



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

**UNIDAD IRAPUATO**

**Aislamiento y caracterización de mutantes halotolerantes de  
rápido crecimiento de la microalga *Botryococcus braunii* raza B**

Tesis que presenta

**IBT. Takehiro Alfredo Ozawa Uyeda**

**Para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias  
en la especialidad de  
Biotecnología de plantas**

Director de Tesis:  
**Dr. Edmundo Lozoya Gloria**

**Irapuato, Gto.**

**2018**

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme apoyado con la beca nacional de posgrado para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias en la especialidad de Biotecnología de Plantas en el CINVESTAV Unidad Irapuato, Guanajuato.

Al CINVESTAV Unidad Irapuato, por proporcionar los recursos necesarios para realizar y concluir satisfactoriamente mi trabajo de investigación.

A mi director de tesis, el Dr. Edmundo Lozoya Gloria, por dejarme formar parte de su equipo de trabajo, por brindarme su apoyo durante el desarrollo del proyecto y creer en mí, y por sus valiosas observaciones en el ámbito académico y personal.

A mis asesores, el Dr. Alfredo Cruz Ramírez y el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim, por su apoyo durante la implementación de este proyecto, por su importante contribución en las reuniones tutoriales y la revisión de este escrito. Asimismo, al Dr. Tim Devarenne por sus valiosos consejos y observaciones a mi proyecto, así como la revisión de mi poster para el congreso de Plant Biology 2018.

A mis padres que desde siempre me han apoyado en todo, por todo ese cariño y buenos consejos, lo cual me llevó a embarcarme en este proyecto que fue la maestría. Agradezco profundamente que seguí recibiendo todo su apoyo emocional y económico, sin el cual hubiera sido muy difícil la realización de la maestría.

A cada uno de los (ex) integrantes del grupo de trabajo del laboratorio 6 del departamento de Ingeniería Genética: Xochilt, Claudia, Paty, Quiahuitl, Fernando, Sheila, Sabino, Martha Betancourt, Fany, Ivette, Pera, Edith, Paula, Alejandro (Aletz), Elvia, Alonso, Yesenia, Rocío (Chio), Nemesio y Néstor; por toda su ayuda y consejos que me brindaron durante el desarrollo de mi proyecto de mutagénesis con *B. braunii* raza B (ラボの中で最高の微細藻類), así como hacer agradable mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros de generación (agosto 2016-2018) de los que aprendí mucho y con quienes inicié este trayecto de mi vida: Moisés (Moy), Irving (Shini), Jonathan (Parce), Judith, Alan Yañez, Paola, Marquito, Alessandro, Jorge, Alan Gómez, Jaime Alanis, Ceci Nava, Iris, Mauricio, Francisco Zárate, Azucena (Azu), Nicolas (Nico), Jaime Ortega, Silvana, Erika,... , por todos los momentos juntos, por su apoyo y sus consejos. Además a mis amigos del CINVESTAV con quienes conviví: Mari, Jules, Juan Esteban, Mizra, Noé Baruch, Antolín, Bernardo, Humberto, Obed, Héctor, Christian, entre otros.

A la Sra. Magui, por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir en familia, así como por todo su apoyo, amabilidad y hospitalidad durante mi estadía en Irapuato.

Al todo el personal del Cinvestav, especialmente a don Tomás y César por lavar la enorme cantidad de material que siempre genera el laboratorio y su posterior esterilización en autoclave. Asimismo, agradezco a Lalo, Jesús, Diana y Dora por su apoyo en los tramites administrativos y solicitud de becas para posgrado y de congreso.

## Índice

Abreviaturas .....	5
Resumen .....	7
Abstract .....	8
1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. ANTECEDENTES .....	11
2.1 Biosíntesis de botryococenos y otros metabolitos .....	14
2.2 Estrategia para mejorar productividad de <i>B. braunii</i> por optimización de condiciones de cultivo .....	19
2.2.1 Cultivo de <i>B. braunii</i> en sistemas no suspendidos .....	24
2.3 Estudios de biología molecular de <i>B. braunii</i> y su aplicación biotecnológica .....	25
2.4 Estrategia para mejoramiento genético de <i>B. braunii</i> .....	26
2.5 Selección de <i>B. braunii</i> tolerantes a salinidad .....	30
3. HIPÓTESIS .....	32
4. OBJETIVOS .....	32
4.1 General .....	32
4.2 Específicos .....	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
5.1 Cultivo de algas .....	33
5.1.1 Cultivo de <i>B. braunii</i> sobre membrana de nylon .....	34
5.2 Liberación de células individuales de <i>B. braunii</i> .....	35
5.3 Inducción de mutagénesis en microalgas .....	36
5.3.1 Mutagénesis de <i>B. braunii</i> por UV-C .....	36
5.3.3 Inducción de mutagénesis en microalgas sin cultivo en membrana .....	37
5.4 Determinación del crecimiento microalgal .....	38
5.4.1 Densidad óptica .....	38
5.4.2 Peso seco .....	38
5.4.3 Evaluación de parámetros cinéticos .....	39
5.5 Cuantificación de metabolitos .....	40
5.5.1 Cuantificación de hidrocarburos en cultivos de <i>B. braunii</i> .....	40
5.5.2 Extracción y estimación de exopolisacáridos .....	41
5.5.3 Procedimiento para la extracción y cuantificación de clorofila y carotenoides .....	42
6. RESULTADOS .....	43
6.1 Transferencia de grumos de mutantes de raza B inducidos por UV-C y EMS, a biorreactores caseros .....	43
6.2 Crecimiento y metabolitos producidos por mutantes de <i>B. braunii</i> en medios con diferentes salinidades .....	50
6.3 Mutagénesis por UV-C en medio salobre de <i>B. braunii</i> raza B .....	54
7. DISCUSIÓN .....	56
7.1 Biofloculación de algas en cultivo de membrana .....	56
7.2 Crecimiento de mutantes en tratamiento de salinidad .....	59
8. CONCLUSIÓN .....	64
9. PERSPECTIVAS .....	65
10. REFERENCIAS .....	66

## Abreviaturas

APX	Ascorbato peroxidasa
BSS	<i>Botryococcus</i> escualeno sintasa
CAT	Catalasa
Chl	Clorofila (por sus siglas en inglés, <i>chlorophyll</i> )
CtrB	Fitoeno sintasa
DHA	Ácido docosahexaenoico (por sus siglas en inglés, <i>docosahexaenoic acid</i> )
DMAPP	Dimetilalilo pirofosfato
DO	Densidad óptica
DOXP	1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato
DXS	DOXP reductasa
DXS	DOXP sintasa
DW	Peso seco (por sus siglas en inglés, <i>dry weight</i> )
EMS	Etil metanosulfonato
EPA	Ácido eicosapentaenoico (por sus siglas en inglés, <i>eicosapentaenoic acid</i> )
EPS	Exopolisacáridos
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia (por sus siglas en inglés, <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
FAMEs	Éster metílico de ácidos grasos (por sus siglas en inglés, <i>fatty acid methyl esters</i> )
FBR	Fotobiorreactor
FPP	Farnesil pirofosfato
FS	Señal de fluorescencia
FW	Peso fresco (por sus siglas en inglés, <i>fresh weight</i> )
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
HC	Hidrocarburos
IPP	Isopentenil pirofosfato
LOS	Licopaoctaeno sintasa
MEC	Matriz extracelular compleja
MEP	2-C-Metileritritol 4-fosfato
MMS	Metil metanosulfonato
MNNG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
MNU	N-metil-N-nitrosourea
NADPH <sup>+</sup> y NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido y oxidado, respectivamente)
NTG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
OGMs	Organismos genéticamente modificados
PEMEX	Petróleos Mexicanos
PPi	Pirofosfato inorgánico
PSPP	Preescualeno pirofosfato
ROS	Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés de <i>reactive oxygen species</i> )
SAM	S-adenosil metionina

SAHC	S-adenosil homocisteína
SGR	Tasa específica de crecimiento (por sus siglas en inglés, <i>specific growth rate</i> )
SMT	Escualeno metiltransferasa (por sus siglas en inglés, <i>squalene methyltransferase</i> )
SOD	Superóxido dismutasa
SQE	Escualeno epoxidasa
SSL	Enzima tipo escualeno sintasa (por sus siglas en inglés, <i>squalene synthase like</i> )
TAG	Triacilgliceroles
TFA	Ácido graso total (por sus siglas en inglés, <i>total fatty acid</i> )
TLC	Contenido total de lípidos (por sus siglas en inglés, <i>total lipid content</i> )
TMT	Triterpenoide metiltransferasa
UV-C	Ultravioleta de longitud de onda corta (280 a 100 nm)
WT	Tipo silvestre (por sus siglas en inglés, <i>wild type</i> )

## Resumen

*Botryococcus braunii* es una microalga colonial que se caracteriza por producir y acumular una alta cantidad de hidrocarburos de cadena larga, que pueden ser convertidos en combustibles para vehículos convencionales. La mayoría de los hidrocarburos producidos por *B. braunii* se acumulan en una matriz extracelular (MEC), que retiene y mantiene conectadas las células, evitando la ruptura celular para la extracción de hidrocarburos. Sin embargo, la MEC contiene una estructura conocida como muro de retención, compuesta principalmente de carbohidratos, el cual impide la eficiente extracción de hidrocarburos con solventes como n-hexano cuando interactúan directamente con algas húmedas intactas. Los pretratamientos térmicos, como el secado, son generalmente usados para extraer una mayor cantidad de hidrocarburos de *B. braunii*, pero estos provocan la ruptura celular de esta microalga y elevan los costos de producción por el elevado consumo de energía. Aunque la tasa de recuperación de hidrocarburos también mejora cuando aumenta la salinidad del medio de cultivo, la tasa de crecimiento de *B. braunii* se reduce acorde a la concentración salina del medio. Adicionalmente, la tasa de crecimiento de *B. braunii* es muy lenta en comparación con otras algas oleaginosas, ya que esta alga tarda cuestión de días en duplicarse en vez de horas. Por lo tanto, en el presente trabajo se buscó mejorar genéticamente *B. braunii* raza B (cepa Showa) mediante mutagénesis aleatoria, ya sea por etil metanosulfonato (EMS) o luz UV-C. Posteriormente, se intentaron aislar líneas mutantes halotolerantes que mantengan o reduzcan su tiempo de duplicación en medio salobre ( $\geq 50$  mM NaCl) con la finalidad de explotar esta alga para la producción de biocombustible a gran escala.

## Abstract

The freshwater green alga *Botryococcus braunii* produces and accumulates large amounts of long-chain liquid hydrocarbon oils that can be used as renewable feedstocks for producing petroleum-equivalent fuels suitable for combustion engines. Most of the hydrocarbons produced by *B. braunii* are stored in an extracellular matrix (ECM), which holds together the individual cells connected, preventing cellular rupture for hydrocarbon extraction. However, the ECM contains an outer structure known as retaining wall, composed mainly of carbohydrates, which blocks an efficient hydrocarbon extraction with non-polar solvents such as n-hexane when they interact directly with intact wet algae. Thermal pre-treatments, such as drying, are generally used to improve hydrocarbon extractability of *B. braunii*, but they cause cellular breakdown and increase production costs due to the high energy consumption. Although the hydrocarbon recovery rate also improves when the salinity of the culture medium increases, the growth rate of *B. braunii* is reduced according to the medium salt concentration. Additionally, the growth rate of *B. braunii* is much lower in comparison with other oleaginous microalgae, even under the most optimal growing conditions. Therefore, in the present work we sought to generate salt-tolerant strains of *B. braunii* race B (Showa strain) by random mutagenesis, either by ethyl methane sulfonate (EMS) or UV-C light. Then, we tried to isolate halotolerant mutant lines that maintain or reduce their doubling time in brackish medium ( $\geq 50$  mM NaCl) in order to exploit this alga for large-scale biofuel production.



## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, México tiene aún una fuerte dependencia hacia los combustibles fósiles para satisfacer sus necesidades de energía primaria, y esa dependencia sigue en aumento. De 1971 a la fecha, el país ha incrementado del 83.2 % al 90.4% el consumo energético nacional, el cual procede de combustibles fósiles como el petróleo crudo, gas natural y carbón, mientras que el resto son provenientes de fuentes renovables (solar, geotérmica y eólica) y biomasa (bagazo y leña) (World Bank Group, 2018). Además, la continua caída en la producción de barriles de petróleo mexicano y la volatilidad en su cotización en los últimos años, demanda indispensablemente acelerar su transición a fuentes de energías renovables (SENER, 2017). Recientemente, Petróleos Mexicanos (PEMEX) registró una caída de 9.6% en la producción de barriles de petróleo durante el 2017, la más baja en casi cuatro décadas, debido a la reducción de su presupuesto y al declive de sus yacimientos petroleros (González, 2018).

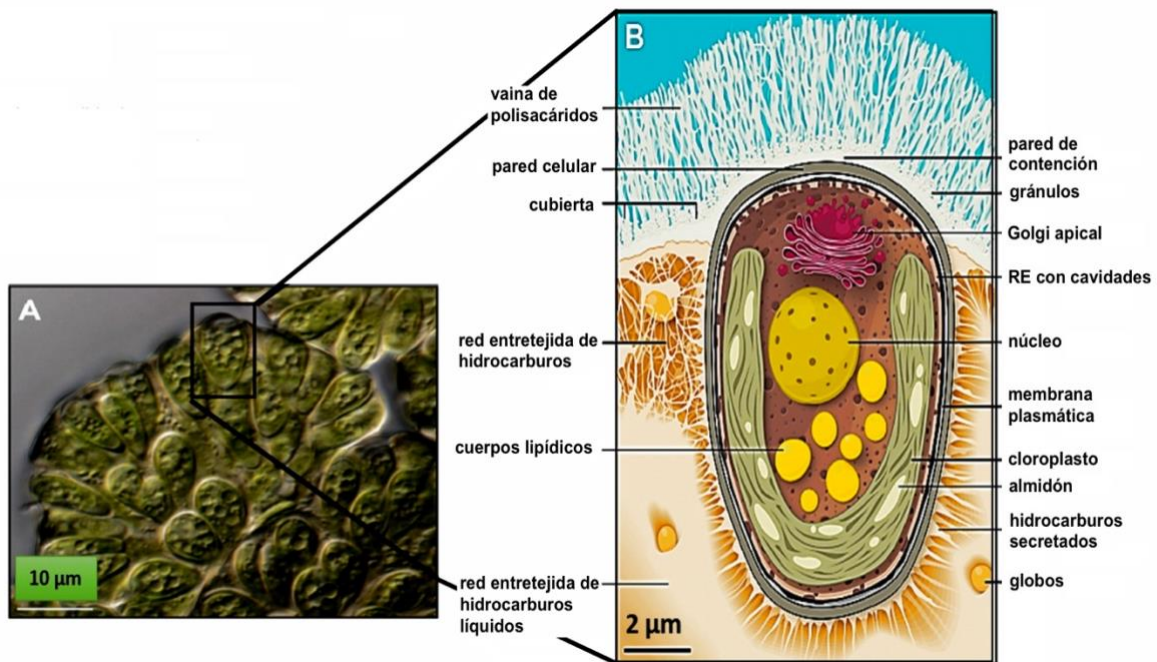
El uso de biocombustibles ha estado atrayendo más la atención como un esfuerzo para resolver problemas relacionados al agotamiento de las reservas mundiales de combustibles fósiles, el cambio climático y el calentamiento global. Los biocombustibles de primera generación derivados de las partes comestibles de cultivos agrícolas (maíz, caña de azúcar, soya, etc.), ricos en almidón y lípidos, han generado impactos negativos sobre la seguridad alimentaria, incrementado la escasez de agua y la deforestación. La segunda generación de biocombustibles derivados de residuos agrícolas ricos en lignocelulosa (bagazo, madera, paja, etc.) y aceites de plantas no comestibles (*Jatropha curcas*, *Miscanthus x giganteus*, etc.), aún requieren grandes superficies de tierra que podría ser utilizada para la producción de alimentos. Para los biocombustibles de tercera generación, las microalgas representan una prometedora fuente de energía renovable porque convierten el CO<sub>2</sub>, luz y agua en energía bioquímica. Esta energía bioquímica es almacenada en forma de carbohidratos y lípidos que posteriormente son utilizados como materia prima en la generación de bioetanol y biodiésel, respectivamente. Además, a las microalgas se les han atribuido ventajas sobre los biocombustibles de primera y segunda generación porque pueden generar un alto contenido de lípidos, pueden cultivarse en tierras no aptas para cultivo, el consumo de agua es mucho menor que el requerido para cultivos agrícolas, y tienen el potencial de fijar CO<sub>2</sub> de efluentes industriales (Chisti, 2007; Maity *et al.*, 2014).

Diversas especies de microalgas, tales como *Chlorella* spp., *Scenedesmus* spp., *Dunaliella* spp., *Nannochloropsis* spp., y otras; producen y acumulan aceites como triacilglicerolos (TAG) para producir biodiésel en forma de éster metílico de ácidos grasos (FAME), por un proceso conocido como transesterificación (Chisti, 2007). No obstante, estos biocombustibles se caracterizan por su pobre estabilidad oxidativa, bajo contenido energético por volumen y alto contenido de compuestos oxigenados, que perjudican los motores de combustión convencionales y pueden causar corrosión, erosión y acumulación de depósitos en las toberas de los motores. Por lo tanto, no pueden usarse solos o en una gran proporción de una mezcla con un combustible estándar (Nagano *et al.*, 2012). Entre las diversas especies de microalgas estudiadas, *Botryococcus braunii* ha sido identificada como una de las algas más prometedoras para la producción de biocombustibles porque sintetiza una alta cantidad de aceites de hidrocarburos de cadena larga y no oxigenados, que son similares a los obtenidos de la destilación fraccionada de petróleo crudo (Metzger & Largeau, 2005).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Botryococcus braunii* como modelo de estudio para producción de hidrocarburos

*Botryococcus braunii* es una microalga colonial, piriforme, que pertenece al filo de algas verdes *Chlorophyta* y la clase *Trebouxiophyceae*. *B. braunii* puede ser encontrada en cuerpos de agua dulce, como lagos y estanques, en zonas templadas y tropicales, así como lagos salobres y ocasionalmente en estuarios y fiordos (Banerjee *et al.*, 2002; Volkman, 2014). El tamaño de las colonias varía de 90 a 340  $\mu\text{m}$  de acuerdo a las condiciones de cultivo (Khatri *et al.*, 2014). Cada colonia está conformada por un grupo de aproximadamente 50 a 100 células independientes (8-13 x 5-9  $\mu\text{m}$ ), que se mantienen unidas por una matriz extracelular compleja (MEC) conformada de polisacáridos mucilaginosos y polímeros de hidrocarburos específicos según la raza (Fig. 1). *B. braunii* produce aceites de hidrocarburos de cadena larga en grandes cantidades durante su fase de crecimiento y secreta estos aceites dentro de la MEC, donde la mayoría de estos aceites (90-95%) son almacenados (Banerjee *et al.*, 2002; Metzger & Largeau 2005; Weiss *et al.*, 2012).



