de transferencia de oxígeno. Como se muestra, la velocidad específica de crecimiento (μ) fue la misma para ambas condiciones de transferencia de oxígeno en la cepa silvestre. Sin embargo, hubo un incremento significativo del 15 % en la concentración celular máxima ($C_{m\acute{a}x}$) en la condición de alta transferencia de oxígeno, respecto a la condición de menor transferencia a las 288 h. La producción de biomasa al final de los cultivos (288 h) fue la misma (0.6 g L⁻¹) para ambas condiciones de cultivo.

Tabla 8.5 Comparación de la velocidad específica de crecimiento y parámetros de producción en la cepa silvestre a nivel biorreactor 1 L.

k_{La} , h ⁻¹	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d ⁻¹)	$C_{m\acute{a}x}$ (cel mL ⁻¹) $\times 10^6$	Ln (C/Co)	DW (g L ⁻¹)	Lípidos/ DW (% w/w)	Consumo Glc (%)
122	0.57 ± 0.02 ^a	14.9±0.9 ^a	2.41	0.6 ± 0.1 ^a	23 ± 2 ^a	38 ± 2 ^b
66	0.54 ± 0.04 ^a	12.6±0.7 ^b	2.24	0.7 ± 0.1 ^a	29 ± 2 ^b	9 ± 3 ^a

Las letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA1 factor con prueba Tukey al 95 % de confiabilidad.

Cabe destacar que el contenido de lípidos se enriqueció un 20% en la condición de baja transferencia de oxígeno respecto a la condición de mayor transferencia. Estas diferencias podrían estar relacionadas a cambios en el sobreflujo de carbono como se ha reportado por Wu et al., en 2019 en menor disponibilidad del oxígeno se favorece la biosíntesis de ácidos grasos debido a la desviación del acetil-CoA hacia esa ruta, lo cual ocasiona una disminución de la actividad del ciclo de Krebs, además se ha reportado que en ausencia del O₂ como aceptor final de la cadena transportadora de electrones, la poza de NADPH es utilizada para la biosíntesis de lípidos (Wu et al., 2019).

Es importante mencionar que, como en el caso de la cepa mutante LK1, se presentaron diferencias interesantes en el contenido de ácidos grasos en la cepa silvestre. Como se muestra en la Figura 8.8, en los cultivos de la cepa silvestre en baja transferencia de oxígeno (66 h⁻¹) se observó una disminución en C14:0 (2.2 veces menos), C16:1 (2.85 veces menos), C18:2 (10.5 veces menos) y C20:4 (2.3 veces menos), respecto a la condición de alta transferencia de oxígeno (122 h⁻¹). No obstante, el contenido de C17:1 fue el único ácido graso que logró un incremento (3 veces más), respecto a la condición de alta transferencia. Por último, el contenido de EPA (mg g_{bio}⁻¹) en alta transferencia de oxígeno aumentó de forma significativa (45%) (Fig. 8.8.), en comparación con la condición de menor transferencia. Estos últimos resultados, contrastan respecto a los datos obtenidos con la cepa LK1 en ambas condiciones de cultivo donde el contenido de EPA se mantuvo constante.

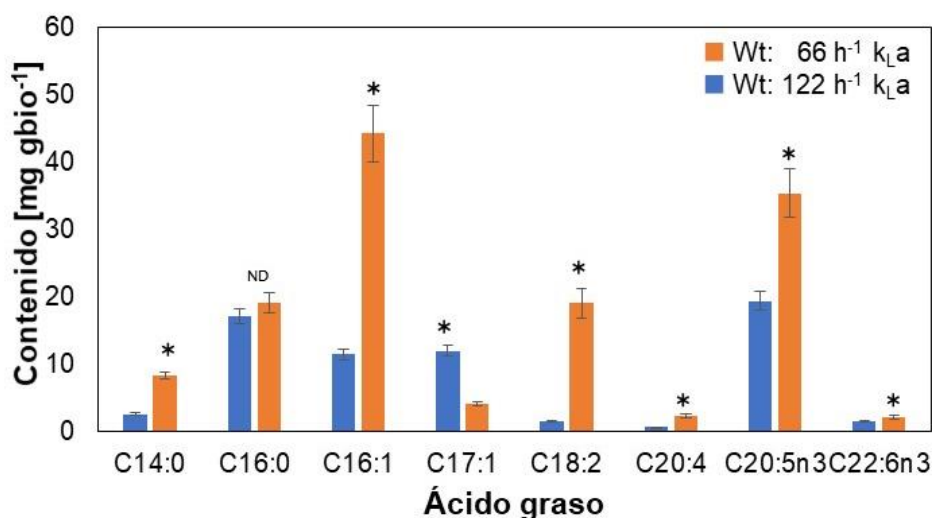


Figura 8.8 Contenido de ácidos grasos (mg g_{bio}⁻¹) en la cepa silvestre (■) k_La=66 h⁻¹; (■) 122 h⁻¹. Los asteriscos en la parte superior de las barras indican diferencias significativas según ANOVA, $p=0.05$. ND: Indica no diferencias entre los ácidos grasos evaluados. Las barras de error indican la desviación estándar de muestras tomadas de tres experimentos independientes.

Al igual que en los cultivos con la cepa LK1 en biorreactores de 1L, el contenido total de ácidos grasos en la cepa silvestre en alta transferencia de oxígeno (122 h^{-1}) fue dos veces mayor (Tabla 8.6), respecto a la condición de baja transferencia la cual se mantuvo en $66.7 \pm 6.2 \text{ mg}_{\text{FAME}} \text{ g}_{\text{Bio}}^{-1}$. Asimismo, la producción de total de FAMEs en alta transferencia de oxígeno fue superior un 40% respecto a la condición de menor transferencia en la cepa silvestre. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Song et al., en 2014 en donde a mayor transferencia de masa obtenían una mayor producción de ácidos grasos totales. En vista de los resultados, se comparó el porcentaje de EPA dentro de la mezcla de ácidos grasos totales y se determinó que la condición de baja transferencia es una mejor opción para la obtención de un mayor porcentaje de EPA (Tabla 8.6), respecto a la condición de alta transferencia. Al igual que con la cepa LK1, estos resultados concuerdan con lo reportado por Sun et al., en el 2018 donde la biosíntesis de ácidos grasos insaturados disminuye a mayor transferencia de oxígeno. Además, ellos también observaron que se incrementa la oxidación de estos.

Cabe mencionar que a pesar de tener incrementos en la producción total de ácidos grasos, estos no guardaron una relación directa con el contenido de lípidos en la cepa silvestre en relación con el porcentaje en la biomasa seca (Tabla 8.5). Esto es debido a que se sabe que la composición de las membranas presenta un alto contenido de fosfatidilcolina (mayor al 15 % mol, de los lípidos totales) con altos contenidos de EPA en su estructura lo cual brinda una mayor fluidez de la membrana y por otro parte de sulfoquinovosil diacilglicerol (12 % mol, de los lípidos totales) presente principalmente en las membranas de las células y de los cloroplastos en *P. tricornutum* con altos contenidos de EPA y C16:0 (Lupette et al., 2019) además de los lípidos neutros, y que pueden estar presentes dentro de la mezcla de los lípidos totales.