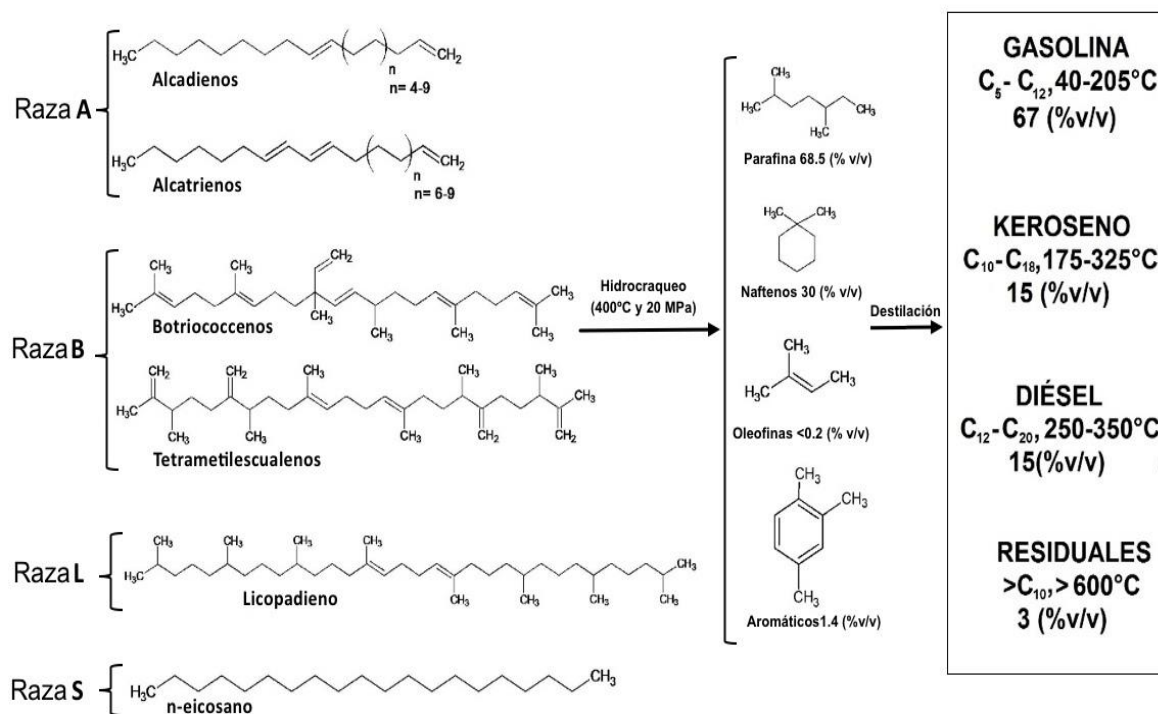
**Figura 1. Modelo de una célula *B. braunii* dentro de una colonia** (Modificado de Weiss 2012). Imagen a color en microscopía DIC de una colonia de *B. braunii* (A) y modelo de la célula *B. braunii* y sus matrices extracelulares que la rodean (B). Las porciones de la MEC de hidrocarburos en todo el borde de la célula y en el cuadrante superior derecho, se dibujan sin los hidrocarburos líquidos para mostrar la estructura subyacente de estas regiones.

La MEC de *B. braunii* está constituida por cuatro componentes principales que la distinguen notablemente con respecto a otras microalgas verdes multicelulares como *Volvox carteri*: 1) Cada célula está protegida por una pared celular fibrosa que está compuesta de  $\beta$ -1,4- y/o  $\beta$ -1,3-glucano, incluyendo celulosa. 2) El espacio intracoloniales está constituido de una red de polímeros de hidrocarburos poliacetales de cadena larga que están reticulados a través de un enlace químico fuerte (puentes de epóxido) a los monómeros de los aceites de hidrocarburos líquidos y que son específicos de cada raza, para ofrecer integridad estructural a la MEC. 3) Cerca del borde exterior del MEC se encuentra el muro de retención, que está constituido de la red de hidrocarburos reticulados, y tiene la función de contener los hidrocarburos líquidos alrededor de las celdas y dentro del MEC. 4) En la parte externa de las colonias de *B. braunii*, cubriéndolas por encima del muro de retención, hay una red de fibras de polisacáridos (2-3  $\mu\text{m}$  de largo) que las envuelve, compuesta principalmente por galactosa y arabinosa (81 %) y que posiblemente limitan la degradación por bacterias que cohabitan en el medio ambiente (Banerjee *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2012). Algunas de las posibles funciones de la MEC es permitir a la microalga flotar y tener mayor exposición a la luz, aunque pudiera tener otras funciones adicionales aún desconocidas (Banerjee *et al.*, 2002).

Las cepas de *B. braunii* se clasifican principalmente en tres razas (raza A, B y L) de acuerdo a los tipos de hidrocarburos que producen. La raza A produce alcadienos y alcatrienos derivados de ácidos grasos, particularmente de ácido oleico. Estos alcadienos y alcatrienos son moléculas de cadena impar de carbonos ( $\text{C}_{23}$  - $\text{C}_{33}$ ) que tienen dos o tres dobles enlaces. La raza A puede acumular los alcadienos y alcatrienos hasta un 61% en peso seco de biomasa. La raza B produce principalmente hidrocarburos triterpenoides, denominados como botryococenos, así como escualenos y sus derivados metilados en menor cantidad. Los botryococenos son hidrocarburos tipo trienos ramificados con estructura acíclica o cíclica, que tienen una fórmula general de  $\text{C}_n\text{H}_{2n-10}$ ,  $30 \leq n \leq 37$ , y se pueden acumular alrededor de 20-86% de peso seco de la biomasa. De los 50 botryococenos identificados, sólo se han determinado unas 15 estructuras debido a las dificultades encontradas en su purificación (Metzger & Largeau, 2005). Recientemente, se logró aislar y caracterizar tres moléculas cíclicas de botryococeno  $\text{C}_{33}$  y un nuevo isómero trimetilescualeno (Tatli *et al.*, 2017). La

raza L sintetiza los tetraterpenos conocidos como licopadienos ( $C_{40}H_{78}$ ) y pueden acumular de 0.1-8% de peso seco (Metzger & Largeau, 2005). Aparte de estas tres razas reconocidas y documentadas, Kawachi *et al.*, (2012) propone tentativamente una cuarta raza (S) que sintetiza pequeños n-alcenos saturados de  $C_{18}$  y  $C_{20}$  y epoxi-alcenos, pero se desconoce la cantidad de hidrocarburos acumulados y no está completamente aceptada.

Entre los distintos tipos de hidrocarburos producidos por *B. braunii*, los botryococenos de *B. braunii* raza B, son la fuente más prometedora de biocombustibles renovables, ya que presentan mayor contenido energético u octanaje que los hidrocarburos de raza A y pueden acumularse en mayor cantidad que la raza L (Metzger & Largeau, 2005). Los botryococenos pueden convertirse fácilmente por métodos estándar de hidrocrqueo en combustibles equivalentes al petróleo, obteniendo un destilado compuesto por 67% de gasolina, 15% keroseno como combustible de aviones, 15% de diésel y 3% de aceite residual (Fig. 2). Estos productos pueden ser utilizados actualmente en motores de combustión interna para vehículos convencionales (Hillen *et al.*, 1982).



**Figura 2. Hidrocarburos producidos por las diversas razas de *B. braunii*.** Adaptado y modificado de Hillen *et al.*, (1982); Metzger & Largeau (2005); Niehaus *et al.*, (2011).

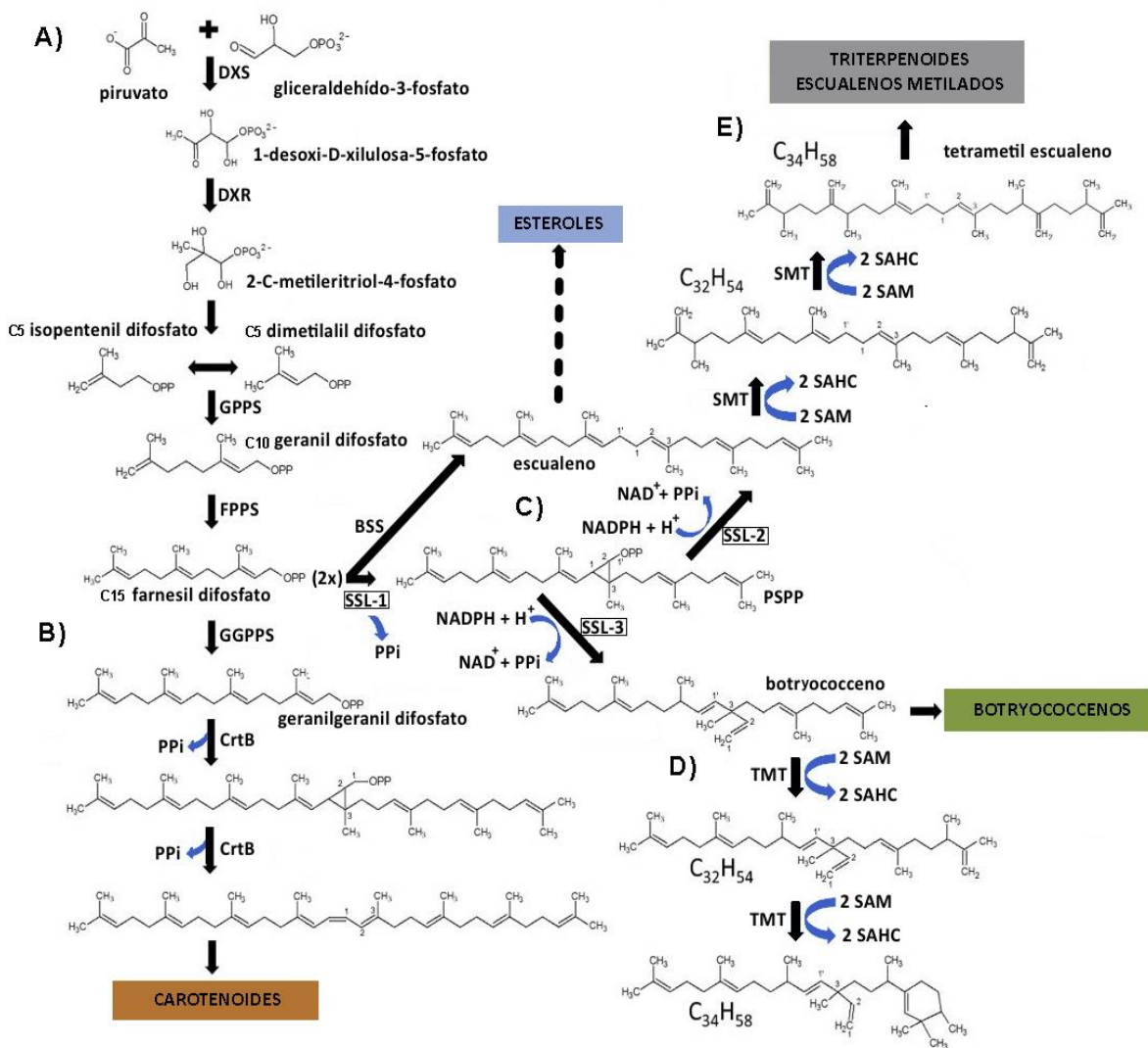
Además, los hidrocarburos de *B. braunii* raza B presentaron valores casi iguales en densidad y la tensión superficial que los del petrodiesel, pero la viscosidad cinemática y temperatura de destilación fueron más alta en comparación con el diésel (Nagano *et al.*, 2012). Como consecuencia, se ha estado desarrollando tecnología de hidrocraqueo para que este aceite de hidrocarburo cumpla con las especificaciones requeridas para funcionar como combustible. Yamamoto *et al.*, (2014) convirtió el aceite de *B. braunii* raza B en diésel con un rendimiento del 85%, usando un proceso de conversión simple y en condiciones suaves de 260 °C y 1 atm. Las propiedades físicas del aceite convertido están relativamente cerca de la especificación del diésel, con un número estimado de cetano de 40.

## 2.1 Biosíntesis de botryococenos y otros metabolitos

Con base en el análisis del transcriptoma de *B. braunii* raza B (Niehaus *et al.*, 2011) y otros estudios, se sugiere que la biosíntesis de botryococenos en la raza B comienza a partir de la vía MEP/DOXP (2-C-metileritritol 4-fosfato/1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato) (Sato *et al.*, 2003; Molnár *et al.*, 2012). El primer paso involucra la condensación del piruvato y el gliceraldeído-3-fosfato por la DOXP sintasa (DXS) para formar el DOXP. La caracterización de tres isoenzimas de DXS en la raza B demuestra que están activas y tienen parámetros cinéticos similares, lo que aumenta el flujo metabólico hacia la producción de terpenoides (Matsushima *et al.*, 2012). El DOXP es reducido a MEP por la DOXP reductoisomerasa (DXR). A partir de MEP se produce el isopentenil pirofosfato (IPP) y el dimetilalilo pirofosfato (DMAPP) ambos de 5 carbonos, que mediante una condensación forman el geranil pirofosfato C10 (GPP) y con la adición de otra molécula de IPP se obtienen las subunidades de farnesil pirofosfato C15 (FPP) con el que se inicia la síntesis de botryococenos en *B. braunii* (Fig. 3).

Por condensación de dos subunidades de FPP se obtiene una unidad de botryococeno o de escualeno que son moléculas similares entre ellas, pero la condensación necesaria para su formación es distinta ya que intervienen enzimas diferentes que llevan a cabo el proceso de forma específica (Matsushima *et al.*, 2012). La producción de escualeno inicia con la enzima *Botryococcus* escualeno sintasa (BSS) a partir de dos moléculas de FPP, mientras

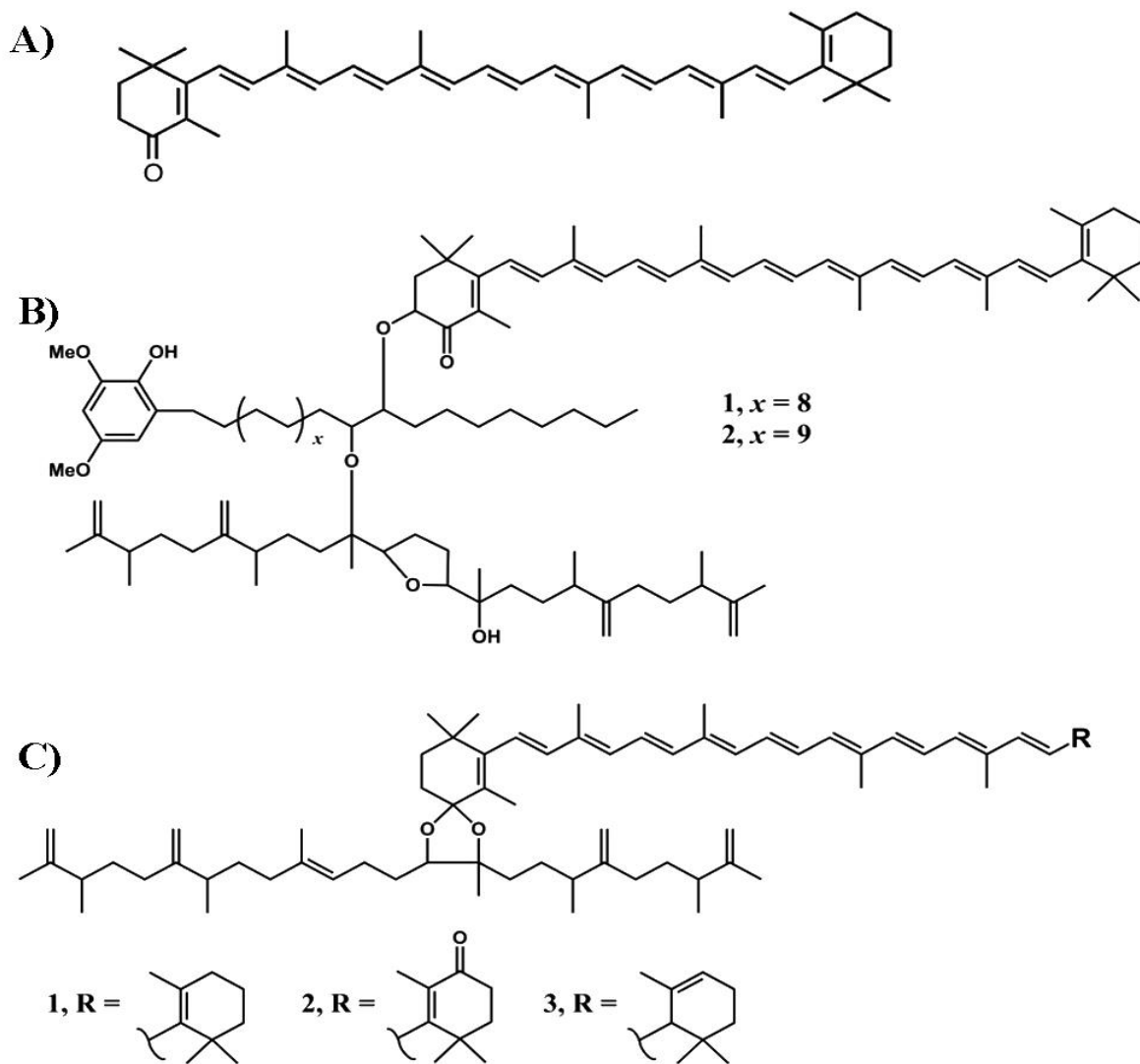
que en los botryococenos se produce el intermediario ciclopropil, preescualeno pirofosfato (PSPP) (Fig. 3c) (Okada *et al.*, 2000). En presencia de NADPH, el PSPP tiene dos opciones: 1) la formación del botryococeno con una conexión C3-C1' entre dos moléculas de FPP (Fig. 3d); y 2) se forma un enlace C1-C1' entre dos moléculas de FPP, produciendo escualeno que será metilado (Fig. 3e). Estas reacciones son catalizadas por enzimas similares a escualeno sintasas (SSL). Niehaus *et al.*, (2011) identificaron 3 genes de SSL, ninguna de las enzimas codificadas produce botryococenos independientemente, pero cuando las 3 SSLs se combinaron de manera específica entre sí *in vivo* e *in vitro*, se formó un botryococeno (SSL-1 + SSL-3) o un escualeno (SSL1 + SSL-2). La SSL-1 puede condensar dos moléculas de FPP para producir el PSPP (Okada *et al.*, 2004), lo que demuestra la versatilidad y el potencial para la ingeniería metabólica de la biosíntesis de botryococenos. La mayoría de los botryococenos son excretados a la MEC, donde son metilados. Las formas di- y tetrametiladas se relacionan con seis genes que codifican para triterpeno y escualeno metiltransferasas (TMT y SMT) (Fig. 3d y 3e) (Niehaus *et al.*, 2012). Los botryococenos son metilados para producir hidrocarburos C<sub>31</sub>-C<sub>37</sub>, siendo el C<sub>34</sub> predominante en la raza B. También se identificaron dos escualenos epoxidadas BbSQEs-I y BbSQEs-II que convierten al escualeno en fitoesteroles membranales (Uchida *et al.*, 2015).



**Figura 3. Mecanismo de biosíntesis de tri- y tetraterpenos en *B. braunii* raza B.** A) Formación de FPP; B) Formación de carotenoides a partir de GGPP; C) Formación de escualeno a partir de FPP; D) Formación de botryococcenos metilados; E) Formación de escualenos metilados. (BSS), *Botryococcus* escualeno sintasa; (CrtB), fitoeno sintasa; (DXR), 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductasa; (DXS), 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; (FPPS), farnesil pirofosfato sintasa; (GPPS), geranyl pirofosfato sintasa; (NADPH<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH<sup>+</sup> reducido y NADP<sup>+</sup> oxidado); (PPi), pirofosfato inorgánico; (PSPP), presqualeno pirofosfato; (SAM), S-adenosil metionina; (SAHC), S-adenosil homocisteína; (SSL), tipo escualeno sintasa; (SMT), escualeno metiltransferasa; (TMT), triterpeno metiltransferasa. Morales-de la Cruz *et al.*, (comunicación personal). Modificado de Molnár *et al.*, (2012); Cornejo-Corona *et al.*, (2015).



Por otra parte, la adición de otra molécula de IPP al FPP forma el geranylgeranyl pirofosfato C<sub>20</sub> (GGPP), que es precursor de los carotenoides tetraterpenoides (Fig. 3b). Esto inicia con la formación de un *trans*-isoprenil pirofosfato por la fitoeno sintasa (C<sub>tr</sub>B), condensando dos moléculas de GGPP en dos pasos con la liberación de pirofosfato. En el primer paso se produce (1R;2R,3R)-prefitoeno pirofosfato con una mitad ciclopropil (C<sub>1'</sub>-2-3) que se reordena para proporcionar 15-*cis*-fitoeno, el cuál puede ser convertido en una gran variedad de carotenoides (Fig. 4). Durante la fase de crecimiento de *B. braunii* razas B, el principal carotenoide producido fue la luteína (22-29%), seguido de otros carotenoides en cantidades similares como β-caroteno, equinenona, 3-OH equinenona, cantaxantina, violaxantina, lodoxantina y neoxantina. Por el contrario, la cantaxantina (46%) y la equinenona (20-28%), fueron los carotenoides predominantes en la fase estacionaria como respuesta a la deficiencia de nitrógeno (Grung *et al.*, 1989). Adicionalmente, se reportaron otros nuevos carotenoides aislados e identificados en la raza B como la botrioxantina A y B, la braunixantina 1 y 2, y la botrisoxantina, que participan en la coloración de esta microalga colonial (Okada *et al.*, 1996, 1997, 1998; Nakamura *et al.*, 2016).



**Figura 4. Estructuras químicas de carotenoides secundarios representativos identificados en *B. braunii* raza B. (A),  $\beta$ -equinenona; (B), braunixantina-1 y -2; (C), botryoxantina A (1), botryoxantina B (2) y  $\alpha$ -botryoxantina A (3). Tomado de Nakamura *et al.*, (2016).**

## 2.2 Estrategia para mejorar productividad de *B. braunii* por optimización de condiciones de cultivo

Uno de los principales problemas del uso de *B. braunii* para la producción de biocombustibles, es su tasa de crecimiento, la cual es muy lenta en comparación con otras algas oleaginosas. El tiempo de duplicación de *B. braunii* es de XX días en promedio, en vez de horas como en otras algas (Cornejo *et al.*, 2015). Se hipotetiza que este crecimiento lento de *B. braunii*, incluso en las mejores condiciones de cultivo, puede estar relacionado con su producción de hidrocarburos, porque invierte más fotosintatos hacia la vía de los terpenoides para que se complete la biosíntesis de altas cantidades de hidrocarburos, lo cual ocurre a expensas de la generación de biomasa (Melis, 2012). Por lo tanto, las investigaciones recientes se han enfocado principalmente en optimizar las condiciones nutricionales y sistemas de cultivo para incrementar la generación de biomasa y producción de metabolitos (Dayananda *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2014).

El crecimiento y producción de hidrocarburos son afectados por diversos factores, que involucran la cepa, el CO<sub>2</sub>, la intensidad de la luz, el agua, los nutrientes (nitrógeno, fósforo y elementos traza), así como las condiciones de temperatura, pH y salinidad (Yoshimura *et al.*, 2013). En la Tabla 1 se presentan algunas estrategias para promover tanto el aumento de la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ), definida como el aumento en la concentración de células por unidad de tiempo, como la biosíntesis de hidrocarburos. En general, los tiempos de duplicación de los cultivos de *B. braunii* se encuentran en el intervalo de 2.3 -7 días ( $\mu = 0.1-0.3 \text{ día}^{-1}$ ), aunque se ha logrado un tiempo de duplicación corto de hasta 1.4 días ( $\mu = 0.5 \text{ día}^{-1}$ ) bajo condiciones controladas en tubos de ensayo (Yoshimura *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2016;). Sin embargo, todavía es inferior al tiempo de duplicación promedio de las algas verdes y cianobacterias que oscila entre 24 h ( $\mu = 0.69 \text{ día}^{-1}$ ) y 17 h ( $\mu = 0.96 \text{ día}^{-1}$ ), respectivamente (Griffiths & Harrison, 2009).

**Tabla 1.** Comparación de condiciones de cultivo, tasa de crecimiento y contenido de hidrocarburos entre cepas de *B. braunii* reportadas en estudios previos a escala laboratorio con respecto otras microalgas oleoginosas.

Cepa (Raza)	Condiciones de cultivo				Tasa específica de crecimiento ( $\mu$ , día <sup>-1</sup> )	Tiempo de duplicación (días)	Hidrocarburos totales (%DW)	Referencia
	Temp (°C)	PAR ( $\mu$ moles de fotones /m <sup>2</sup> .s)	Fotoperiodo (hora luz:osc)	CO <sub>2</sub> (%)				
Showa (B)	30	850	14:10	1	0.5	<b>1.40</b>	ND	Yoshimura <i>et al.</i> , (2013)
Showa (B)	25 y 30	85-398	14:10	1.0 - 10.0	0.19-0.44	<b>1.60-3.60</b>	30-39	Yoshimura <i>et al.</i> , (2013)
Showa (B)	23-25	250	24	0.3	0.42	1.70	24-29	Wolf <i>et al.</i> , (1985)
Showa (B)	23	150	16:8	2	0.17	4.08 <sup>b</sup>	25	Gouveia <i>et al.</i> , (2017)
Yayoi (B)	25	240	12:12	2	0.2	3.50	40.5	Okada <i>et al.</i> , (1997)
AC759 (B)	23	150	16:8	2	0.07	9.90 <sup>b</sup>	21	Gouveia <i>et al.</i> , (2017)
AC761 (B)	23	150	16:8	2	0.11	6.30 <sup>b</sup>	45	Gouveia <i>et al.</i> , (2017)
IPE001 (B)	25	35	16:8	1	0.15 <sup>a</sup>	4.50 <sup>a</sup>	64.3	Xu <i>et al.</i> , (2012)
BOT-144 (B)	25	60 (luz azul $\lambda= 470$ nm)	24	0	0.16	4.33 <sup>b</sup>	50	Baba <i>et al.</i> , (2012)
LB-572 (A)	26	12 klux	24	2	0.07 <sup>a</sup>	10.60 <sup>a</sup>	28	Rao <i>et al.</i> , (2007)
Göttingen 807/1 (A)	25	26 W/m <sup>2</sup>	14:10	1	0.3	2.30	40.5	Casadevall <i>et al.</i> , (1985)
AC755 (A)	23	150	16:8	2	0.05	13.86 <sup>b</sup>	16	Gouveia <i>et al.</i> , (2017)
CCALA777 (A)	23	150	16:8	2	0.06	11.55 <sup>b</sup>	10	Gouveia <i>et al.</i> , (2017)
CCALA778 (A)	23	150	16:8	2	0.17	4.08 <sup>b</sup>	0	Gouveia <i>et al.</i> , (2017)
CCAp807/2 (A)	23	150	16:8	2	0.11	6.30 <sup>b</sup>	7	Gouveia <i>et al.</i> , (2017)
KMITL-2 (A)	25	60	12:12	10	0.24	2.88 <sup>b</sup>	21	Ruangsoomboon <i>et al.</i> , (2017)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	23	70	24	0	ND	<u>5-8 h</u>	-	Lee & Fiehn, (2008)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	25	180	24	10	0.993	<u>16.8 h</u>	-	Tang <i>et al.</i> , (2011)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	30	150	24	0.04 - 5	ND	1.4-2.2	-	Gouveia <i>et al.</i> , (2009)

ND (no hay información). <sup>a</sup>. Valores estimados por Yoshimura *et al.*, 2013; <sup>b</sup>. Valores calculados a partir de la tasa de crecimiento reportada en los artículos, utilizando la ecuación:  $\ln(2)/\mu$

Aunque la mayoría de estos estudios previos se han realizado a escala laboratorio, también se ha reportado el cultivo de *B. braunii* en diferentes sistemas de cultivo, ya sea sistemas abiertos o cerrados (Tasić *et al.*, 2015). La Tabla 2 resume algunos estudios sobre el crecimiento celular y productividad de hidrocarburos en *B. braunii* utilizando diferentes sistemas de cultivo a escala laboratorio, piloto o semi-industrial. Se ha demostrado que *B. braunii* puede crecer en fotobiorreactor (FBR) semicontinuo de manera eficiente, alcanzando concentraciones de biomasa de hasta 20 g/L en un FBR semicontinuo de “tickle film” o película de goteo, bajo una tasa de dilución de 0.05 día<sup>-1</sup> (Khatri *et al.*, 2014).

**Tabla 2.** Comparación de diferentes sistemas de cultivo, tasa de crecimiento, concentración máxima celular ( $X_{max}$ ), productividad de biomasa ( $P_x$ ), contenido y productividad ( $P_{HC}$ ) de hidrocarburos de *B. braunii* reportadas en estudios previos.

Cepa (Raza)	Sistema de cultivo (volumen o área)	Condiciones de cultivo			Biomasa			Hidrocarburos		Referencias
		Temp (°C)	PAR ( $\mu$ moles de fotones / $m^2 \cdot s$ ) y Fotoperiodo (hora luz) en un día	CO <sub>2</sub> (%)	Tasa específica de crecimiento ( $\mu$ , día <sup>-1</sup> )	X <sub>max</sub> (g/L)	P <sub>x</sub> (mg/L.día)	Contenido (% PS)	P <sub>HC</sub> (mg/L.día)	
GUBIOTJTBB1	Biorreactor plano (3 L)	25	35 (16 h)	0%	0.112	ND	13	52.6	6.8	Talukdar <i>et al.</i> , (2013)
765	FBR de columna (3 L)	25	150 (24 h)	20%	0.13 <sup>a</sup>	ND	92.4	24.45 <sup>a</sup>	22.6	Ge <i>et al.</i> , (2011)
ND	FBR tipo "Airlift" (10 L)	25	270 (24 h)	Mixotrófico (CO <sub>2</sub> y glucosa)	ND	4.55	234	29.7	71.1	Zhang <i>et al.</i> , (2011)
UTEX-LB 572 (A)	Estanque circular (50 L)	T° ambiente	Radiación solar	0%	ND	ND	77.8	19	13.2	Rao <i>et al.</i> , (2012)
N-836 (B)	Estanque tipo raceway (80 L)	T° ambiente	Radiación solar	0%	ND	ND	40	24	10.8	Rao <i>et al.</i> , (2012)
AP103	Estanque de lagunas abiertas o raceway (1800 L)	29	Radiación solar de 5 kWh/ m <sup>2</sup> .día	0.02%	0.38	ND	114	11	12.5	Ashokkumar & Rengasamy, (2012)
Showa (B)	FBR tipo "tickle film" (30.5x16.5 in) semicontinuo	25-28	282 (15 h)	5-7%	ND	<b>20</b>	<b>1500</b>	<b>22.3-26.8</b>	<b>250-300</b>	Khatri <i>et al.</i> , (2014)

ND (no hay información disponible); FBR (Fotobiorreactor) <sup>a</sup>. Valores estimados por Yoshimura *et al.*, (2013) <sup>b</sup>. g/m<sup>2</sup>; <sup>c</sup>. g/m<sup>2</sup>/día

Continuación. **Tabla 2**

Cepa (Raza)	Sistema de cultivo (volumen o área)	Condiciones de cultivo			Biomasa			Hidrocarburos		Referencias
		Temp (°C)	PAR (μmoles de fotones /m <sup>2</sup> .s) y Fotoperiodo (hora luz) en un día	CO <sub>2</sub> (%)	Tasa específica de crecimiento (μ, día <sup>-1</sup> )	Xmax (g/L)	Px (mg/L.día)	Contenido (% PS)	P <sub>HC</sub> (mg/L.día)	
Overjuyo-3 (B)	Tanque abierto (500 L)	25	54 (24 h)	0.02%	ND	3.01	76.25	20	18.78	Al-Hothaly <i>et al.</i> , (2015)
Kossou-4 (B)	Tanque abierto (500 L)	25	54 (24 h)	0.02%	ND	2.55	63.25	50	15.78	Al-Hothaly <i>et al.</i> , (2015)
UTEX-LB 572 (A)	FBR tipo "biopelícula" (0.275 m <sup>2</sup> o 600 mL)	25	55 (24 h)	1%	ND	96.4 <sup>c</sup>	0.71 <sup>c</sup>	ND	ND	Ozkan <i>et al.</i> , (2012)
UTEX-LB 572 (A)	Paneles de biorreactores por lote (400 L)	T° ambiente	Radiación solar de 60	0.02%	0.09	0.35	20	23.6	25	Bazaes <i>et al.</i> , (2012)
FACHB 357 (B)	Biorreactores "attached" (0.08 m <sup>2</sup> o 240 mL)	25	500 (24 h)	1%	ND	62 <sup>b</sup>	5.5-6.5 <sup>c</sup>	19.43	1.06 <sup>c</sup>	Cheng <i>et al.</i> , (2013)
TN101	Biorreactor tipo raceway (25 m <sup>2</sup> o 5000 L) semicontinuo	T° ambiente	Radiación solar	0.02%	ND	ND	33.8 <sup>c</sup>	22.6	8.2-13 <sup>c</sup>	Ashokkumar <i>et al.</i> , (2014)

ND (no hay información disponible); FBR (Fotobiorreactor) <sup>a</sup>. Valores estimados por Yoshimura *et al.*, (2013) <sup>b</sup>. g/m<sup>2</sup>; <sup>c</sup>. g/m<sup>2</sup>/día

### 2.2.1 Cultivo de *B. braunii* en sistemas no suspendidos

Las microalgas cultivadas están comúnmente suspendidas en un medio de cultivo, donde fluyen libremente en el medio para garantizar la distribución uniforme de las células. Sin embargo, cosechar grandes volúmenes de microalgas es extremadamente costoso hasta la fecha. Uno de los métodos de cultivo alternativo y novedoso es el sistema de cultivo no suspendido, en donde las algas se cultivan en superficies para formar una densa biopelícula de microalgas sobre una membrana o filtro. Su principal ventaja es el bajo consumo de agua y la facilidad de separar la biomasa de microalgas del medio, cuando acumulan cantidades significativas de biomasa en una área pequeña (Katarzyna *et al.*, 2015). Cheng *et al.*, (2013) reportan que *B. braunii* (FACHB 357) alcanzó una productividad de 5.5 g/m<sup>2</sup>.día en un sistema de cultivo no suspendido, donde las microalgas se colocaron en un sustrato verticalmente posicionado con medio de cultivo suministrado solo para mantener las superficies húmedas. Asimismo, Wijihastuti *et al.*, (2017) reportaron un aumento en la generación de biomasa de *B. braunii* raza B (BOT 22) y L (BOT 84), las cuales fueron filtradas en membranas y colocadas encima de una esponja humedecida con medio durante 10 semanas. No obstante, la producción de contenido lipídico fue relativamente menor en comparación al cultivo en medio líquido, posiblemente por las condiciones adversas de este sistema de cultivo. En el trabajo de tesis doctoral de Cornejo-Corona (2017), se encontró la formación de “grumos” o colonias granulares de algas verdes encima de la biopelícula de *B. braunii* raza B (Showa) después de tres semanas de cultivo en membranas de nylon sobre medio sólido. Aunque este posible mecanismo de adhesión entre algas todavía no está completamente estudiado, la formación rápida de estas colonias en cultivo no suspendido podría ayudar en la selección y evaluación de mutantes de *B. braunii* bajo diferentes tratamientos.



## 2.3 Estudios de biología molecular de *B. braunii* y su aplicación biotecnológica

Con el objetivo de mejorar la productividad de los hidrocarburos mediante ingeniería genética, se han estudiado datos transcriptómicos y se han identificado genes que codifican enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de botryococenos en *B. braunii* raza B, tales como enzimas similares a escualeno sintasa (SSL) y triterpenoide metiltransferasa (TMT) (Okada *et al.*, 2004; Molnár *et al.*, 2012; Niehaus *et al.*, 2011, 2012). Igualmente, se identificó recientemente un gen que codifica un SSL, denominada licopaoctaeno sintasa (LOS), implicado en el inicio de la síntesis de licopadieno en la raza L (Thapa *et al.*, 2017). La actividad de estas enzimas codificadas fue verificada mediante ensayos de complementación en levadura y estudios *in vitro*. También se han estudiado y verificado otros genes que están involucrados en la respuesta temprana a condiciones de estrés como *BbDAD1* y transportadores de amonio como fuente alterna de nitrógeno mediante *BbAMT1* (Cornejo-Corona *et al.*, 2016; Nakamura *et al.*, 2017).

Otro enfoque alternativo para mejorar la productividad de los hidrocarburos involucra la expresión heteróloga de genes biosintéticos de botryococenos en otros microorganismos de rápido crecimiento y genéticamente manipulables, ya sea bacterias, algas o plantas terrestres. Zhuang & Chappell (2015) reportaron la producción heteróloga de botryococenos de hasta 65 mg/L en levadura. Recientemente, diversos estudios han reportado la generación de líneas transgénicas de plantas modelo como *Nicotiana tabacum* productoras de botryococenos, con la expresión génica dirigida hacia el citosol o plástido (Jiang *et al.*, 2016; 2018), en semillas de *Arabidopsis thaliana* (Kempinski & Chappell, 2018) y en monocotiledóneas como *Brachypodium distachyon* y *Sorghum bicolor* (Kempinski *et al.*, 2018). Sin embargo, la producción de botryococenos en plantas transgénicas todavía no es redituable debido a su muy baja producción en comparación a *B. braunii*, pues se ha reportado producción de hasta 0.544 mg/g y 1 mg/g de peso fresco (~ 0.1% biomasa) en hojas de *N. tabacum* y *B. distachyon*, respectivamente. Además, se reportaron efectos adversos en el crecimiento y desarrollo de las líneas transgénicas que sintetizaban botryococenos o triterpenos metilados, dependiendo del compartimento subcelular y la especie (Jiang *et al.*, 2016; Kempinski *et al.*, 2018). Estas afectaciones fueron más severas de acuerdo con la complejidad estructural del triterpeno en vez de la cantidad de triterpenos acumulados (Jiang *et al.*, 2018).