Respecto al contenido de EPA en la cepa silvestre se obtuvo una posible correlación con las condiciones de transferencia de oxígeno probadas en este trabajo, el cual impactó directamente en la producción de EPA, pero sin una relación directa sobre la producción de biomasa, la cual se mantuvo constante en la cepa silvestre en ambas condiciones de cultivo en el biorreactor (Tabla 8.6). La producción de EPA al final de los cultivos fue de $21.4 \pm 5.6 \text{ mg L}^{-1}$ en alta transferencia de oxígeno (1.4 veces mayor, respecto a la condición de menor transferencia). Esto contrasta con lo observado en la cepa mutante LK1 donde el contenido de EPA permaneció constante en ambas condiciones de transferencia de oxígeno.

Tabla 8.6 Contenido, producción y productividad de FAMES y EPA en cultivos de *P. tricornutum* UTEX 646 Wt.

Transferencia de oxígeno en la cepa Wt	TFA		EPA/TFA (%)	Contenido (mg g _{Bio} ⁻¹)	EPA	
	mg g _{Bio} ⁻¹	mg L ⁻¹			Producción (mg L ⁻¹)	Productividad (mg _{EPA} L ⁻¹ d ⁻¹)
k _{La} 122 h ⁻¹	135.1 ± 13.0 ^a	76.6 ± 7.3 ^a	26.2	35.4 ± 3.5 ^a	21.4 ± 5.6 ^a	1.78 ± 0.46 ^a
k _{La} 66 h ⁻¹	66.7 ± 6.2 ^b	46.7 ± 4.3 ^b	29.0	19.4 ± 0.7 ^b	13.6 ± 3.8 ^b	1.13 ± 0.31 ^b

Las letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA1 factor con prueba Tukey al 95 % de confiabilidad. Producción total de ácidos grasos (TFA).

En términos de la productividad de EPA, la cepa silvestre en alta transferencia (122 h⁻¹) fue 37 % mayor, respecto a la condición de baja transferencia. Esto podría estar relacionado a los mecanismos empleados en las diatomeas para contender contra los efectos de fotorrespiración reportados por Young et al., en 2016, quien describe mecanismos concentradores de CO₂ que logran mitigar la permeabilidad del O₂ en el medio intracelular. Se podría hipotetizar que este sobreflujo de CO₂ estaría impactando directamente tanto en el contenido como en la distribución de estos ácidos grasos en *P. tricornutum*.

8.2.4 Expresión génica en la cepa silvestre

Se determinaron claras diferencias en los niveles de expresión de los genes *acc1*, *ptd5* y *me1* en los cultivos de la cepa silvestre en condiciones de baja y alta transferencia de oxígeno (Fig. 8.9). Al igual que en la Figura 8.6, los datos se normalizaron respecto a los valores obtenidos bajo la condición de baja transferencia de oxígeno.

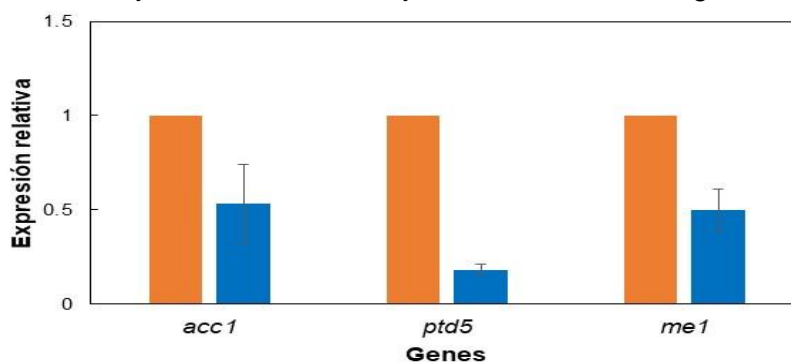


Figura 8.9 Expresión relativa de *acc1*, *ptd5* y *me1* en fase estacionaria en los cultivos de la cepa silvestre en baja (■) y alta (■) transferencia de oxígeno. El análisis de la transcripción génica se realizó empleando al gen *tth* como gen constitutivo.

De forma general, a diferencia de lo observado para la cepa mutante LK1, todos los genes tuvieron una menor expresión relativa cuando el $k_L a$ se incrementó. Dentro de los genes que resultaron tener una clara relación entre los niveles de expresión y de producción se tiene al gen *me1* que codifica para la enzima malonato deshidrogenasa que permite la reducción del malato al oxalacetato esta reacción resulta fundamental en la biosíntesis de ácidos grasos puesto generan poder reductor en forma de NADPH, necesario para la biosíntesis de estos. A través de esta estrategia indirecta para incrementar la biosíntesis de ácidos grasos Kim et al., (2019) sobreexpresaron la enzima malonato deshidrogenasa en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* aumentando los niveles de NADPH necesario para la biosíntesis de lípidos. En *P. tricornutum* se ha logrado incrementar los niveles de NADPH a través de la sobreexpresión de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) aumentando el contenido de lípidos (Xue et al., 2017). Los resultados obtenidos con el gen *me1* correlacionaron con un mayor porcentaje de lípidos totales (Tabla 8.5), lo cual podría estar relacionado a una mayor generación de potencial redox (NADPH) a menor transferencia de oxígeno. Esta relación había sido anteriormente descrita por Wu et al., (2019) en cepas de *P. tricornutum* en diferentes mezclas de gases de entrada en biorreactores y atribuido a una reducción del último aceptor de la cadena transportadora de electrones desviando el flujo de NADPH a la biosíntesis de lípidos.

En cuanto al gen *ptd5*, el cual codifica para la desaturasa $\Delta 5$ unida a las membranas del retículo endoplásmico, se ha reportado que este tiene un papel relevante durante la última etapa de formación de un doble enlace en el carbono 17 del ácido araquidónico (C20:4) para obtener EPA en *P. tricornutum* (Mühlroth et al., 2013). Por otra parte, Peng et al., en 2014 reportaron que la sobreexpresión del gen *ptd5* en *P. tricornutum* incrementa un 58 % el contenido de EPA, respecto a la cepa silvestre. Fue por ello por lo que se consideró que los niveles de transcritos de el gen *ptd5* podrían ser un clave indicador ante la respuesta de producción de EPA en los experimentos de nuestro trabajo y debido a que la enzima $\Delta 5$ desaturasa codificada por el gen *ptd5* presenta actividad oxidorreductasa y se sabe que esto depende de la disposición de oxígeno (Sun et al., 2018) se realizaron estas mediciones. En los resultados obtenidos se observó un comportamiento contrario entre los niveles de expresión y los contenidos de ácidos grasos (Fig. 8.8.), por lo que los genes podrían estar regulador no a nivel de transcripción, sino en traducción o la misma actividad enzimática (Domergue et al., 2003; Mühlroth et al.,

2013; Zhu et al., 2018). Recientemente Smith et al., en 2021, reportó que el gen *pad* que codifica para la enzima $\Delta 9$ desaturasa regula la producción de EPA en *P. tricornutum*, contrario a lo que otros autores habían reportado respecto al gen *ptd5* que codifica para la enzima $\Delta 5$ desaturasa. Ello podría explicar el porqué se encontró una respuesta opuesta a la esperada en los resultados obtenidos.

Respecto a él gen *acc1*, este se decidió evaluar debido a que este tiene en especial relevancia debido a que este codifica para la enzima acetil-CoA carboxilasa que permite la formación del malonil-CoA y debido a que este es el precursor limitante en la biosíntesis de ácidos grasos, mismo que permite la elongación de estos donando dos de sus tres carbonos por ciclo en la sintasa de ácidos grasos. Se ha reportado por Sun et al., en 2018 que la acumulación de lípidos en microalgas puede estar relacionada los niveles de estrés oxidativo y asociado a vías de señalización complejas de ROS, que puede afectar la biosíntesis de lípidos a nivel de expresión de transcritos; debido a ello fue interesante de evaluar el posible efecto de la transferencia de masa en la expresión de este gen. Xie et al., (2013) reportaron que los niveles de expresión de este gen tendrían un papel menor en la producción de lípidos neutros dentro de los que se incluyen a los ácidos grasos en la formación de la estructura de los TAGs al esterificarse con el glicerol y perder su carga; y de tener un papel más relevante sobre la producción de lípidos polares y de fosfolípidos. Ello podría explicar por qué a pesar de tener una mayor expresión de *acc1* en baja transferencia (66 h^{-1}) el contenido de ácidos grasos totales es menor (Tabla 8.6) y la producción de lípidos totales mayor (Tabla 8.5) bajo la misma condición de cultivo.

Por último, el gen *hup1* no fue evaluado para el caso de la cepa silvestre, ya que como era de esperarse en comparación de la cepa mutante LK1 que expresa el transportador de glucosa, este no generó amplicones en PCR punto final (datos no mostrados).

8.2.5 Comparación global de parámetros obtenidos en los cultivos de *P. tricornutum* a diferentes transferencias de oxígeno

Con la finalidad de conocer la relación y el impacto de ambas cepas en los diferentes valores de transferencia de oxígeno evaluados, se llevó a cabo una recapitulación de los principales parámetros de producción (Tabla 8.7). Se puede observar una relación entre la obtención de una mayor concentración de biomasa tanto en la cepa mutante LK1 y la cepa silvestre bajo la condición donde el $k_L a$ fue menor (66 h^{-1}), respecto a la condición de alta transferencia de oxígeno. Los cambios en el $k_L a$ en este sistema estuvieron gobernados por la agitación. La relación entre la disminución de la biomasa y el aumento

de la agitación en el biorreactor durante el cultivo de *P. tricornutum* ha sido reportada por Sobckuk et al., (2005) lo cual se debe principalmente a los esfuerzos de corte que provocan daño celular.

Por otra parte, de forma general bajo todas las condiciones evaluadas en ambas cepas se obtuvieron concentraciones de FAMES muy diferentes y sin una relación clara con el porcentaje de lípidos. La cepa mutante LK1 mostró una mayor producción de FAMES de forma global, tanto en baja como en alta transferencia de oxígeno, respecto a la cepa silvestre. En cuanto al contenido de EPA, de forma sorpresiva éste se mantuvo constante ($p \geq 0.01$) en tres de las condiciones experimentadas (Wt y LK1 en alta transferencia; LK1 baja transferencia). No obstante, para la cepa silvestre en baja transferencia de oxígeno (66 h^{-1}) el contenido fue menor en cerca del 49 % y con base a los contenidos de FAMES descritos en la sección 8.2.3, lo que podría ser atribuido a una menor biosíntesis de ácidos grasos. Respecto a la producción de EPA, es importante señalar la similitud en la producción volumétrica obtenida entre la cepa silvestre y la cepa mutante LK1 en alta y baja transferencia de oxígeno, respectivamente. Sin embargo, es de resaltar la capacidad de la cepa LK1 para sintetizar un mayor contenido de EPA en la mezcla total de ácidos grasos en baja transferencia de oxígeno y de poliinsaturados de forma global en ambas condiciones de cultivo, respecto a la cepa silvestre.

Tabla 8.7 Comparación global de la cepa mutante LK1 y la cepa silvestre a diferentes transferencias de oxígeno

Parámetro	$k_{La} \text{ (h}^{-1}\text{)}$			
	66		122	
	LK1	Wt	LK1	Wt
Biomasa (g L^{-1})	0.8 ± 0.2^a	0.7 ± 0.1^a	0.4 ± 0.1^b	0.6 ± 0.1^{ab}
FAMES (mg L^{-1})	86.8 ± 1.8^a	46.7 ± 4.3^b	66.5 ± 6.2^c	76.6 ± 7.3^c
Contenido EPA ($\text{mg}_{EPA} \text{ g}_{Bio}^{-1}$)	33.2 ± 1.7^a	18.9 ± 0.7^b	35.9 ± 3.5^a	35.4 ± 3.5^a
Producción EPA (mg L^{-1})	26.6 ± 2.3^a	13.2 ± 3.8^b	14.5 ± 4.9^b	21.4 ± 5.6^a
Productividad EPA ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	2.21 ± 0.19^a	1.13 ± 0.31^b	1.2 ± 0.41^b	1.78 ± 0.46^a
%EPA/TFA	30.6 ± 0.32^a	29.2 ± 0.18^b	21.6 ± 1.2^c	26.3 ± 2.4^d
%Insaturados/TFA	81.1 ± 0.3^a	70.4 ± 0.9^b	84.7 ± 1.3^c	79.6 ± 1.1^d

Las letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA1 factor con prueba Tukey al 95 % de confiabilidad.

De forma global, puede decirse que bajo condiciones de baja transferencia de oxígeno (66 h^{-1}) la cepa mutante LK1 logró la mayor producción de biomasa siendo este parámetro uno de los más importantes para maximizar la producción de EPA en los cultivos de *P. tricornutum*. Cabe mencionar que en las condiciones de menor transferencia se reduce un 40 % la agitación, respecto a la condición de alta transferencia, lo que sería en términos energéticos y de productividad nuestra mejor opción para la obtención EPA. Por último, dentro de las implicaciones que conllevó trabajar a menor transferencia de oxígeno, tanto en la cepa LK1 y en la cepa silvestre, fue posible obtener un mayor porcentaje de EPA en la mezcla total de los ácidos grasos lo cual tiene ventajas en los procesos de purificación para la obtención de EPA de mayor pureza.