## 2.4 Estrategia para mejoramiento genético de *B. braunii*

Se han desarrollado varios métodos para la transformación genética por biobalística, *Agrobacterium tumefaciens*, y electroporación en microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis* spp y *Chlorella* spp, . Sin embargo, estos métodos no son efectivos para la transformación genética de las células de *B. braunii* por su crecimiento colonial. Adicionalmente, la MEC de *B. braunii* actúa como una fuerte barrera física conformada por polímeros y aceites de hidrocarburos que impide la transformación genética, mientras que la pared celular de microalgas modelos como *C. reinhardtii* son delgadas y flexibles (Gong *et al.*, 2011).

En un organismo particular naturalmente ocurre una baja frecuencia de mutaciones espontáneas; sin embargo, se puede inducir la mutagénesis de manera rápida, sencilla y aleatoria mediante el uso mutágenos físicos y/o químicos. Los mutágenos físicos involucran la exposición del organismo de interés a rayos UV-C, X, o gamma. La luz UV-C induce mutaciones que suelen ser causadas por la formación de dímeros de pirimidinas, especialmente timinas (Fu *et al.*, 2016). Por el contrario, los mutágenos químicos más empleados son generalmente agentes alquilantes, tales como el etil metanosulfonato (EMS), metil metanosulfonato (MMS), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG o NTG), N-metil-N-nitrosourea (MNU), entre otros (Lim & Schenk, 2017). En el caso de EMS, este agente induce mutaciones aleatorias en el genoma por sustitución de nucleótidos, especialmente por alquilación de guanina cuando un grupo etilo se une a la guanina. Como consecuencia, se produce una base anormal de O-6-etilguanina, que se complementa con una timina en vez de citosina durante la replicación del genoma y ocasiona la transición de un par G-C a uno A-T en la siguiente ronda de replicación (Griffith *et al.*, 2000). Las ventajas de la mutagénesis con EMS con respecto a la luz UV-C incluyen una amplia gama de aplicaciones, alta frecuencia y eficiencia de mutagénesis; pero la mutagénesis con UV-C puede manejarse de manera más flexible y segura para evitar la contaminación secundaria (Zhang *et al.*, 2016; Lim & Schenk, 2017). Sin embargo, todavía existen desafíos técnicos en la mutagénesis de microalgas coloniales o formadoras de biopelículas a causa de la MEC que podría reducir el efecto de mutágenos (Nojima *et al.*, 2017).

Después de la mutagénesis y formación de colonias en medio de cultivo sólido, se seleccionan las mutantes estables que exhiben los rasgos fenotípicos deseados. Adicionalmente,

existen métodos alternativos de selección de alto rendimiento, basados en citometría de flujo como la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) (Hathwaik *et al.*, 2016). Sin embargo, en cualquiera de estos métodos, la agregación de células unidas por una MEC es un problema durante el paso de selección porque las células mutadas deben estar adecuadamente disgregadas para poder aislar células individuales mutantes con el fenotipo deseado y separarlas del resto de las células que la rodean (Nojima *et al.*, 2017). Estos métodos de mutagénesis aleatoria son todavía útiles, simples y los más convenientes entre los métodos de mutación actualmente disponibles para microalgas no modelos como *B. braunii*, porque se necesita poca o nada de la información genética y bioquímica del organismo de interés y se evitan las complicaciones regulatorias asociadas con el uso de organismos genéticamente modificados (OGMs) al aire libre, pues no requieren de la inserción de genes heterólogos o de vectores (Fu *et al.*, 2016; Lim & Schenk, 2017).

Existen diversos reportes sobre el mejoramiento inducido por mutagénesis química o con UV en microalgas, que permiten incrementar la tasa de crecimiento, la producción de lípidos para la generación de biodiésel o como suplemento alimenticio, así como los carotenoides (Tabla 3). Los estudios de mutación en microalgas marinas, principalmente *Nannochloropsis* sp., han conducido a la generación de cepas con mayor rendimiento en el crecimiento y/o producción de lípidos mediante mutagénesis por agentes químicos como MNNG, EMS y tratamiento combinado de EMS y luz UV-C (Anandarajah *et al.*, 2012; Beacham *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2016). También se ha reportado la obtención de cepas mutantes en microalgas de agua dulce, especialmente *Chlorella* sp., con mayor acumulación de lípidos, cambio en su perfil lipídico y crecimiento celular mediante mutagénesis química y física (Liu *et al.*, 2015; Sarayloo *et al.*, 2017). Sin embargo, existen muy escasos reportes de mejoramiento genético de microalgas verdes coloniales o formadoras de biopelícula por mutagénesis aleatoria. Por ejemplo, Nojima *et al.*, (2017) aislaron una cepa mutante colonial de *Chlorococcum* sp. con mayor productividad de biomasa y de lípidos que la cepa silvestre, y sin afectación en su capacidad para formar biopelícula y flotar. En el caso de *B. braunii*, solamente se ha reportado la generación de mutantes resistentes a herbicidas, metil viológeno y glufosinato de amonio, mediante mutagénesis de las colonias enteras de *B. braunii* de raza A y B, con EMS para controlar el crecimiento de algas competidoras en cultivos no axénicos. Sin embargo, las mutantes resistentes a herbicidas presentaron una tasa de crecimiento igual o

menor a las colonias silvestres crecidas en medio sin herbicida y se afectó la producción de lípidos en algunas cepas mutantes. (Ioki *et al.*, 2011; Nakahira-Yanaka *et al.*, 2013).

**Tabla 3.** Estudios de mutagénesis aleatoria para mejorar rendimiento en microalgas.

Especie	Mutágeno	Método de selección	Rendimiento de crecimiento (Mutante - WT)	Rendimiento de metabolito (Mutante - WT)	Referencia
<i>Botryococcus braunii</i> raza B (BOT22)	EMS	Resistencia a herbicidas (glufosinato de amonio o metil viológeno)	Disminución de 21-74% SGR	Disminución de 0-20 % TLC <sup>a</sup>	Nakahira-Yanaka <i>et al.</i> , (2013)
<i>Chlorococcum</i> sp. (FFG039)	EMS o NTG	Sobrevivencia de colonias con color verde pálido	Incremento de 62-170% DW <sup>b</sup>	Incremento de 190% TLC <sup>b</sup>	Nojima <i>et al.</i> , (2017)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	EMS	Sobrevivencia	Incremento de 13-27% DW <sup>c</sup>	Incremento de 12-22% TLC <sup>c</sup>	Anandarajah <i>et al.</i> , (2012)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	EMS	FACS	Incremento de 0.45-0.88% DW	Incremento de 150-200% TLC <sup>a</sup> Disminución de 45% EPA <sup>a</sup>	Doan & Obbard (2012)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	MNU	Resistencia a herbicida (quizalofop)	ND	Incremento de 17-20% TFA <sup>a</sup> y 5-18% EPA <sup>a</sup>	Chaturvedi <i>et al.</i> , (2004)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	EMS	Resistencia a antibióticos (cerulenina o eritromicina)	ND	Incremento de 14-22% TFA <sup>a</sup> , 12-29% EPA	Chaturvedi & Fujita (2006)
<i>Nannochloropsis salina</i> (CCAP849/3)	EMS y UV-C	Sobrevivencia	Disminución de 56-95% DW	Incremento de 156% FAME <sup>a</sup>	Beacham <i>et al.</i> , (2015)
<i>Chlorella</i> sp. (FACHB-1298)	UV-C	Sobrevivencia	Incremento de hasta 7.6% DW	Incremento de 28.1 % TLC <sup>a</sup>	Liu <i>et al.</i> , (2015)
<i>Tetraselmis suecica</i>	UV-C	FACS	0% DW	Incremento de 114-123% FS	Lim <i>et al.</i> , (2015)
<i>Scenedesmus</i> sp.	UV-C	Sobrevivencia	Incremento de 15% DW	Incremento de 30% TLC	Sivaramakrishnan & Incharoensakdi (2017)

ND (no hay información disponible); UV-C: ultravioleta de longitud de onda corta (280 a 100 nm); EMS: etil metanosulfonato; NTG: N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina; MNU: N-metil-N-nitrosourea; FACS: clasificación de células activadas por fluorescencia; TFA: ácido graso total; TLC: contenido total de lípidos; FS: señal de fluorescencia; FAME: ésteres metílicos de los ácidos grasos (biodiésel); TAG: triacilgliceroles; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; SGR: tasa específica de crecimiento ( $\mu$ -1); DW: peso seco.  
a: % DW; b: g DW/ (m<sup>2</sup> día); c: mg / (L día)

**Tabla 3.** Continuación.

Especie	Mutágeno	Método de selección	Rendimiento de crecimiento (Mutante - WT)	Rendimiento de metabolito (Mutante - WT)	Referencia
<i>Scenedesmus</i> sp.	UV-C	Sobrevivencia en aguas residuales ricos en etanol celulósico	Incremento de 260-424% DW	Incremento de 17 - 35 % TLC <sup>a</sup>	Zhang <i>et al.</i> , (2018)
<i>Schizochytrium</i> sp.	UV-C y NTG	Medio de selección con ácido malónico y yodoacético	0% DW	Incremento de 35% TFA <sup>a</sup> y 39% DHA <sup>a</sup>	Lian <i>et al.</i> , (2010)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	UV-C, EMS y NTG	Sobrevivencia	Disminución de 0-28 % DW	Incremento de 23–59% carotenoides totales <sup>a</sup>	Kamath <i>et al.</i> , (2008)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	UV-C	Sobrevivencia y medición de DO <sub>760nm</sub> y Rojo Nilo en microplacas	Incremento de 150-200% DW	Incremento de 0% TLC <sup>a</sup> 160-330% TAG <sup>a</sup>	Vigeolas <i>et al.</i> , (2012)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	MNU	Resistencia a herbicida (quizalofop)	0% DW	30–40% TLC <sup>a</sup> 160-270% TAG <sup>a</sup>	Chaturvedi <i>et al.</i> , (2004)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	NTG	Resistencia a inhibidores de la ruta carotenogénica (nicotina y norflurazon)	Incremento de 17-55 % DW	Incremento de 200% luteína <sup>a</sup>	Cordero <i>et al.</i> , (2011)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (NCIM 2738)	EMS	Termotolerantes (37-42 °C)	Disminución de 17-18 % DW	Incremento de 28.5-59.6% TLC <sup>a</sup>	Sachdeva <i>et al.</i> , (2016)
<i>Chlorella minutissima</i>	EMS	Sobrevivencia	Incremento de 11-60 % DW	Incremento de 150% TLC <sup>a</sup>	Mehtani <i>et al.</i> , (2017)
<i>Chlorella vulgaris</i>	UV-C o EMS	Sobrevivencia	Incremento de 0-9 % DW	Incremento de 40-45% TLC <sup>a</sup> 32-38% FAME <sup>a</sup>	Sarayloo <i>et al.</i> , (2017)
<i>Desmodesmus</i> sp. (S81 y G41)	EMS	Sobrevivencia	Incremento de 21 y 48 % DW, respectivamente	Incremento de 8-10 % TLC <sup>a</sup>	Zhang <i>et al.</i> , (2016)

ND (no hay información disponible); UV-C: ultravioleta de longitud de onda corta (280 a 100 nm); EMS: etil metanosulfonato; NTG: N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina; MNU: N-metil-N-nitrosourea; FACS: clasificación de células activadas por fluorescencia; TFA: ácido graso total; TLC: contenido total de lípidos; FS: señal de fluorescencia; FAME: ésteres metílicos de los ácidos grasos (biodiésel); TAG: triacilglicerol; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; SGR: tasa específica de crecimiento ( $\mu$ -1); DW: peso seco  
a: % DW; b: g DW/ (m<sup>2</sup> día); c: mg / (L día)

## 2.5 Selección de *B. braunii* tolerantes a salinidad

Como anteriormente se mencionó, la mayoría de los hidrocarburos producidos por *B. braunii* se almacenan en su MEC, lo cual es favorable para la extracción de hidrocarburos sin requerir romper las células. No obstante, la MEC contiene una ultraestructura conocida como pared de retención que impide la entrada de solventes no polares, generalmente el hexano, al interior de las colonias húmedas e intactas, y bloquea la extracción directa de hidrocarburos (Furuhashi *et al.*, 2016a). Para alcanzar una eficiente extracción de hidrocarburos, se aplica comúnmente un pretratamiento térmico, principalmente secado y/o calentamiento de la biomasa, o se aumenta el periodo de incubación de la biomasa en el solvente de extracción, lo cual afecta considerablemente la viabilidad celular. Diversos métodos han sido estudiados para la extracción de hidrocarburos de *B. braunii*. Por ejemplo, se ha utilizado el calentamiento de la biomasa húmeda a 80-90 °C antes de la extracción con hexano para reducir el costo energético del secado (Magota *et al.*, 2012; Saga *et al.*, 2015). Asimismo, se ha evaluado la extracción de hidrocarburos por CO<sub>2</sub> supercrítico (Yildiz-Ozturk *et al.*, 2017, 2018); por pretratamientos mecánicos (Tsutsumi *et al.*, 2018) o eléctricos (Guionet *et al.*, 2017); y por la aplicación de otros solventes orgánicos, tales como heptano, octano, tetradecano, éter dimetílico, octanol, entre otros (Jackson *et al.*, 2017).

Otra estrategia de extracción de hidrocarburos consiste en la inducción de estrés osmótico en *B. braunii* mediante el ajuste de la salinidad del medio de cultivo. Este método busca evitar el daño irreversible de esta microalga y sustituir procesos que consumen mucha energía, como el secado o calentamiento de biomasa, mediante la aplicación de agua marina artificial o NaCl, el cual es un compuesto barato y fácilmente disponible. Furuhashi *et al.*, (2013) reportaron que los hidrocarburos de *B. braunii* raza B fueron extraídos de manera más fácil y rápida cuando se cultivaron en medio Chu-13 suplementado con 8.8 g/L (150.6 mM) NaCl. Sin embargo, la tasa de crecimiento específico de esta alga se redujo a la mitad bajo estas condiciones de estrés osmótico. El mejoramiento en la extracción de hidrocarburos de *B. braunii* cultivado en medio salobre fue causado por la inhibición de la producción y densidad de las fibras de polisacáridos en la superficie de la colonia (Furuhashi *et al.*, 2016a). Asimismo, se encontró un aumento generalizado en los tamaños de las colonias de *B. braunii* cultivadas en medios con concentraciones equivalentes a 30-70 mM NaCl, lo cual ofrece una gran ventaja para recolectar la biomasa por filtración (Furuhashi *et al.*, 2016b).

A pesar del mejoramiento en la extracción de hidrocarburos de *B. braunii* bajo condiciones de estrés salino, la inhibición en su tasa de crecimiento desde concentraciones relativamente bajas ( $\geq 50$  mM NaCl) es todavía un problema porque aumenta el riesgo de contaminación por otros microorganismos en sistemas de estanques abiertos e imposibilita el uso de agua de mar en la formulación del medio para reducir el consumo de agua dulce (Furuhashi *et al.*, 2013; 2016a). Adicionalmente, *B. braunii* raza B (cepa Showa) presenta menor tolerancia a la salinidad que otras cepas de *B. braunii*, aunque esta cepa Showa se caracteriza por su elevado contenido de hidrocarburos (Yoshimura *et al.*, 2013). Por consiguiente, en el presente trabajo se buscó mejorar genéticamente *B. braunii* raza B (cepa Showa) mediante mutagénesis aleatoria, ya sea por etil metanosulfonato (EMS) o luz UV-C, y posteriormente aislar cepas que mantengan o reduzcan su tiempo de duplicación bajo estrés salino ( $\geq 50$  mM NaCl), con la finalidad de explotar esta alga para la producción de biocombustible a gran escala.

### 3. HIPÓTESIS

- La generación de líneas mutantes de *B. braunii* raza B tolerantes a salinidad por mutagénesis aleatoria, permitirá el aislamiento de cepas con tasas de crecimiento similares a la cepa parental bajo condiciones de estrés salino.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 General

- Generar y aislar mutantes halotolerantes y de rápido crecimiento de la microalga *Botryococcus braunii* inducidas por mutagénesis aleatoria.

#### 4.2 Específicos

- Determinar las condiciones óptimas para la inducción de mutagénesis por UV y EMS en el cultivo parental.
- Aislar cepas mutantes que forman rápidamente colonias o grumos en cultivo de membrana.
- Evaluar y comparar parámetros cinéticos entre cepas mutantes de *B. braunii* de rápido crecimiento con respecto a la silvestre.
- Evaluar y comparar la producción de metabolitos: hidrocarburos, carotenoides y EPS en cepas mutantes de *B. braunii* con respecto a la silvestre.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cultivo de algas

Cultivos de *B. braunii* raza B (cepa Showa), fueron crecidos en biorreactores caseros (Pyrex® 1395-500) tipo Batch de 100, 250 y 500 mL bajo condiciones fotosintéticas de laboratorio y con un volumen de aforo de 400 mL empleando medio Chu-13.

#### Composición del medio Chu-13

Para preparar 1 L:

Reactivos	1X	2X	5X
KNO <sub>3</sub>	0.4 g	0.8 g	2 g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.1 g	0.2 g	0.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.052 g	0.104 g	0.26 g
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.054 g	0.108 g	0.27 g
Fe Na EDTA	0.01 g	0.02 g	0.05 g
Elementos traza	5 ml	10 ml	25 ml

- Disolver en 500 mL de agua desionizada
- Adicionar solución de “elementos traza”

Elementos traza	1L
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	572 mg
MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	308 mg
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	44 mg
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	16 mg
NaMoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	12 mg
CoSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	18 mg

- Medir el pH y verificar si se encuentra en un rango de 7.2-7.5, ajustar con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido.
- No ajustar con NaOH, si el pH está debajo de 7.0, se debe rehacer nuevamente el medio.
- Aforar a 1 L con agua desionizada dentro de un frasco de 1.5 L y esterilizar en autoclave por 20 minutos a 1 atm y 121 °C.
- En caso de hacer medio sólido, agregar 9 g/L de agar para planta y posteriormente esterilizar

Colonias de *B. braunii* raza B fueron cultivadas a 25 °C, bajo una iluminación fluorescente de color blanca fría a 50  $\mu\text{moles}$  de fotones  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (PAR) con lámparas de 59 W (Philip F96T8 59W/850 Single Pin ALTO Plus) y con un fotoperiodo 12 h luz:12 h oscuridad. Se adicionó aire ambiental esterilizado por filtración mediante filtro de venteo con tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  (Millex®-FG Millipore SLFG05010) a 1 VVM.