9. Conclusiones

- La cepa mutante LK1 logró los valores más altos de producción de EPA y de consumo de glucosa en cultivos mixotróficos, en comparación de la cepa silvestre y la cepa mutante LK2 en experimentos en matraces.
- Se determinó que la mutación del gen *hup1*, que codifica para el transportador de glucosa HUP+, en las cepas mutantes modifica los perfiles de ácidos grasos tanto en contenido como en su distribución, respecto a la cepa silvestre de *P. tricornutum* UTEX 646 en las mismas condiciones de cultivo.
- Se demostró por primera vez que el k_{La} puede determinar los títulos de producción de biomasa y de EPA.
- Bajo las condiciones de transferencia de oxígeno probadas en este trabajo (66 y 122 h^{-1}), se observaron cambios en los niveles de los transcriptos de algunos genes (*acc1*, *me1*, *ptd5*) involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos en *P. tricornutum*. Sin embargo, estos cambios no están ligados directamente a la producción de EPA, y podrían tener una relación al contenido de ácidos grasos totales y de lípidos.
- Se encontró que la sobreexpresión del gen *me1* tiene una posible relación en el metabolismo de lípidos, mismo que se ve reflejado en mayores porcentajes de la fracción lipídica en la biomasa seca al final de los cultivos.
- Se encontró que la sobreexpresión del gen *acc1* correlaciona con una mayor producción de lípidos totales en *P. tricornutum*.
- Se determinó que la principal ventaja de la cepa mutante LK1, respecto a la cepa silvestre, es su capacidad de sintetizar un mayor contenido de ácidos grasos insaturados independientemente de la condición de transferencia de oxígeno.
- Con la cepa mutante LK1 se logró una mayor producción de EPA a menor k_{La} (66 h^{-1}), respecto a lo obtenido en la condición de mayor transferencia; lo que en términos de potencia, impacta en menores costos energéticos del proceso de cultivo, lo cual puede representar una ventaja tecnológica.

Bibliografía

- Adarme-Vega, T. C., Thomas-Hall, S. R., & Schenk, P. M. (2014). Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. *Current Opinion in Biotechnology*, 26(1), 14–18.
- Alipanah, L., Rohloff, J., Winge, P., Bones, A. M. & Brembu, T. (2015). Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Experimental Botany*. 66, 6281–6296.
- Bailey RB, Dimasi D, Hansen JM, Mirrasoul PJ, Ruecker CM, & Veeder GT. (2003). Enhanced production of lipids containing polyenoic fatty acid by very high density cultures of eukaryotic microbes in fermentors. US Patent No. 6607900.
- Bailleul, B., Berne, N., Murik, O., Petroutsos, D., Prihoda, J., & Tanaka, A. (2015). Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO₂ assimilation in diatoms. *Nature*, 524, (7565, 366–369).
- Bajpai P, Bajpai P.K, & Ward OP. (1991). Production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 706–10.
- Barclay, W.R., Meager, K.M. & Abril, J.R. (1994). Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 6, 123–129.
- Bhatt, D. L., Steg, P. G., Miller, M., Brinton, E. A., Jacobson, T. A., Ketchum, S. B., & Ballantyne, C. M. (2018). Cardiovascular risk reduction with icosapent ethyl for hypertriglyceridemia. *New England Journal of Medicine*, 380(1), 11-22.
- Boswell KDB, Gladue R, Prima B, & Kyle DJ. (1992). SCO production by fermentative microalgae. *American Oil Chemists' Society*, 35, 274–86.
- Bowman L, Mafham M, & Wallendszus K. (2018). ASCEND Study collaborative group. Effects of n-3 fatty acid supplements in *diabetes mellitus*. *New England Journal of Medicine*, 16,1540-1550.

- Breuer, G., Evers, W. A. C., de Vree, J. H., Kleinegris, D. M. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H., & Lamers, P. P. (2013). Analysis of fatty acid content and composition in microalgae. *Journal of Visualized Experiments*, 80, 50628-50636 <https://doi.org/10.3791/50628>.
- Butler, T., Kapoore, R. V., & Vaidyanathan, S. (2020). *Phaeodactylum tricornutum*: A diatom cell factory. *Trends in Biotechnology*, 38(6), 606–622.
- Camacho-Fernández, C., Hervás, D., Rivas-Sendra, A., Marín, M. P., & Seguí-Simarro, J. M. (2018). Comparison of six different methods to calculate cell densities. *Plant Methods*, 14(1), 6-12.
- Castilla-Casadiago, D. A., Albis Arrieta, A. R., Angulo Mercado, E. R., Cervera Cahuana, S. J., Baquero Noriega, K. S., Suárez Escobar, A. F., & Morales Avendaño, E. D. (2016). Evaluation of culture conditions to obtain fatty acids from saline microalgae species: *Dunaliella salina*, *Sinecosyfis* sp., and *Chroomonas* sp. *BioMed Research International*, 2016, 1–7.
- Castillo, T., Heinzle, E., Peifer, S., Schneider, K., & Peña M, C. F. (2013). Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochemistry*, 48(7), 995–1003.
- Cerón-García, M. C., Fernández Sevilla, J. M., Acien Fernández, F. G., Molina Grima, E., & García Camacho, F. (2000). Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology*, 12(3/5), 239–248.
- Cerón-García, M. C., Sánchez Mirón, A., Fernández Sevilla, J. M., Molina Grima, E., & García Camacho, F. (2005). Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Process Biochemistry*, 40(1), 297–305.
- Cerón-García, M. C., A., Fernández Sevilla, J. M., Molina Grima, E., & García Camacho, F. (2006). Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(5), 689–694.

- Cerón-García, M. C., Fernández-Sevilla, J. M., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Contreras-Gómez, A., & Molina-Grima, E. (2013). Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semi-continuous modes. *Bioresource Technology*, 147, 569–576.
- Chen, F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*, 14, 412-426.
- Chen, G. Q., & Chen, F. (2006). Growing phototrophic cells without light. *Biotechnology Letters*, 28(9), 607–616.
- Cheng D & He Q. (2014). Assessment of environmental stresses for enhanced microalgal biofuel production-an overview. *Frontiers in Energy Research*, 2,1-26.
- Contreras, A., Garcia, F., & Molina E, Merchuk JC. (1998). Interaction between CO₂-mass transfer, light availability, and hydrodynamic stress in the growth of *Phaeodactylum tricornutum* in a concentric tube airlift photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(3), 317-25.
- Cooper, C. M., Fernstrom, G. A., & Miller, S. A. (1944). Performance of agitated gas-liquid contactors. *Industrial & Engineering Chemistry*, 36(6), 504–509.
- Cottin, S. C., Sanders, T. A., & Hall, W. L. (2011). The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proceedings of the Nutrition Society*, 70(02), 215–231.
- Domergue, F., Lerchl, J., Zähringer, U., & Heinz, E. (2002). Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 269(16), 4105-4113.
- Desbois, A. P., Lebl, T., Yan, L., & Smith, V. J. (2008). Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 755–764.
- Domergue, F., Spiekermann, P., Lerchl, J., Beckmann, C., Kilian, O., Kroth, P. G., & Heinz, E. (2003). New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal delta12-fatty acid desaturases. *Plant Physiology*, 131(4), 1648-1660.