Las colonias de *B. braunii* fueron inoculadas bajo una concentración 10% v/v en medio Chu-13 durante 2 semanas hasta obtener colonias verdes productoras en fase de crecimiento. Posteriormente, estas algas fueron filtradas y lavadas con medio fresco para la inducción por mutagénesis o subcultivo en medio fresco para mantener el cultivo viable.

Aparte de cultivar en medio Chu-13 como medio de agua dulce, se inducirá estrés osmótico por alta salinidad como método de selección sobre la microalga. Para ello, cultivos de microalgas mutantes y silvestre fueron cultivados bajo diferentes concentraciones de salinidad en el medio de cultivo: Chu-13 + NaCl (25, 50, 75 y 100 mM).

### **5.1.1 Cultivo de *B. braunii* sobre membrana de nylon**

- Antes de filtrar la biomasa, esterilizar las membranas de nylon con etanol al 70% dentro de un vaso de precipitados. Evitar la esterilización por autoclave porque puede causar la pérdida de uniformidad en el tamaño del poro.
- Filtrar colonias de *B. braunii* raza B con dos semanas de edad a través de una red de nylon (Millipore, tamaño de poro: 10  $\mu\text{m}$ ) de 90 mm de diámetro, empleando el sistema de filtración para matraces Millipore de 47 mm (Millipore ® 2025XX1004700) bajo condiciones estériles.
- Lavar tres veces la biopelícula de microalgas en la membrana con 10 mL de medio Chu 13 con la finalidad de evitar que el filtrado de las colonias no se seque para no afectar negativamente su estado.
- Colocar la membrana que contiene las células de *B. braunii* sobre medio sólido Chu-13, previamente preparado en cajas Petri de 60 mm de diámetro.

- Incubar los cultivos sobre membrana a una temperatura de 25 °C bajo luz blanca fría fluorescente a 50  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (PAR) y con un fotoperiodo de luz continua durante el tiempo necesario hasta observar formación de colonias verdes.

## 5.2 Liberación de células individuales de *B. braunii*

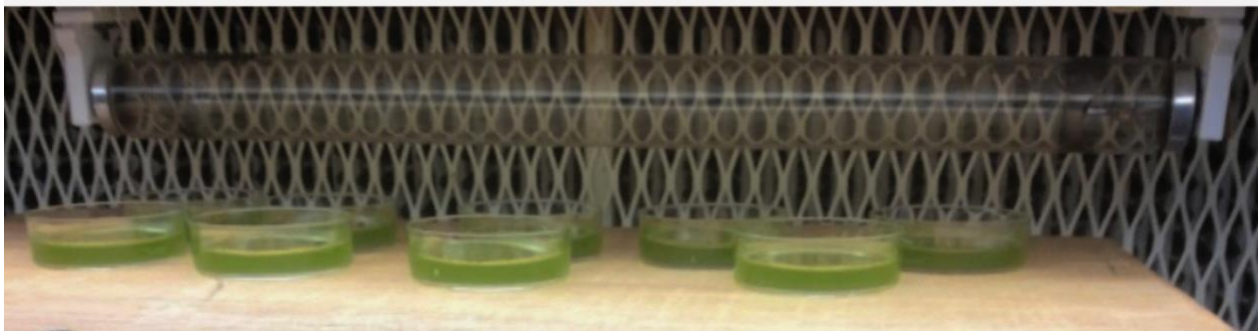
Se utilizó el método reportado por Hou *et al.*, (2014) para recuperar células *B. braunii* liberadas de la MEC.

- Filtrar al vacío 40 mL de las colonias de fase exponencial, cultivadas previamente por 2 semanas, a través de una malla de nylon de 10  $\mu\text{m}$ .
- Suspender las colonias retenidas en 10 mL del medio Chu-13 suplementando con glicerol 25% v/v (~3.43 M) durante 15 min. Se espera la liberación de aproximadamente el 30-50% de las células en las colonias de *B. braunii* raza B (Showa) al finalizar el periodo de incubación.
- Filtrar nuevamente al vacío la biomasa tratada con glicerol, a través de una malla de nylon de 10  $\mu\text{m}$  para lograr separar las células individuales de las colonias.
- Recuperar el filtrado que contiene las células individuales y precipitarlas por centrifugación (1.000 g durante 5 minutos) para descartar el sobrenadante con glicerol
- Suspender el sedimento celular en 10 mL de medio fresco Chu-13 y volver a centrifugar para eliminar los reactivos químicos residuales.
- Suspender nuevamente las células individuales de *B. braunii* precipitadas en un volumen apropiado de medio para probar su viabilidad (5-10 mL), y filtrar las células individuales liberadas a través de un filtro de membrana de nylon (tamaño de poro: 0.45  $\mu\text{m}$ ).
- Lavar tres veces las células individuales en la membrana con 10 mL de medio Chu 13 y colocarlas en la superficie de medio Chu-13 sólido, bajo las mismas condiciones descritas arriba.

### 5.3 Inducción de mutagénesis en microalgas

#### 5.3.1 Mutagénesis de *B. braunii* por UV-C

- Recolectar el cultivo de *B. braunii* raza B de dos semanas de edad (fase logarítmica) mediante filtración usando redes de nylon (Millipore NY1009000, tamaño de poro: 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) de 90 mm de diámetro.
- Lavar la biomasa con medio fresco y resuspenderla en 400 mL de medio Chu-13 fresco y cultivar en incubadora con fotoperiodo por 48-72 h. Dejar reposar por 24 h para permitir flotar la biomasa productora de hidrocarburos.
- Transferir la biomasa flotante a un tubo de centrifuga de 50 mL y ajustar la concentración del inóculo con medio fresco hasta una  $\text{DO}_{680\text{ nm}} = 0.5-0.6$ .
- Inocular y distribuir uniformemente 7 mL del cultivo de *B. braunii* raza B, sobre la base de cajas Petri estériles con 6 cm de diámetro.
- Exponer las colonias de *B. braunii* sin tapa, a la radiación de una lámpara UV-C de 254 nm (15 W, Tecnolite G15T8) durante 0, 2, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 min. La lámpara UV-C estaba fijada a 3 cm arriba de la muestra y dentro de una campana de flujo laminar (Fig. 5).



**Figura 5. Inducción de mutagénesis con UV-C.** Se utilizó una lámpara de UV-C de 254 nm a 3 cm, en cultivos de *B. braunii* raza B en fase logarítmica.

- Después de la irradiación, transferir todas las muestras a tubos de centrifuga esterilizados de 50 mL.
- Incubar en oscuridad total durante 7 días para evitar la reparación del DNA por fotorreactivación y realizar agitación manual dos veces por día.

- Cultivar las colonias mutagenizadas por UV-C en un biorreactor casero con 50 mL de medio de Chu-13 o en membrana de nylon con medio Chu-13 sólido, se incubaron durante 2-3 semanas.

### 5.3.2 Mutagénesis de *B. braunii* por EMS

- Recolectar 10 mL de *B. braunii* raza B ( $DO_{680\text{ nm}} = 0.7$ ), cuyas colonias verdes estén activas y flotando en la superficie del medio de cultivo.
- Transferir la biomasa flotante a un tubo de centrifuga de 50 mL y ajustar la concentración del inóculo con medio fresco hasta una  $DO_{680\text{ nm}}$  de 0.6-0.7.
- Suspender 2 mL del inóculo en 6 mL de medio Chu-13 suplementado con 0% (control), 0.5%, 1% y 2% de EMS (Sigma Aldrich), para inducir mutagénesis. Incubar durante 4 h a temperatura ambiente y con agitación leve. **Nota:** cubrir los tubos de centrifuga con papel aluminio.
- Añadir 4 mL de tiosulfato sódico ( $Na_2S_2O_3$ ) al 10% (p/v) y dejar incubando por 10-15 min para inactivar el EMS.
- Filtrar las colonias mutagenizadas en malla de nylon de 10  $\mu\text{m}$  y lavar con medio Chu-13 fresco.
- Incubar en oscuridad total durante 6 días, realizando agitaciones manuales dos veces por día.
- Transferir la biomasa a un tubo de centrifuga con 10 mL de medio Chu-13 e incubar en oscuridad por 6 días, agitando manualmente 2 veces por día.
- Inocular colonias en biorreactores “caseros” con 50 mL medio Chu-13 durante 2 semanas para recuperación de la biomasa.

### 5.3.3 Inducción de mutagénesis en microalgas sin cultivo en membrana

Para la mutagénesis por UV-C se realizó la metodología descrita arriba, pero con breves modificaciones. Los tiempos de exposición fueron de 0, 1, 3, 5 y 10 min, y la lámpara UV-C estaba fijada a 5 cm arriba de la muestra. Una vez incubada en oscuridad total, se cultivó directamente en un biorreactor casero con 50 mL de medio de Chu-13 bajo condiciones de estrés salino ( $\geq 50\text{ mM NaCl}$ ) durante 2-3 semanas.

Para la mutagénesis por EMS se realizó la metodología descrita arriba, pero con breves modificaciones. Los tratamientos con EMS fueron de 0% (control), 1% y 2% para inducir mutagénesis durante 4 y 6 h a temperatura ambiente, y con agitación leve. Una vez incubado en oscuridad total, se cultivó directamente en un biorreactor casero con 50 mL de medio de Chu-13 bajo condiciones de estrés salino ( $\geq 50$  mM NaCl) durante 2-3 semanas.

## **5.4 Determinación del crecimiento microalgal**

El crecimiento de microalgas puede ser monitoreado mediante la medición de distintos parámetros, tales como la concentración celular, peso seco, densidad óptica y contenido de clorofila. Diversos factores influyen en la selección de los parámetros a analizar, ya sea la especie de microalga cultivada, las condiciones de cultivo, el metabolito de interés que se desea investigar, entre otros aspectos.

### **5.4.1 Densidad óptica**

La densidad óptica (DO) de los cultivos de *B. braunii* se determinó mediante espectrofotometría (turbidimetría) a través de la medición de la absorbancia a 680 nm, porque el tamaño de las colonias puede causar una variación a lo largo de su desarrollo. La DO es, dentro de ciertos límites, proporcional a la biomasa del cultivo.

### **5.4.2 Peso seco**

La cuantificación del peso seco es un parámetro que permite monitorear el crecimiento microalgal, definido exclusivamente como el aumento del contenido de biomasa. Los datos recopilados para evaluar este parámetro no representan necesariamente el grado de proliferación celular en el cultivo estudiado. El contenido de peso seco se determinó gravimétricamente de la siguiente manera:

1. Tomar muestras de 10 mL de cultivo (2-3 mL de muestra por replica técnica) de acuerdo a la concentración celular del cultivo.

2. Utilizar filtros de nylon (tamaño de poro: 10  $\mu\text{m}$ ) cuyo peso constante haya sido previamente determinado. Para ello, los filtros son mantenidos a 80  $^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 h, posteriormente son enfriados en un desecador y pesados.
3. Filtrar al vacío la muestra de cultivo en las membranas a peso constante y desechar el sobrenadante. Secar el material filtrado junto con el filtro a 80  $^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 h. Posteriormente, enfriar en un desecador y determinar el peso del filtro con la muestra.
4. Determinar la concentración de peso seco en el cultivo de acuerdo con la siguiente ecuación, donde DW es la concentración de peso seco en g de peso seco/L.

$$DW \left( \frac{\text{g}_{\text{Peso seco}}}{\text{L}} \right) = \frac{(W_{\text{Filtro+muestra}} - W_{\text{Filtro}})}{V_{\text{Muestra}}}$$

### 5.4.3 Evaluación de parámetros cinéticos

La tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ), definida como el aumento en la concentración de células por unidad de tiempo, se calculó como la pendiente máxima de la gráfica de  $\ln DO$  o  $\ln DW$  frente al tiempo de cultivo mediante la siguiente ecuación:

$$\mu \text{ (día}^{-1}\text{)} = \frac{\ln \left( \frac{X_n}{X_0} \right)}{(t_n - t_0)}$$

donde,  $\mu$  es la tasa de crecimiento específica ( $\text{día}^{-1}$ ),  $X_n$  es la concentración de biomasa en (g/L) a tiempo  $t_n$  (días), y  $X_0$  es la biomasa inicial en (g/L) en el tiempo  $t_0$  (días).

El tiempo de duplicación (días) bajo diferentes condiciones experimentales se calculó en función de la tasa de crecimiento específica usando la siguiente fórmula:

$$t_d \text{ (día)} = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

La productividad de la biomasa (P), que también se refiere a la tasa de generación de biomasa, se calculó usando la siguiente ecuación:

$$P \left( \frac{\text{g}_{\text{Peso seco}}}{\text{L} \cdot \text{día}} \right) = \frac{(X_n - X_0)}{(t_n - t_0)}$$

donde,  $X_n$  es la concentración de biomasa en (g/L) en el tiempo  $t_n$ , y  $X_0$  es la concentración inicial de biomasa en (g/L) en el tiempo inicial,  $t_0$  (Razzak *et al.*, 2015).

## 5.5 Cuantificación de metabolitos

### 5.5.1 Cuantificación de hidrocarburos en cultivos de *B. braunii*

Para el proceso de extracción y purificación de los hidrocarburos almacenados en la MEC, a partir de la biomasa seca se realizó el siguiente procedimiento:

- Filtrar 50 mL de biomasa de *B. braunii* colectada por filtración en una red de nylon Millipore previamente pesada (Filtros de red de nylon Millipore, tamaño de poro: 10  $\mu$ m).
  - Guardar el filtrado para la medición de exopolisacáridos liberados en el medio.
- Secar los filtros que contienen la biomasa durante 24 horas a 65 °C en una estufa (Lab-Line), la cantidad de biomasa se calculó por diferencia de peso mediante una balanza (Ohaus) y expresó en gramos de peso seco (g DW).
- Colocar la red de nylon, que contiene la biomasa, en un vaso de precipitado (100 mL) con 50 mL de hexano como solvente.
- Incubar a temperatura ambiente en agitación magnética intensa durante 1 hora, y posteriormente colectar el sobrenadante.
- Repetir el procedimiento de extracción de hexano e incubación dos veces más, o hasta que el líquido no tenga color.
- Combinar los extractos y concentrarlos por evaporación mediante un rotavapor hasta secarlo completamente. Resuspender con la mínima cantidad de hexano.
- Colocar en un vial de 2 mL previamente pesado, la muestra resultante conformada por un líquido de intenso color naranja. Evaporar totalmente el hexano con gas nitrógeno.
- Determinar la cantidad de hidrocarburos (g DW) por gravimetría y determinar el porcentaje de hidrocarburos con base al peso seco de la muestra (g HC/ g biomasa).

Para fines comparativos se determinó el porcentaje de hidrocarburos en base al peso seco de la muestra (biomasa).



### 5.5.2 Extracción y estimación de exopolisacáridos

La cantidad de exopolisacáridos (EPS) liberados de la MEC de *B. braunii*, expresado como carbohidratos totales, fue medido mediante el método fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). El principio básico de este método de Dubois se basa en la deshidratación de carbohidratos por el ácido sulfúrico concentrado y la formación de derivados de furfural, que posteriormente producen un complejo detectable de color amarillo-anaranjado en presencia de fenol. El procedimiento estándar de este método es el siguiente:

- Filtrar al vacío 50 mL de cultivo de *B. braunii* usando una membrana de nylon 10  $\mu\text{m}$  y lavar la biomasa obtenida con medio Chu-13 estéril.
- Recuperar filtrado para medir la cantidad de EPS liberados.
- Tomar 0.5 mL de muestra y adicionar 3 ml de HCl 2N dentro de tubo de ensayo de 15 mL.
- Incubar durante 1 hora a 100 °C.
- Tomar 200  $\mu\text{L}$  de la muestra sometida al pretratamiento de hidrolisis ácida y mezclar con 200  $\mu\text{L}$  de fenol al 5% (w/v) en agitación con vórtex
- Añadir rápidamente a la mezcla pero con cuidado, 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado al 96% (v/v).
- Agitar en vórtex durante 30 s y colocar durante 20 minutos en un baño de agua a temperatura ambiente para el desarrollo del color.
- Después de enfriarse, medir la absorbancia de luz a 490 nm en un espectrofotómetro.
- La curva patrón fue construida usando D-glucosa (0-200  $\mu\text{g/mL}$ ) como estándar para cuantificar el contenido de EPS para cada muestra. Siempre correr tres puntos de curva de calibración.

### 5.5.3 Procedimiento para la extracción y cuantificación de clorofila y carotenoides

- Una vez removidos los hidrocarburos almacenados en la MEC, como se describió anteriormente, adicionar 20 mL de metanol (99.9% v/v) e incubar en oscuridad durante 30 min con agitación leve.
- Recolectar el sobrenadante y medir la absorbancia a las longitudes de onda siguientes: 652, 665 y 750 nm. Utilizar metanol como blanco.
- Calcular la concentración de clorofila con las ecuaciones siguientes.

$$Chla(\mu g/mL) = (-8.0962 * A_{652}) + (16.5169 * A_{665}) - A_{750}$$

$$Chlb(\mu g/mL) = (27.4405 * A_{652}) + (12.1688 * A_{665}) - A_{750}$$

$$Chl_{Total}(\mu g/mL) = Chla + Chlb$$

Cabe mencionar que el valor de concentración obtenido mediante estas ecuaciones, corresponde al de las muestras después de haber sido sometidas a distintos procedimientos de dilución o concentración, dependiendo del volumen original de la muestra. De este modo, para determinar la concentración real de cualquier tipo de clorofila ( $Chly_{Cultivo}$ , donde y es: clorofila a, b o total) en un cultivo microalgal, es necesario considerar los factores de dilución y concentración aplicados durante la manipulación de la muestra. Por tanto, utilizando los datos derivados de las ecuaciones anteriores, es posible calcular la concentración real de clorofila acorde con la ecuación siguiente:

$$Chly_{Cultivo}(\mu g/mL) = \frac{Chly(\mu g/mL) * V_{solv}(mL)}{V_{Muestra}(mL)}$$

El contenido de carotenoides también puede ser calculado en estas muestras (Lichtenthaler 1987), leyendo a las longitudes de onda siguientes: 663, 647 y 470 nm; y convirtiendo las absorbancias a unidades de carotenoides a partir de las siguientes ecuaciones:

$$Chla(\mu g/mL) = (12.25 * A_{663}) - (2.79 * A_{647})$$

$$Chlb(\mu g/mL) = (21.50 * A_{647}) - (5.10 * A_{663})$$

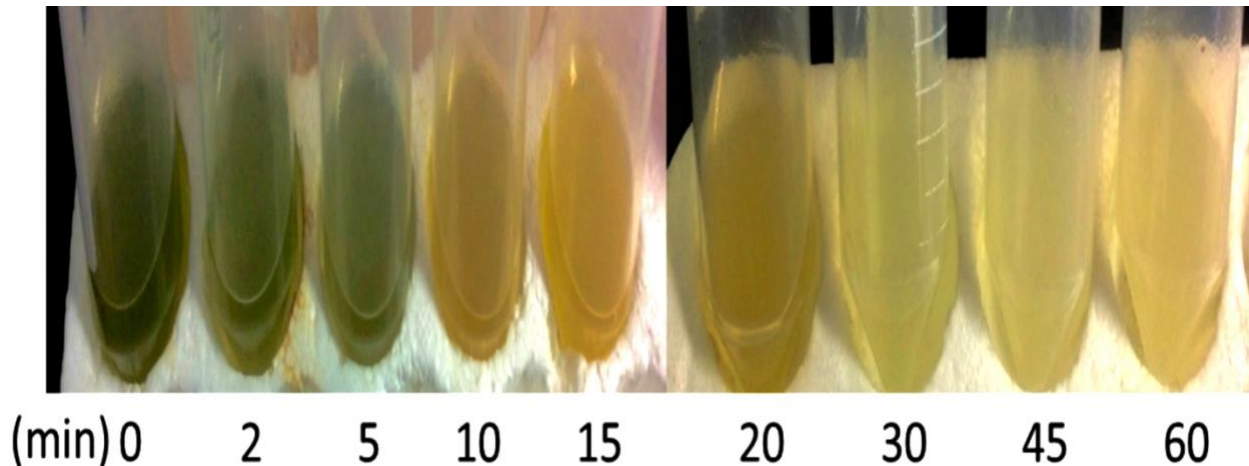
$$Carotenoides\ totales(mg/g\ PF) = \frac{(1000 * A_{470}) - (1.82 * Chla) - (85.02 * Chlb)}{198}$$

En donde las unidades son obtenidas en mg/g de biomasa fresca.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Transferencia de grumos de mutantes de raza B inducidos por UV-C y EMS, a biorreactores caseros

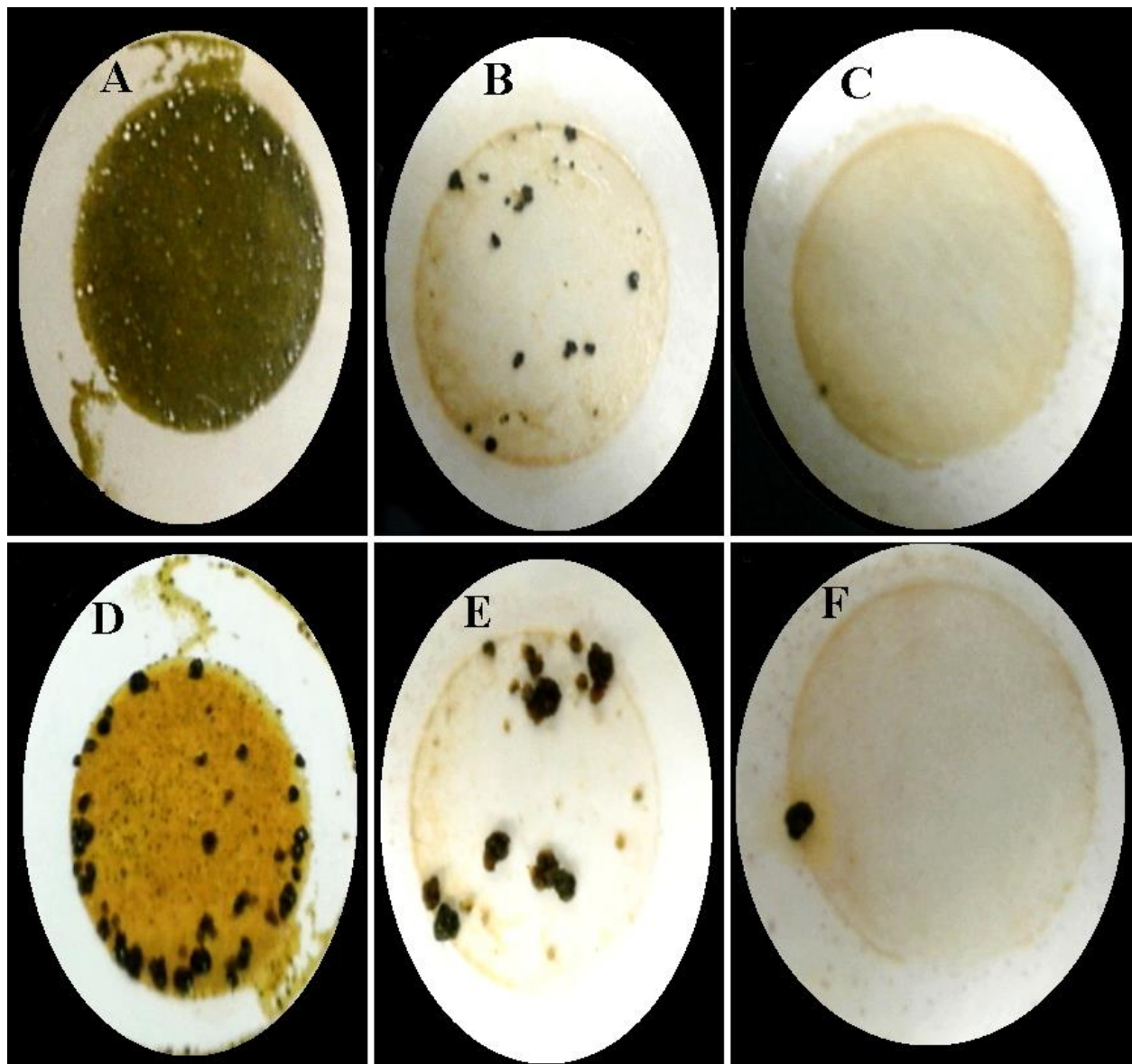
Después de la mutagénesis con UV-C, el color de *B. braunii* raza B. cambió de verde a blanco al final del experimento. Adicionalmente, se observó un cambio de coloración anaranjado, sugiriendo la producción de carotenoides inducida por estrés durante una exposición de 10 a 20 min. Este cambio de color causado por la pérdida de clorofila indicó que tasa de supervivencia de las células de *B. braunii* después del tratamiento se correlacionó negativamente con el tiempo de exposición a las lámparas de UV-C. (Fig. 6).



**Figura 6. Cambio de color de *B. braunii* raza B.** Las células expuestas a diferentes tiempos de luz UV-C (15 W y 3 cm de distancia).

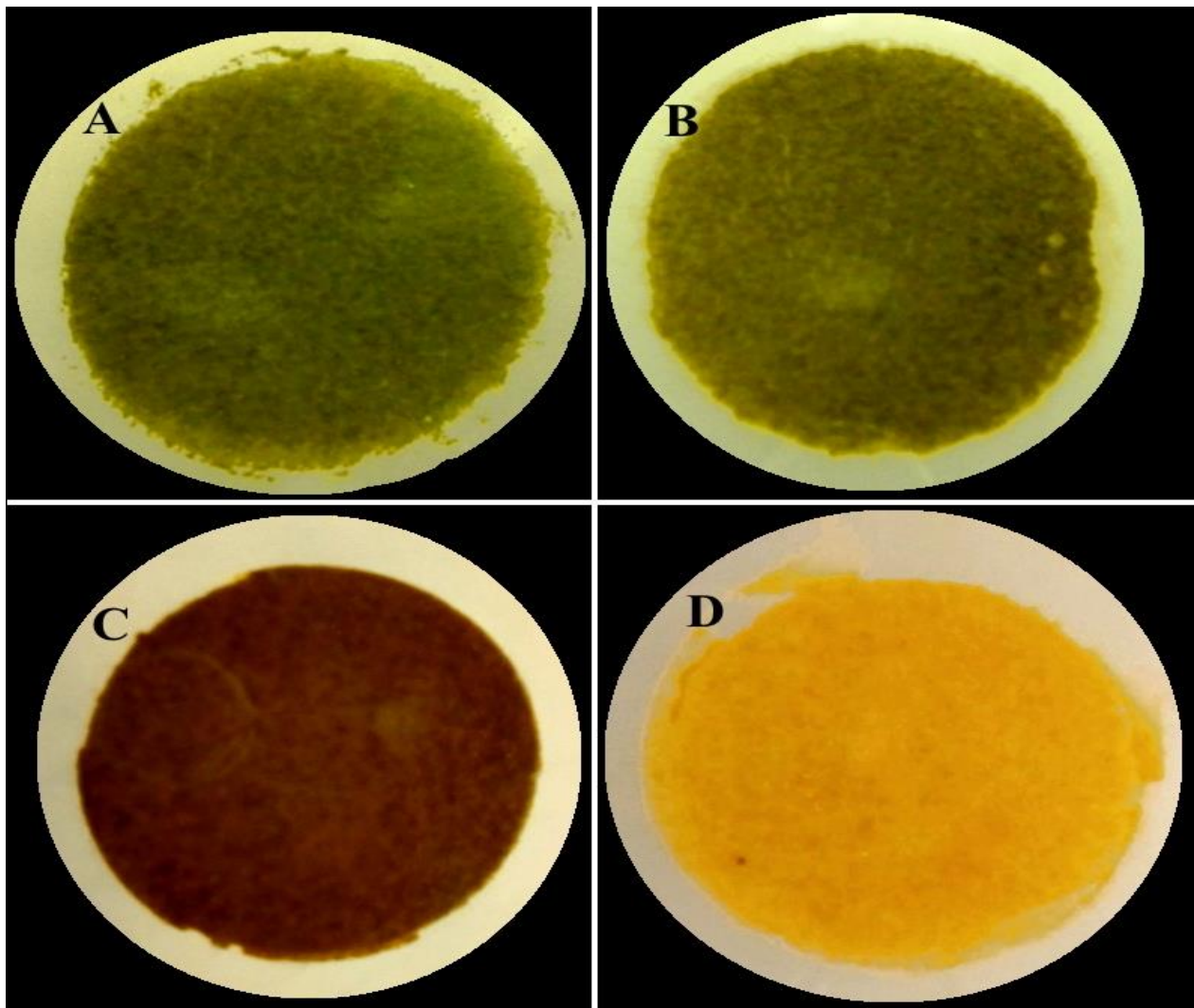
Aunque el cultivo autotrófico en medios sólidos de tubo es suficiente para el crecimiento y almacenamiento de colonias de *B. braunii*, sin la suplementación de CO<sub>2</sub> como fuente de carbono o de humedad para evitar su desecación, es prácticamente inviable la experimentación de *B. braunii* bajo distintos tratamientos en medios sólidos debido a su característico lento crecimiento. Por lo tanto, se evaluó el cultivo en membrana de nylon como una forma alternativa para el cultivo y cosecha de *B. braunii* que permitiera satisfacer esta necesidad.

Las colonias de *B. braunii* raza B que resultaron del proceso de mutagénesis por UV-C, se incubaron en membrana de nylon sobre medio sólido Chu-13 bajo luz continua para verificar la formación de colonias viables de microalgas. Los cultivos tratados a 30 y 60 min bajo exposición de luz UV-C, fueron evaluados después de dos y siete semanas de incubación para determinar la viabilidad de formación de colonias (Fig. 7). Después de dos semanas de cultivo, en el grupo control solamente se observaron colonias muertas sobre el cultivo originalmente inoculado que mantiene un color verde (Fig. 7A). No obstante, se observó que el cultivo control originalmente inoculado se tornó a una coloración naranja a medida que transcurría el periodo de incubación y se mantuvo después de 7 semanas de incubación en el grupo control, se encontró la formación de colonias de *B. braunii* que desplazaron las colonias muertas (Fig. 7D). Por otro lado, se empezaron a desarrollar azarosamente colonias en forma de gránulos celulares después de dos semanas de incubación. Estas colonias granulares presentaron una textura aceitosa y un color verde brillante por encima de las células inoculadas inicialmente sobre la membrana (Fig. 7B y C). Después de siete semanas de cultivo, las colonias granulares tratadas con UV-C presentaron un aumento de biomasa y de tamaño, pero no presentaron un mayor número de colonias ni proliferación sobre el resto de la superficie de la membrana desocupada (Fig. 7E y F). Además, algunas colonias granulares inducidas por 30 min a UV-C, presentaron un color anaranjado indicando la biosíntesis de carotenoides por posible deficiencia de nutrientes o estrés abiótico (Fig. 7E).



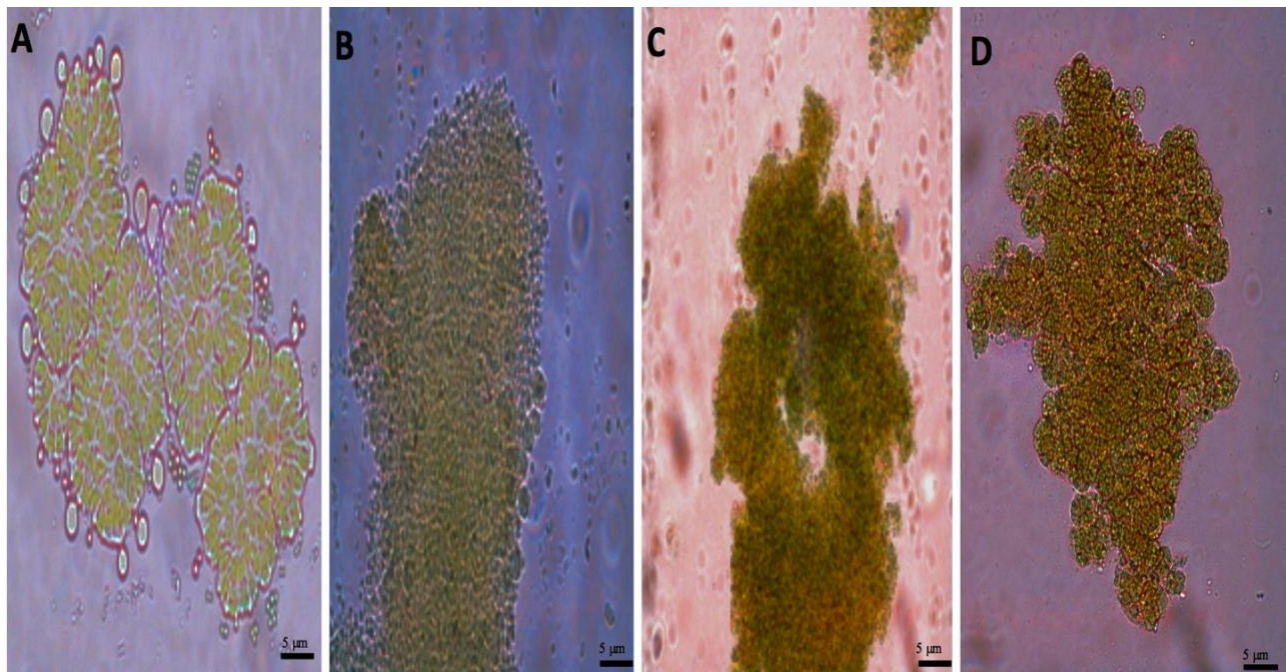
**Figura 7.** Desarrollo de mutantes por UV-C de *B. braunii* raza B cultivada sobre membrana por dos (A, B y C) y siete semanas (D, E y F). Vista superior de (A y D) cultivo control sin exposición a UV-C, (B y E) cultivo expuesto a 30 min y (C y F) cultivo expuesto a 60 min, de radiación UV-C (254 nm, 15 W) a 3 cm de distancia.

En el caso de la mutagénesis por EMS, las células de *B. braunii* fueron tratadas bajo distintas concentraciones de EMS durante un tiempo fijo de 4 h y posteriormente cultivados sobre membranas (Fig. 8). Después de una semana de incubación, el grupo control y el tratamiento de 0.5% EMS presentaron la misma tonalidad de color verde (Fig. 8A y B). Mientras, los cultivos tratados con 1% y 2% de EMS mostraron un cambio de coloración a marrón y amarillo, respectivamente (Fig. 8C y D), indicando que las células fueron estresadas desde una concentración de 1% EMS durante 4 h. Sin embargo, no se presentó formación de colonias granulares en los tratamientos de 1% y 2% EMS después de 7 semanas, por lo cual los esfuerzos se enfocaron en analizar con mayor detalle las colonias formadas en los tratamientos de UV-C.



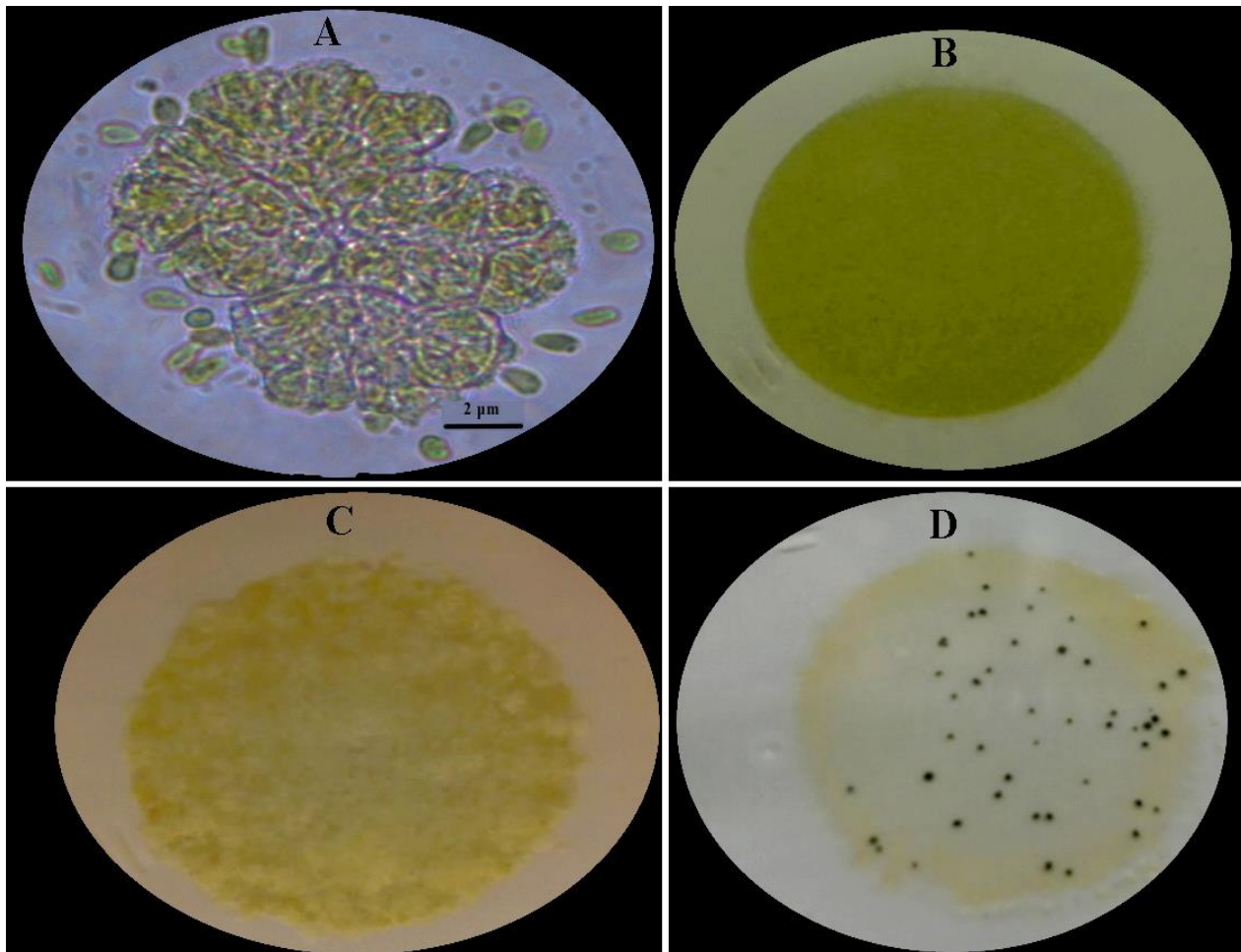
**Figura 8. Desarrollo de mutantes de *B. braunii* raza B por EMS y cultivada sobre membrana por una semana. Vista superior de A) cultivo control, B) cultivo expuesto a 0.5%, C) 1% y D) 2% de EMS durante 4 horas e incubados por una semana en medio líquido Chu-13 fresco, antes de cultivar sobre membrana.**

Las colonias granulares de *B. braunii* raza B inducidas por UV-C, fueron transferidas a 40 mL y posteriormente a 150 mL de medio líquido Chu-13 en un biorreactor “casero” con un periodo de incubación de 10 días y luz continua. Se observó un cambio en la morfología de las colonias tanto en las mutantes UV-C como en el control (Fig. 9), posiblemente por las condiciones de estrés hídrico y falta de difusión de nutrientes a las que estuvieron sometidas durante su cultivo en membrana. Aunque se observó la agregación de células, no se encontró producción ni secreción de hidrocarburos extracelulares, tampoco presentaban una morfología celular similar a las células silvestres de *B. braunii*.