- Domergue, F., Abbadi, A., Zähringer, U., Moreau, H., & Heinz, E. (2005). *In vivo* characterization of the first acyl-CoA Delta6-desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*. *The Biochemical Journal*, 389(2), 483–490.
- Eriksen, N. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30(9), 1525-1536.
- Fernández-Sevilla, J. M., Cerón-García, M. C., Sánchez-Miron, A., Belarbi, E. H., García-Camacho, F., & Molina-Grima, E. (2004). Pilot-plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricornutum* using glycerol in vertical bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch mode. *Biotechnology Progress*, 20(3), 728–736.
- Finco, A. M. de O., Mamani, L. D. G., Carvalho, J. C. de, de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2017). Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(5), 656–671.
- Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294(5548), 1871–5.
- Garcia Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153–176.
- Gardner, R. D., Cooksey, K. E., Mus, F., Macur, R., Moll, K., Eustance, E., Peyton, & B. M. (2012). Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte *Scenedesmus* sp. and the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1311–1320.
- Gimpel, J. A., Henríquez, V., & Mayfield, S. P. (2015). In metabolic engineering of eukaryotic microalgae: potential and challenges come with great diversity. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-14.
- Gogus, U., & Smith, C. (2010). *n*-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(3), 417–436.
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45(2), 160–186.

- Hamilton, M. L., Haslam, R. P., Napier, J. A., & Sayanova, O. (2014). Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering*, 22, 3–9.
- Hamilton, M., Powers, S., Napier, J., & Sayanova, O. (2016). Heterotrophic production of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids by trophically converted marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Drugs*, 14(3), 53.
- Heggeset, T. M. B., Ertesvåg, H., Liu, B., Ellingsen, T. E., Vadstein, O., & Aasen, I. M. (2019). Lipid and DHA-production in *Aurantiochytrium* sp. – Responses to nitrogen starvation and oxygen limitation revealed by analyses of production kinetics and global transcriptomes. *Scientific Reports*, 9(1), 1-13.
- 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(4), 621–639.
- Huerlimann, R., & Heimann, K. (2012). Comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(1), 49–65.
- Jakobsen, A. N., Aasen, I. M., Josefsen, K. D., & Strøm, A. R. (2008). Accumulation of docosahexaenoic acid-rich lipid in thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain T66: effects of N and P starvation and O₂ limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(2), 297–306.
- Kazbar, A., Cogne, G., Urbain, B., Marec, H., Le-Gouic, B., Tallec, J., Pruvost, J. (2019). Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Research*, 39, 101432-101443.
- Kelly, P. B., Reiser, R., & Hood, D. W. (1959). The origin of the marine polyunsaturated fatty acids – composition of some marine plankton. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 36(3), 104–106.
- Kendrick, A., & Ratledge, C. (1992). Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 27(1), 15–20.
- Kitessa, S., Abeywardena, M., Wijesundera, C., & Nichols, P. (2014). DHA-Containing oilseed: a timely solution for the sustainability issues surrounding fish oil sources of the health-benefitting long-chain omega-3 oils. *Nutrients*, 6(5), 2035–2058.

- Khoomrung, S., Chumnanpuen, P., Jansa-Ard, S., Ståhlman, M., Nookaew, I., Borén, J., & Nielsen, J. (2013). Rapid quantification of yeast lipid using microwave-assisted total lipid extraction and HPLC-CAD. *Analytical Chemistry*, 85(10), 4912–4919.
- Krämer L.C. (2022). Towards the usage of *Phaeodactylum tricornutum* as biofactory for omega-3 fatty acids. PhD Thesis . Institute for Molecular Bioscience Plant Cell Physiology-Goethe University Frankfurt.
- Kris-Etherton, P. M., Richter, C. K., Bowen, K. J., Skulas-Ray, A. C., Jackson, K. H., Petersen, K. S., & Harris, W. S. (2019). Recent clinical trials shed new light on the cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*, 15(3), 171–178.
- Kyle, D.J. (1992). Production and use of lipids from microalgae. *Lipid Technology*, 4, 59–64.
- Lane, J. (2015). RIP, Aurora algae: algae and the never-never. *Biofuels Digest*. Retrieved from <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2015/07/22/rip-aurora-algae-algae-and-the-never-never/>
- Lee, Y.K. (2001). Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, 13(4), 307-315.
- Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cai, Z., & Hu, Z. (2009). Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*, 21(2), 239–246.
- Liu, J., Liu, Y., Wang, H., & Xue, S. (2015). Direct transesterification of fresh microalgal cells. *Bioresource Technology*, 176, 284–287.
- Litchman, E., Klausmeier, C. A., & Yoshiyama, K. (2009). Contrasting size evolution in marine and freshwater diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2665–2670.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lupette, J., Jaussaud, A., Seddiki, K., Morabito, C., Brugière, S., Schaller, H., Maréchal, E. (2019). The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research*, 38, 101415-34.

- Manson, J. E., Cook, N. R., Lee, I. M., Christen, W., Bassuk, S. S., Mora, S., Gibson, H., Gordon, D., Copeland, T., D'Agostino, D., Friedenberg, G., Ridge, C., Bubes, V., Giovannucci, E. L., Willett, W. C., Buring, J. E., & VITAL Research Group. (2019). Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*, 380(1), 33–44.
- Martino, A. D., Bartual, A., Willis, A., Meichenin, A., Villazán, B., & Maheswari, U. (2011). Physiological and molecular evidence that environmental changes elicit morphological interconversion in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist*, 162(3), 462–481.
- Matsui, H., Hopkinson, B. M., Nakajima, K., & Matsuda, Y. (2018). Plasma membrane-type aquaporins from marine diatoms function as CO₂/NH₃ channels and provide photoprotection. *Plant Physiology*, 178(1), 345–357.
- Monteil, D. T., Tontodonati, G., Ghimire, S., Baldi, L., Hacker, D. L., Bürki, C. A., & Wurm, F. M. (2013). Disposable 600-mL orbitally shaken bioreactor for mammalian cell cultivation in suspension. *Biochemical Engineering Journal*, 76, 6-12.
- Molina Grima, E., Fernández, F. G. A., García Camacho, F., & Chisti, Y. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, 70(1-3), 231–247.
- Moog, D., Schmitt, J., Senger, J., Zarzycki, J., Rexer, K.-H., & Linne, U. (2019). Using a marine microalga as a chassis for polyethylene terephthalate (PET) degradation. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 171.
- Morales-Sánchez, D., Martínez-Rodríguez, O. A., Kyndt, J., & Martínez, A. (2015). Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 31(1), 1–9.
- Moreno, C., Macías, Á., Prieto, Á., De La Cruz, A., González, T., & Valenzuela, C. (2012). Effects of n–3 polyunsaturated fatty acids on cardiac ion channels. *Frontiers in Physiology*, 245(3), 1-8.
- Mühlroth, A., Li, K., Røkke, G., Winge, P., Olsen, Y., Hohmann-Marriott, M. F., Bones, A. M. (2013). Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of chromista. *Marine Drugs*, 11(11), 4662–4697.

- Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Berge, J.P., del Pino, V., Uronen, P., & Legrand, C. (2012). Seasonal variation of lipids and fatty acids of the microalgae *Nannochloropsis oculata* grown in outdoor large-scale photobioreactors. *Energies*, 5, 1577–1592.
- Pal, P., Chew, K. W., Yen, H.W., Lim, J. W., Lam, M. K., & Show, P. L. (2019). Cultivation of oily microalgae for the production of third-generation biofuels. *Sustainability*, 11(19), 5424.
- Pang, N.X., Gu, S., Chen, H., Kirchhoff., & Roje, H. (2019). Exploiting mixotrophy for improving productivities of biomass and co-products of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 112, 450–460.
- Peng, K.T., Zheng, C.N., Xue, J., Chen, X.Y., Yang, W.D., Liu, J.S., & Li, H.Y. (2014). Delta 5 fatty acid desaturase upregulates the synthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(35), 8773–8776.
- Pérez-García, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36.
- Pinazo-Duran, M. D., & Boscá-Gomar, L. (2012). Anti-inflammatory properties of polyunsaturated fatty acid omega 3. Indications in ophthalmology. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología*, 87(7), 203–205.
- Qiao, H., Wang, J., Zhang, L. (2015). An improved direct transesterification method for fatty acid determination of *Phaeodactylum tricornutum* . *Journal of Applied Phycology*, 27, 697–701.
- Ren, L., Ji, X., Huang, H., & Qu, L. (2010). Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium sp.* *Microbial Biotechnology*, 87, 49–56.
- Roesle, P., Stempfle, F., Hess, S. K., Zimmerer, J., Río Bártulos, C., & Lepetit, B. (2014). Synthetic polyester from algae oil. *Angewandte Chemie*, 53 (26), 6800–6804.
- Sang, M., Wang, M., & Liu, J. (2012). Effects of temperature, salinity, light intensity, and pH on the eicosapentaenoic acid production of *Pinguicoccus pyrenoidosus*. *Journal of Ocean University of China*, 11(2), 181–186.

- Shi, K., Gao, Z., Shi, T.-Q., Song, P., Ren, L.-J., Huang, H., & Ji, X.-J. (2017). Reactive oxygen species-mediated cellular stress response and lipid accumulation in oleaginous microorganisms: the state of the art and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-9.
- Siaut, M., Heijde, M., Mangogna, M., Montsant, A., Coesel, S., Allen, A., & Bowler, C. (2007). Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricornutum*. *Gene*, 406(1-2), 23–35.
- Simopoulos, A. P. (2002). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: The epidemiological evidence. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 6(4), 203–209.
- Singh, A., & Ward, O. P. (1997). Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6). *Advances in Applied Microbiology*, 45, 271–312.
- Smith, R., Jouhet, J., Gandini, C., Nekrasov, V., Marechal, E., Napier, J. A., & Sayanova, O. (2021). Plastidial acyl carrier protein $\Delta 9$ -desaturase modulates eicosapentaenoic acid biosynthesis and triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *The Plant Journal*, 106(5), 1247–1259.
- Sobczuk, T. M., Camacho, F. G., Grima, E. M., & Chisti, Y. (2005). Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28(4), 243–250.
- Song, M., Pei, H., Hu, W., Han, F., Ji, Y., Ma, G., & Han, L. (2014). Growth and lipid accumulation properties of microalgal *Phaeodactylum tricornutum* under different gas liquid ratios. *Bioresource Technology*, 165, 31–37.
- Stark, K. D., Van Elswyk, M. E., Higgins, M. R., Weatherford, C. A., & Salem, N. (2016). Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. *Progress in Lipid Research*, 63, 132–152.
- Steinrücken, P., Prestegard, S. K., de Vree, J. H., Storesund, J. E., Pree, B., Mjøs, S. A., & Erga, S. R. (2018). Comparing EPA production and fatty acid profiles of three *Phaeodactylum tricornutum* strains under western norwegian climate conditions. *Algal Research*, 30, 11–22.

- Sun, X.-M., Geng, L.-J., Ren, L.-J., Ji, X.-J., Hao, N., Chen, K.-Q., & Huang, H. (2018). Influence of oxygen on the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in microalgae. *Bioresource Technology*, 250, 868–876.
- Tesson, B., Gaillard, C., & Martin-Jézéquel, V. (2009). Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Botanica Marina*, 52(2), 104-116.
- Thiyagarajan, S., Khandelwal, P., Senthil, N., Vellaikumar, S., Arumugam, M., Dubey, A. A., & Kathiresan, S. (2020). Heterologous production of polyunsaturated fatty acids in *E. coli* using $\Delta 5$ -desaturase gene from microalga *Isochrysis* Sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(3), 869–883.
- Tonon, T., Sayanova, O., Michaelson, L. V., Qing, R., Harvey, D., Larson, T. R., & Graham, I. A. (2005). Fatty acid desaturases from the microalga *Thalassiosira pseudonana*. *FEBS Journal*, 272, 3401–12.
- Tsuji, Y., Nakajima, K., & Matsuda, Y. (2017). Molecular aspects of the biophysical CO₂-concentrating mechanism and its regulation in marine diatoms. *Journal of Experimental Botany*, 68(14), 3763–3772.
- Vazhappilly R, & Chen F. (1998). Heterotrophic production potential of omega-3 polyunsaturated fatty acids by microalgae and algae-like microorganisms. *Botanica Marina*, 41, 553–8.
- Villanova, V., Fortunato, A. E., Singh, D., Bo, D. D., Conte, M., Obata, T., & Finazzi, G. (2017). Investigating mixotrophic metabolism in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728),1-14.
- Wang H. A., Ru Fu., & Guofeng Pei. (2012). A study on lipid production of the mixotrophic microalgae *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 1041- 1047.
- Ward, O. P., & Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40(12), 3627–3652.
- Weissman, J.C., Goebel, R.P., & Benemann, J.R. (1988). Photobioreactor design: Mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(4), 336-44.

- Wen, Z. Y., & Chen, F. (2000). Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Biotechnology Letters*, 22(9), 727–733.
- Wen, Z. Y., & Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 21(4), 273–294.
- Wood, B.J.B., Grimson, P.H.K., German, J.B., & Turner, M. (1999). Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. *Journal of Biotechnology*, 70, 175-183.
- Winwood, R. J. (2013). Recent developments in the commercial production of DHA and EPA rich oils from micro-algae. *Oilseeds & Fats Crops and Lipids*, 20(6), D604.
- Wu, S., Huang, A., Zhang, B., Huan, L., Zhao, P., Lin, A., & Wang, G. (2015). Enzyme activity highlights the importance of the oxidative pentose phosphate pathway in lipid accumulation and growth of *Phaeodactylum tricornutum* under CO₂ concentration. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1-11.
- Wu, S., Gu, W., Huang, A., Li, Y., Kumar, M., Lim, P. E., & Wang, G. (2019). Elevated CO₂ improves both lipid accumulation and growth rate in the glucose-6-phosphate dehydrogenase engineered *Phaeodactylum tricornutum*. *Microbial Cell Factories*, 18(1),1-16.
- Xie, W.H., Pang, F., Niu, Y.F., Zhang, M.H., Yang, W.D., Liu, J.S., Li, H.Y. (2013). Functional characterization of an ACCase subunit from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 60(3), 330–335.
- Xue, J., Balamurugan, S., Li, D. W., Liu, Y. H., Zeng, H., Wang, L., Yang, W.D., Liu, J. S., & Li, H.Y. (2017). Glucose-6-phosphate dehydrogenase as a target for highly efficient fatty acid biosynthesis in microalgae by enhancing NADPH supply. *Metabolic Engineering*, 41, 212–221.
- Young, J. N., Heures, A. M. C., Sharwood, R. E., Rickaby, R. E. M., Morel, F. M. M., & Whitney, S. M. (2016). Large variation in the Rubisco kinetics of diatoms reveals diversity among their carbon-concentrating mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, 67(11), 3445–3456.

- Yongmanitchai, W., & Ward, O. P. (1991). Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 419–425.
- Zaslavskaia, L. A., Lippmeier, J. C., Shih, C., Ehrhardt, D., Grossman, A. R., & Apt, K. E. (2001). Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science*, 292(5524).
- Zhu, B. H., Zhang, R. H., Lv, N. N., Yang, G. P., Wang, Y. S., & Pan, K. H. (2018). The role of malic enzyme on promoting total lipid and fatty acid production in *Phaeodactylum tricornutum*. *Frontiers in Plant Science*, 826 (9),1-8.
- Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., & Feussner, I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research*, 70, 1–16.

Anexos

Anexo 1

Las metodologías establecidas para la realización de la extracción de RNA, síntesis de cDNA y las PCR en tiempo real fueron montadas en nuestro laboratorio respecto a las metodologías reportadas por Huysman et al., (2013).

Extracción del RNA.

Los paquetes celulares de *P. tricornutum*, fueron tratados mediante sonicación (Sonic Materyals; Vibra-Cell™) con una frecuencia entre 20 y 50 kHz para realizar la lisis celular, manteniendo los pellets siempre en baño de hielo.

Una vez que se lisaron las células, se adicionaron 450 µL del *buffer* RLT con 10 µL de 2-mercaptoetanol, este paso es necesario para asegurarnos del proceso de lisis celular. Posteriormente, se utilizaron pasos de purificación con etanol absoluto y lavados con el *buffer* RPE y RW1 para descartar contaminantes (proteínas y carbohidratos). Por último, las columnas fueron secadas a temperatura ambiente y el RNA fue resuspendido en 30 µL de en agua libre de RNasas.

Cuantificación de RNA

La cuantificación se realizó en Nanodrop a 260 nm y se evaluó la calidad del RNA extraído con la relación de absorbancia A260/280 como parámetro de control en los intervalos de 2.0-2.2.

Síntesis de cDNA

Para la transcripción reversa se utilizaron 1 µg de RNA de cada condición y se utilizó el kit QuantiTect Rev. Transcription (QIAGEN), según la metodología recomendada por el proveedor:

El RNA se diluyo a 200 ng/ µL en agua con DEPC. Se tomaron 2 µL de RNA (200 ng) y se agregaron 2 pmoles de cada primer (reverso) de los genes cuya expresión se desea cuantificar. Para el diseño de los *primers* se utilizó el programa Genome Compiler. La secuencia de los *primers* se presenta en la Tabla 7.5, correspondiente a la sección de métodos analíticos.

PCR de tiempo real

Para cada reacción, aproximadamente 9 ng de cDNA, una mezcla de 10 pmol/mL de cada oligonucleótido requerido y 5 μ L de Maxima® SYBR Green/ROX qPCRMaster Mix 2X(Thermo Fisher Scientific Inc., USA) en un volumen final de 10 μ L de reacción fue utilizado.

El análisis de PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR) fue llevado a cabo empleando el equipo C1000TM Thermal Cycler and the CFX96TM Real Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 10 min a 95°C, dos pasos de 95°C por 15 s seguido de uno a 60°C por 60s repetido 40 veces. El tamaño de todos los amplicones fue de 100 a 200 pares de base. Todos los análisis de RT-qPCR fueron realizados por duplicado para cada gen de cada condición. El gen *tbh* fue utilizado como control interno (gen de referencia) para normalizar los resultados. Este gen ya ha sido utilizado por otros autores para analizar la expresión de genes de *Phaeodactylum* (Siaut et al., 2007). La cuantificación de los niveles de expresión se realizó con base en el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ reportado por Livak y Schmittgen (2001) tomando como criterio la condición de baja transferencia de oxígeno (66 h^{-1}) tanto en la cepa silvestre UTEX 64 como en la cepa mutante LK1. La estandarización del método ($\Delta-\Delta-CT$) se mantuvieron las condiciones reportadas por Siaut et al., (2007) empleando al gen *rps* y *tbh* con eficiencias $E_{rps}=1.998$ y manteniendo los valores de CT en los intervalos reportados anteriormente por Siaut.

Anexo 2

Estimación del coeficiente global de transferencia de oxígeno (k_La)

Se prepararon las siguientes soluciones, Na_2SO_3 0.5 N y se ajustó el valor de pH a 8.0. Una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 M, I_2 0.5 N, solución de almidón 1 %. Por último, se preparó una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05 N la cuál fue valorada frente a un patrón de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Se prepararon los tres biorreactores de 1L a los que se les agregó 750 mL de la solución de sulfito de sodio (Na_2SO_3) 0.5 N. Se realizaron las mediciones de los biorreactores estáticos, a 150 rpm y 0.66 vvm; y a 250 rpm y 0.66 vvm.