**Figura 9. Observación microscópica de colonias de *B. braunii* raza B (Showa) crecida en medio líquido Chu-13. A) Colonias silvestres (control), y colonias crecidas en membrana de nylon, que previamente fueron expuestas a luz UV-C (254 nm) durante B) 0 min, C) 30 min y D) 60 min. Escala de barra, 5 µm.**

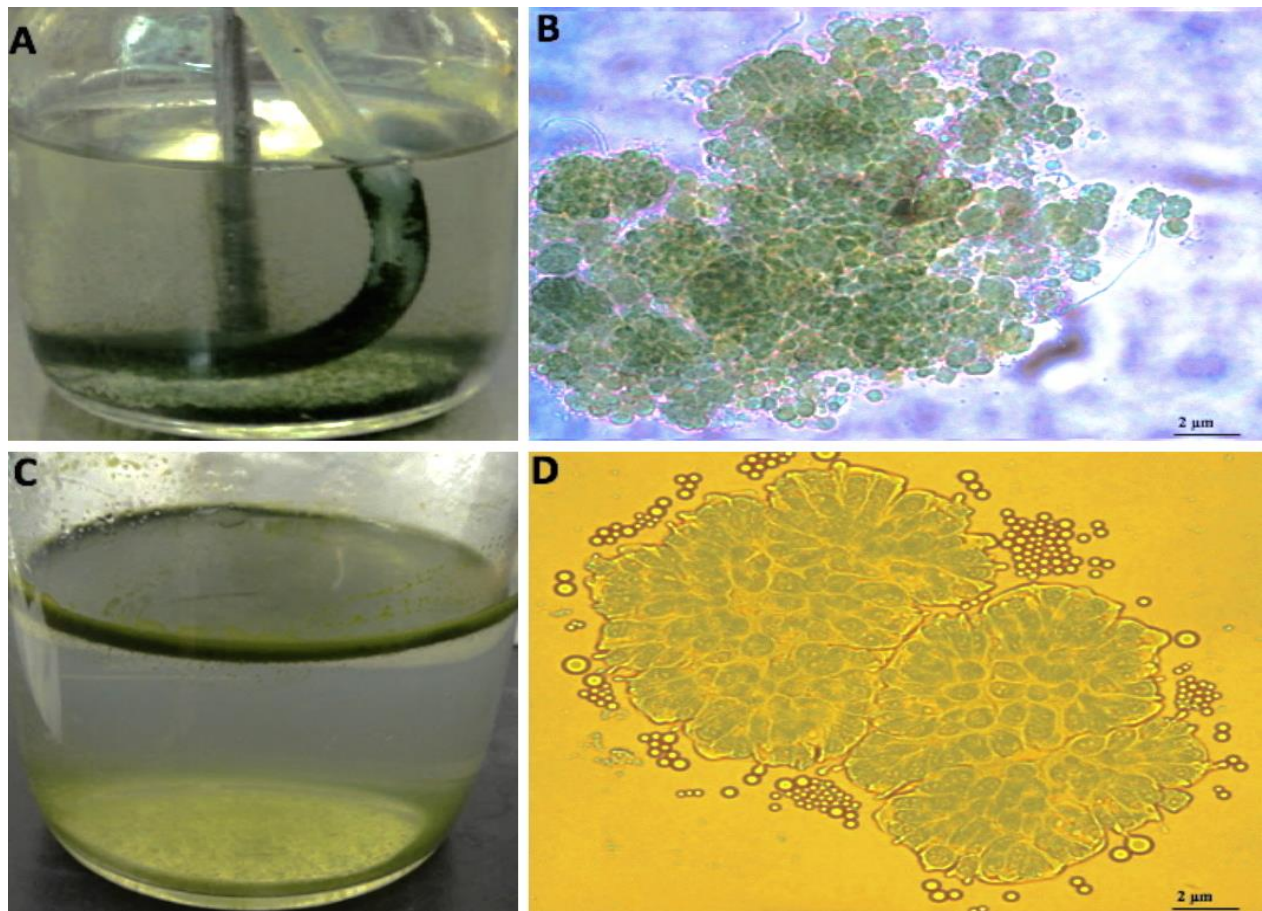
Para descartar el papel de algún metabolito o polisacárido de la MEC que posiblemente participe en la aglutinación de las células de *B. braunii*, se recuperaron células individuales de *B. braunii*, que estaban unidas en la MEC mediante tratamiento de glicerol al 25 % (v/v), y posteriormente fueron cultivadas en membrana de nylon (Fig. 10A y B). Las colonias inoculadas presentaron una rápida degradación de clorofila (Fig. 10C). No obstante, presentaron formación de colonias granulares verdes después de 21 días en incubación, aunque la biomasa retenida estaba conformada de debris celular (Fig. 10D).



**Figura 10. Cultivo de células individuales aisladas de *B. braunii* raza B (silvestre) mediante tratamiento con glicerol al 25%. A) Células de *B. braunii* liberadas de su MEC. Cultivo de células individuales de *B. braunii* raza B crecidas en membrana de nylon (0,45 mm) a B) 0 días de incubación (ddi); C) 4 ddi y D) 21 ddi. Escala de barra, 2 µm.**



Después de cultivar las colonias granulares en medio Chu-13 líquido, se observó que estas colonias presentaron una morfología distinta a las encontradas tanto en las colonias mutantes por UV-C como en la silvestre sin previo cultivo en membrana (Fig. 11B y D). Aunque se observó la agregación de células, no se encontró producción de hidrocarburos extracelulares, también las microalgas presentaban una forma predominantemente circular en vez de piriforme. Asimismo, la biomasa mostró un color verde brillante que estuvo adherido a los materiales o estaba sedimentado (Fig. 11A), mientras que la silvestre es capaz de flotar debido a la alta acumulación de hidrocarburos (Fig. 11C). Por consiguiente, se descartó continuar utilizando el cultivo de membrana debido a es difícil disgregar las colonias granulares, posiblemente por biofloculación de microalgas, y la posible prevalencia de otros microorganismos competidores como microalgas verdes y hongos.



**Figura 11. Cultivo de colonias granulares en medio Chu-13 líquido.** A) Cultivo de dos semanas de gránulos de *B. braunii* raza B formados en la membrana en biorreactor casero y B) observación microscópica (40X) de colonias granulares. C) Cultivo control de colonias de *B. braunii* raza B en biorreactor casero y D) observación microscópica (40X) de colonias productoras de hidrocarburos. Escala de barra, 2 µm.

## 6.2 Crecimiento y metabolitos producidos por mutantes de *B. braunii* en medios con diferentes salinidades

Para conocer el efecto de la salinidad del medio en el crecimiento de *B. braunii* raza B bajo nuestras condiciones de laboratorio, se realizó una cinética de crecimiento que mostró inhibición en el crecimiento de *B. braunii* a medida que aumentaba la concentración de sal en el medio de cultivo (Fig. 12). Con base en este resultado, decidimos evaluar las mutantes generadas aleatoriamente bajo un tratamiento mínimo de salinidad de 50 mM NaCl porque mostraron un retardo en el crecimiento, similar a los tratamientos con mayor concentración de salinidad.

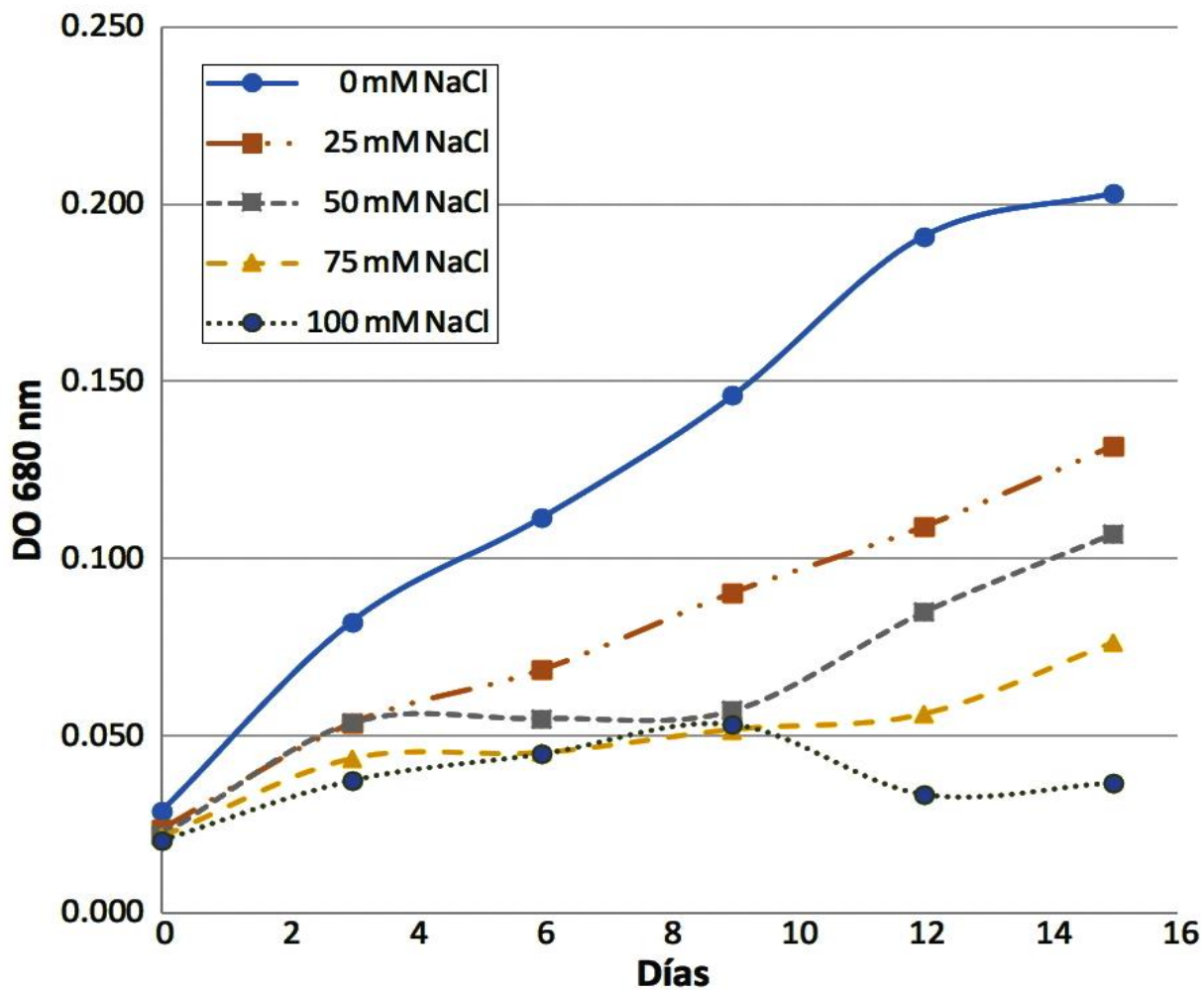
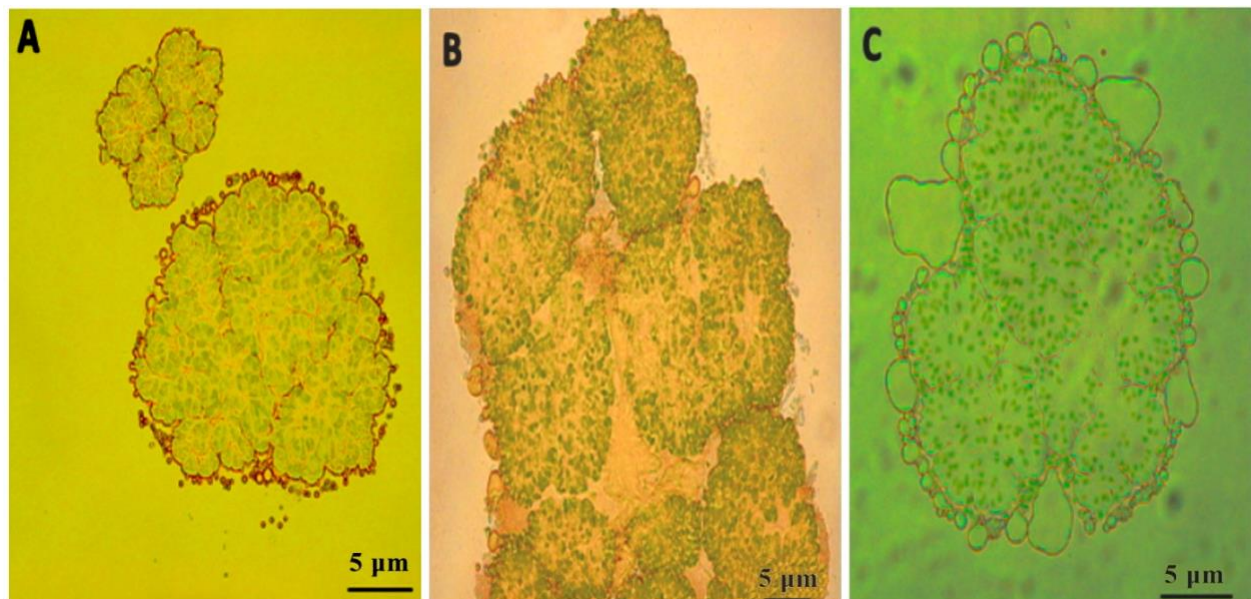


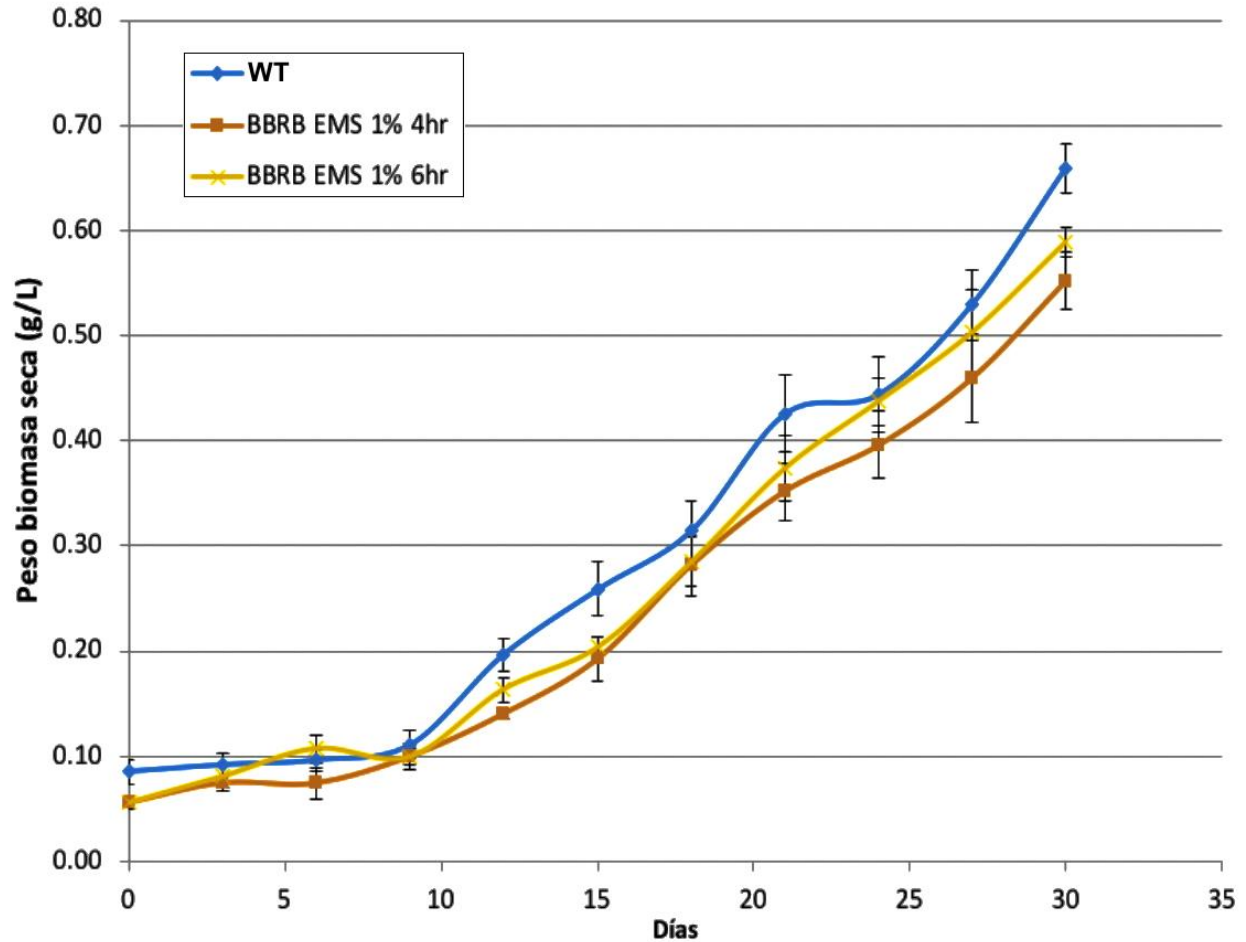
Figura 12. Curvas de crecimiento de *B. braunii* raza B (Showa) cultivadas en biorreactores “caseros” de medio con diferentes salinidades. Se prepararon dos cultivos independientes para cada tratamiento. Biorreactores con un volumen operacional de 400 mL, fueron inoculados con un 10% v/v de un cultivo de colonias verdes de *B. braunii* en fase exponencial y mantenidos en condiciones autótrofas y aeración de aire filtrado durante 15 días. Los datos representan el promedio de dos repeticiones biológicas y tres técnicas (SE; n = 2).