Se le agregó a cada biorreactor un volumen de la solución de CuSO_4 1.0 M de modo tal que la concentración final sea 1×10^{-3} M, en ese momento se tomó como tiempo cero de la experiencia. A intervalos de 25 minutos durante 100 min se tomaron muestras de 2 mL y se adicionaron sobre 3 mL de solución de yodo 0.5 N. El exceso de yodo se tituló por retorno utilizando bureta graduada con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05 N, y solución de almidón 1 % como indicador. Con los datos obtenidos se graficó el volumen consumido de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en función del tiempo (Fig. A.1.) y de la pendiente de dicha gráfica se calculó el valor de k_La (Tabla A.1.) empleando la siguiente expresión:

$$k_La \text{ (h}^{-1}\text{)} = \frac{1}{C^*} \frac{m \cdot N}{4 \cdot V_m}$$

Dónde C^* es la solubilidad del O_2 , N es la concentración del tiosulfato de sodio, V_m es el volumen de la muestra de sulfito de sodio, y m es la pendiente.

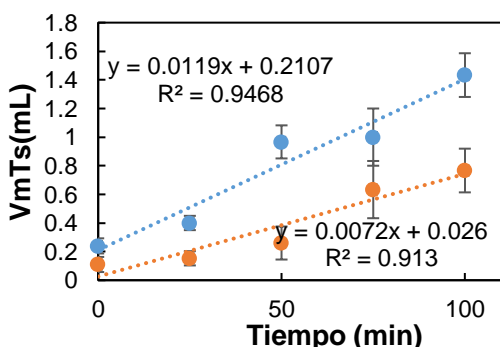


Figura A.1 Correlación de valoración con tiosulfato de sodio versus tiempo en la condición de (●) baja y (●) alta transferencia de oxígeno.

Tabla A.1 Valores estimados del coeficiente global de transferencia de oxígeno.

Condición	Variables		$k_La \text{ (h}^{-1}\text{)}$
1	0.66 vvm	150 rpm	66 ± 12
2	0.66 vvm	250 rpm	122 ± 18

Anexo 3

Contenido de ácidos grasos

Tabla A.2 Contenido de ácidos grasos [μg] por mg de biomasa seca analizado en el cultivo mixotrófico en matraces agitados a las 288 h. Abreviación usadas en esta tabla: SFA: ácido graso saturado; MUFA: ácido graso monoinsaturado; PUFA: ácido graso poliinsaturado; TFA: ácidos grasos totales. En la tabla se muestra el promedio de las mediciones $n=3$. Las letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA 1 factor con prueba Tukey al 95 % de confiabilidad.

	Wt	LK1	LK2
C14:0	5.9 ± 0.0^a	9.8 ± 0.4^b	13.8 ± 0.7^c
C16:0	36.2 ± 1.1^a	16.0 ± 0.7^b	42.1 ± 2.5^c
C16:1	24.2 ± 0.8^a	30.8 ± 1.7^b	15.4 ± 0.9^c
C17:1	25.4 ± 0.9^a	29.4 ± 1.6^b	20.0 ± 1.2^c
C18:2	3.3 ± 0.3^a	3.4 ± 0.3^a	3.5 ± 0.4^a
C20:4	1.5 ± 0.0^a	1.2 ± 0.1^{ab}	1.5 ± 0.2^a
C20:5 ω3	40.2 ± 2.0^a	41.9 ± 2.8^a	37.8 ± 2.6^a
C22:6 ω3	3.2 ± 0.2^a	3.7 ± 0.3^{ab}	4.2 ± 0.3^b
SFA	42.1 ± 1.1^a	25.8 ± 1^b	56.0 ± 1.6^c
MUFA	49.6 ± 1.7^a	60.2 ± 1.6^b	35.5 ± 2.1^c
PUFA	48.3 ± 2.6^a	50.3 ± 1.7^a	47.2 ± 2.1^a
TFA	140.2	136.5	138.8
Biomasa [mg]	30.0	37.5	30.0

Tabla A.3 Contenido de ácidos grasos [μg] por mg de biomasa seca analizado en el cultivo mixotrófico en cultivos de la cepa mutante LK1 en el biorreactor de 1L a las 288 h. Abreviación usadas en esta tabla: SFA: ácido graso saturado; MUFA: ácido graso monoinsaturado; PUFA: ácido graso poliinsaturado; TFA: ácidos grasos totales. En la tabla se muestra el promedio de las mediciones $n=3$. Las letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA 1 factor con prueba Tukey al 95 % de confiabilidad.

Cepa LK1	$k_L a$ (h^{-1})	
	66	122
C14:0	7.7 ± 0.1^a	7.1 ± 0.2^b
C16:0	12.6 ± 0.1^a	19.0 ± 0.8^b
C16:1	24.3 ± 0.2^a	41.3 ± 3.8^b
C17:1	23.3 ± 0.2^a	6.72 ± 0.4^b
C18:2	2.7 ± 0.2^a	52.9 ± 6.0^b
C20:4	0.9 ± 0.0^a	0.76 ± 0.1^b
C20:5 ω3	32.9 ± 0.1^a	35.9 ± 3.5^a
C22:6 ω3	2.9 ± 0.0^a	2.3 ± 0.6^a
SFA	20.3 ± 0.2^a	26.1 ± 1.0^b
MUFA	47.6 ± 0.2^a	48.1 ± 4.2^b
PUFA	39.6 ± 0.4^a	92.0 ± 4.2^b
TFA	107.7 ± 2.3^a	166.3 ± 15.6^b
Biomasa [mg]	40.3	5.4

Tabla A.4 Contenido de ácidos grasos [μg] por mg de biomasa seca analizado en el cultivo mixotrófico en cultivos de la cepa silvestre UTEX 646 en el biorreactor de 1L a las 288 h. Abreviación usadas en esta tabla: SFA: ácido graso saturado; MUFA: ácido graso monoinsaturado; PUFA: ácido graso poliinsaturado; TFA: ácidos grasos totales. En la tabla se muestra el promedio de las mediciones $n=3$. Las letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA 1 factor con prueba Tukey al 95 % de confiabilidad.

Cepa Wt	$k_L a$ (h^{-1})	
	66	122
C14:0	2.6 ± 0.1^a	8.4 ± 0.5^b
C16:0	17.1 ± 1.0^a	19.1 ± 1.4^a
C16:1	11.4 ± 0.7^a	44.2 ± 4.2^b
C17:1	12.0 ± 0.7^a	4.1 ± 0.3^b
C18:2	1.6 ± 0.1^a	19.0 ± 2.2^b
C20:4	0.7 ± 0.0^a	2.3 ± 0.2^b
C20:5 ω3	19.4 ± 1.3^a	35.4 ± 3.5^b
C22:6 ω3	0.4 ± 0.1^a	2.1 ± 0.4^b
SFA	19.7 ± 2.0^a	27.5 ± 1.5^b
MUFA	23.5 ± 1.1^a	48.3 ± 3.4^b
PUFA	23.4 ± 2.1^a	59.1 ± 4.3^b
TFA	66.7 ± 6.2^a	135.1 ± 13.0^b
Biomasa [mg]	35	12.4