Después de la mutagénesis de *B. braunii* por diferentes tratamientos de EMS y una serie de subcultivos de las colonias flotantes en condiciones de salinidad a 50 mM NaCl, se observaron que algunas colonias presentaron un fenotipo alterado en respuesta a la salinidad. En las poblaciones mutantes tratadas con 1% EMS por 4 h, algunas colonias presentaron una mayor aglutinación de colonias que el silvestre (Fig. 13B). Por el contrario, las poblaciones mutantes tratadas con 1% EMS por 6 h presentaron colonias que liberaron células individuales bajo estrés por salinidad, pero siendo todavía capaces de producir hidrocarburos (Fig. 13C). Las colonias tratadas con 2% EMS por 4 y 6 h no presentaron colonias viables después del cultivo en medio salobre.



**Figura 13. Morfología de poblaciones mutantes de *B. braunii* inducidas por diferentes tratamientos de EMS y cultivadas bajo estrés de salinidad.** Colonias de *B. braunii* produciendo hidrocarburos de la población silvestre (sin EMS) (A), y de tratamientos con 1% de EMS durante 4 h (B) o 6 h (C). Barra de escala, 5 µm.

Posteriormente, se evaluaron el crecimiento de estas dos poblaciones mutantes de *B. braunii* en medio suplementado con 50 mM NaCl, como se muestran en la Fig. 14. Las poblaciones inducidas con EMS y la silvestre (WT) mostraron un continuo aumento en el peso de la biomasa seca después de los 9 días de cultivo. Sin embargo, no se logró determinar la fase estacionaria tanto en las poblaciones mutantes *B. braunii* como el control después de 30 días.



**Figura 14. Curvas de crecimiento de poblaciones mutantes *B. braunii* cultivadas en medios con tratamiento de salinidad.** Medición de biomasa seca del cultivo crecido en medio Chu-13 suplementado con 50 mM NaCl durante 30 días. Los datos representan el promedio y las barras de error representan un error estándar de valor medio de tres repeticiones biológicas y tres técnicas (SE; n = 3)

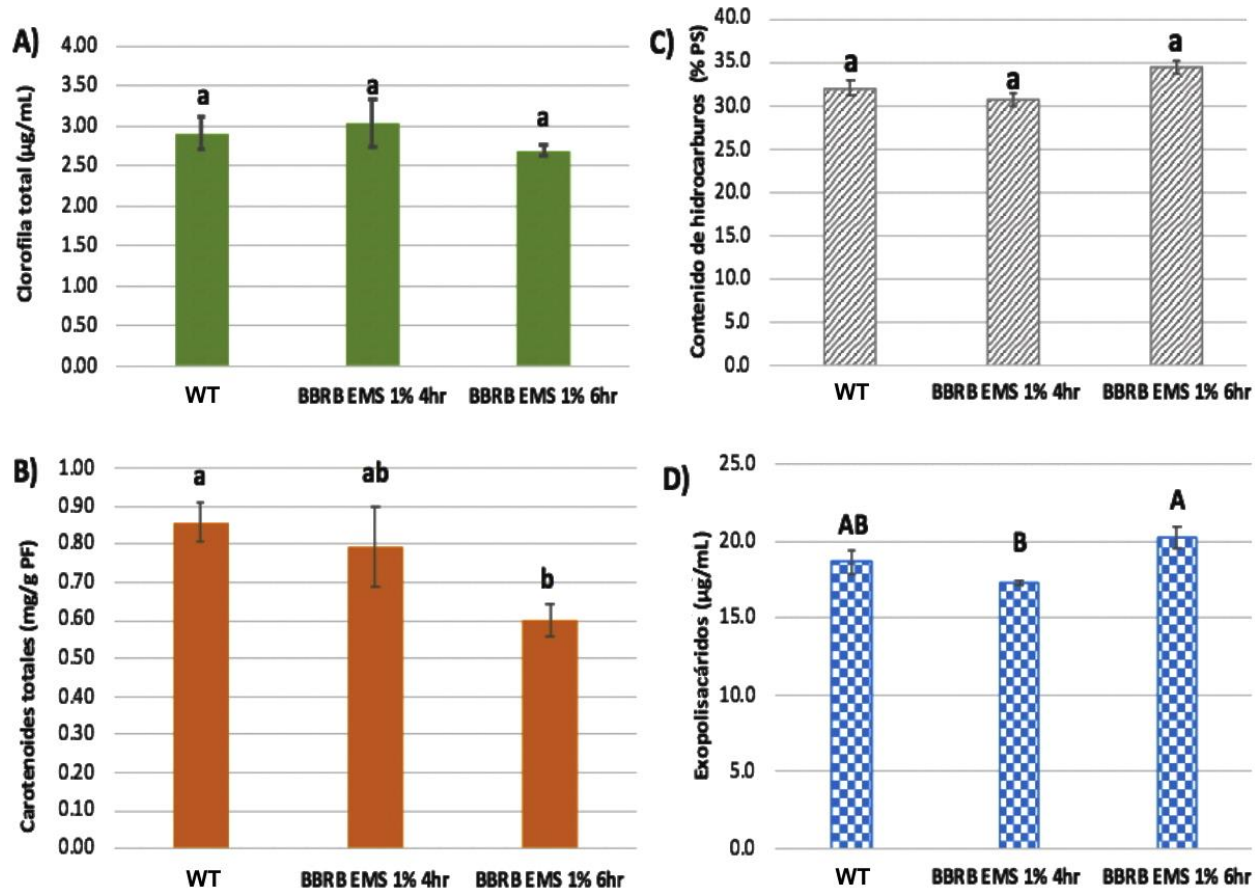
En la Tabla 4 se muestra la determinación de los parámetros cinéticos de las poblaciones mutantes. Desafortunadamente, los resultados obtenidos para los tratamientos evaluados no mostraron diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el tiempo de duplicación y productividad de biomasa entre las poblaciones mutantes inducidas por EMS con respecto al WT. Sin embargo, en la población mutante inducida por 6 h se observó un ligero incremento en su tasa de crecimiento con respecto al control.

**Tabla 4. Cinética de crecimiento y contenido de hidrocarburos de poblaciones mutantes de *B. braunii* cultivadas en medios con tratamiento de salinidad.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Tasa específica de crecimiento (día<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tiempo de duplicación (día)</b>	<b>Productividad de biomasa (g L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>)</b>
WT	0.070 ± 0.014	10.2 ± 2.1	0.019 ± 0.02
EMS 1% 4 h	0.076 ± 0.004	9.1 ± 0.5	0.017 ± 0.002
EMS 1% 6 h	0.079 ± 0.005	8.8 ± 0.6	0.018 ± 0.001

Medición de biomasa seca de cultivo después de 30 días en medio Chu-13 suplementado con NaCl 50 mM Los datos representan un promedio de tres repeticiones biológicas (lotes) ± desviación estándar (SD, n = 3).

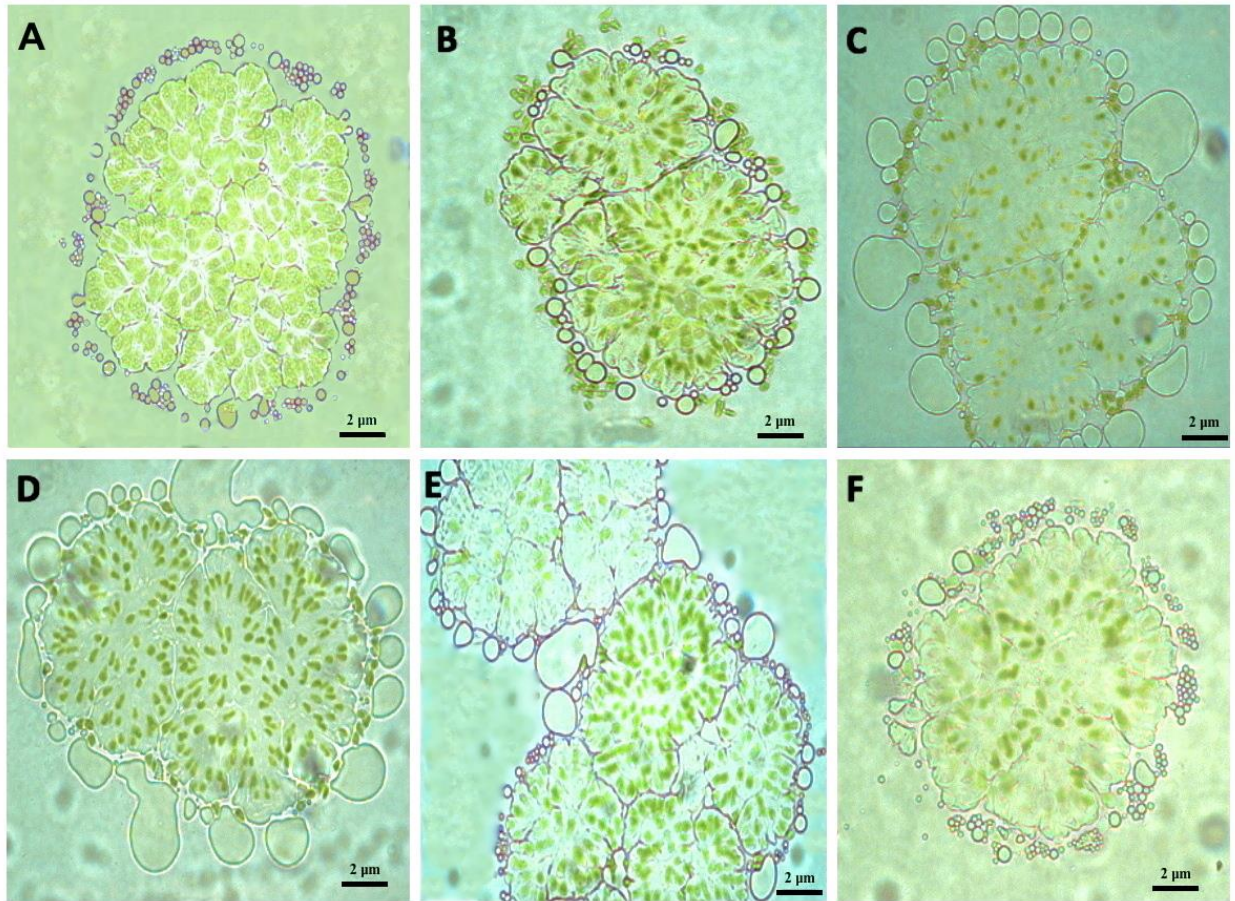
En este trabajo, también se evaluó la acumulación de pigmentos como la clorofila y los carotenoides al final de la cinética, para monitorear el estado fisiológico y bioquímico de las células de algas. Mientras los niveles de clorofila fueron similares entre las poblaciones mutantes y el control, el contenido de carotenoides totales fue menor en la población mutante EMS (1%, 6 h) en comparación al WT (Fig. 15A y B). Adicionalmente, el contenido de hidrocarburos extracelulares tampoco mostró diferencia significativa entre los tratamientos (Fig. 15C). Por el contrario, la concentración de exopolisacáridos en el medio fue mayor en la población mutante EMS (1%, 6 h) en comparación a la población mutante EMS (1%, 4 h).



**Figura 15. Medición de metabolitos de células mutantes por EMS en condiciones de salinidad.** Clorofila (A), carotenoides (B), hidrocarburos (C) y exopolisacáridos (D) de poblaciones mutantes de *B. braunii* cultivadas en medio Chu-13 complementado con NaCl 50 mM al final del ciclo de cultivo de 30 días. Los datos representan el promedio y las barras de error representan un error estándar de valor medio de tres repeticiones biológicas y tres técnicas (SE; n = 3). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas en la concentración de pigmento (Tukey HSD, P <0.05). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas en el contenido total de exopolisacáridos (Tukey HSD, P <0.01).

### 6.3 Mutagénesis por UV-C en medio salobre de *B. braunii* raza B

Después de 2 semanas de cultivo en condiciones de salinidad (75 mM NaCl), todos los tratamientos de mutagénesis por UV-C presentaron colonias con menor número de células viables retenidas en la matriz extracelular, aunque produjeron y secretaron hidrocarburos al igual que el control (Fig. 16). Sin embargo, solamente las colonias mutantes inducidas por 1 min se recuperaron y proliferaron adecuadamente bajo condiciones de salinidad.



**Figura 16.** Colonias mutantes de *B. braunii* raza B inducidas por UV-C (15 W, 254 nm; 5 cm) e incubadas durante 2 semanas en biorreactores “caseros” de 50 mL de medio Chu-13 con 75 mM NaCl. A) Colonias WT. Colonias expuestas a luz UV-C durante B) 1 min C) 3 min, D) 5 min, E) 8 min y F) 10 min. Escala de barra: 2 μm.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Biofloculación de algas en cultivo de membrana

En el presente estudio, los cambios morfológicos y fisiológicos reflejados en las colonias granulares formadas en cultivo de membrana, sugieren fuertemente una biofloculación de microalgas (Figs. 10-11). La biofloculación consiste en la agregación causada por biopolímeros secretados por microorganismos, principalmente polisacáridos y proteínas, en respuesta a estrés abiótico, ya sean cambios en el contenido de nitrógeno, el pH, el oxígeno disuelto y la cantidad de iones de calcio y magnesio en los medios de cultivo (Ummalyma *et al.*, 2017). En *B. braunii* (LICME 003) se ha reportado una eficiente biofloculación después de aplicar ácido poli( $\gamma$ -glutámico) derivado de *B. subtilis* para cosechar la biomasa de microalgas, sin mostrar daño en su integridad celular (Zheng *et al.*, 2012). Asimismo, un trabajo previo realizado por Lee *et al.*, (1998) reportaron que la biofloculación de *B. braunii* (UTEX LB572) mediante un ajuste a un pH alto (pH 11) fue más efectivo que la aplicación de sulfato de aluminio o un floculante microbiano derivado de *Pestalotiopsis* sp. En contraste con estudios previos sobre biofloculación de algas que estaban suspendidos en medio líquido, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron la biofloculación de microalgas viables en forma de colonias granulares sobre la biopelícula de *B. braunii* en medio sólido. Además, hasta la fecha no se había reportado formación de colonias verdes granulares cuando *B. braunii* es cultivado en sistemas no suspendidos, donde el alga crece sobre una superficie de filtros o membranas, incluso de células individuales de *B. braunii* (Fig. 10). Hou *et al.*, (2013) reportaron resultados similares que mostraron una rápida pérdida de viabilidad (2 días) de las células individuales de *B. braunii* (Showa) crecidas en membranas sobre medio sólido, pero no observaron formación de colonias granulares después de 2 meses de cultivo en contraste con este trabajo (Fig. 11).

El flujo de nutrientes y agua probablemente fueron factores críticos en el desarrollo de la biopelícula de *B. braunii* crecida en membrana, así como la formación de colonias granulares sobre la biomasa retenida en membrana. Wijihastuti *et al.*, (2017) no encontraron formación de colonias granulares de la cepa BOT22 de *B. braunii* raza B crecida en sistemas no suspendidos, probablemente por una favorable transferencia de nutrientes y humedad a través del uso de esponjas, remojadas en medio líquido, en lugar del medio sólido como soporte de la biopelícula de



*B. braunii*, lo cual mejoró la generación de biomasa e hidrocarburos por un periodo prolongado de cultivo. Aunque el mecanismo exacto de la biofloculación todavía no se entiende completamente, es posible que la biofloculación de *B. braunii* sea por la generación de EPS inducido por estrés abiótico y sus propiedades fisicoquímicas. Se ha reportado que la producción de EPS en microorganismos tiene un papel importante en el intercambio de nutrientes y son responsables de la adhesión entre células para la formación de estructuras que protegen a los microorganismos contra la depredación y la desecación (Katarzyna *et al.*, 2015).

Como anteriormente se mencionó, las colonias están envueltas por una red de fibras de polisacáridos, aunque su papel sigue sin estar claro. Weiss *et al.*, (2012) formularon la hipótesis de que esta red fibrilar no solamente proporcionaba protección contra bacterias y depredadores, sino que podrían mediar los intercambios ectosimbióticos entre *B. braunii* y bacterias que reconocen las fibras de polisacáridos en la MEC. El tratamiento de mutagénesis inducido UV-C no solamente generó lesiones en el genoma de *B. braunii* (Showa), sino que probablemente redujo la diversidad y abundancia de microorganismos ectosimbióticos presentes en el cultivo de *B. braunii* (Showa) (Fig. 7). En la tesis doctoral de Goiveia (2017), se reportó que los cultivos de *B. braunii* raza A (CCALA778) tratados con luz UV-C mostraron casi el doble de acumulación de EPS y un incremento en el tamaño de sus colonias, en comparación con los cultivos no tratados. Estos cambios fisiológicos en *B. braunii* después de aplicar luz UV-C fueron atribuidos principalmente a la reducción de la carga bacteriana antagónica, que posiblemente consumen los EPS disponibles como una fuente rica de compuestos orgánicos para su propia proliferación, y permitiéndoles competir contra *B. braunii* por nutrientes esenciales.

Aparte de su aplicación como método de esterilización, la luz UV-C se ha utilizado con éxito para generar mutantes de microalgas porque es más segura y práctica que los mutágenos químicos como EMS, pero menos efectiva. Por lo tanto, la mutagénesis por UV-C requiere dosis más altas que conducen a tasas de supervivencia más bajas (Lim *et al.*, 2015). Aunque la tasa de mutaciones aumenta en las cepas sobrevivientes después de aplicar altas dosis de luz UV-C, también incrementa el daño al fondo genético de las microalgas. Como consecuencia, se reduce la tasa de recuperación de microalgas mutagenizadas viables como se observó con las colonias de *B. braunii* (Showa) tratadas con UV-C y posteriormente cultivadas en medio salobre (Fig. 16).

Igualmente, Liu *et al.*, (2015) reportaron que una tasa de supervivencia alrededor del 25-10% de las microalgas irradiadas con UV-C se asociaba con un efecto mutagénico sustancial y positivo, mientras dosis elevadas de UV-C con una tasa de supervivencia menor al 10% produjeron microalgas mutantes generalmente negativas, es decir, con menor rendimiento de biomasa o producción de lípidos. Asimismo, se ha reportado que la eficiencia de la mutagénesis por UV-C depende de varios factores que involucran el tiempo de exposición, la distancia entre la lámpara de UV-C y la muestra, la intensidad y longitud de onda de la lámpara de UV-C, así como la concentración celular y morfología de la microalga (Lim *et al.*, 2015; Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2017; Zhang *et al.*, 2018). El método de crecimiento también tuvo un efecto en las tasas de supervivencia después de la exposición a UV-C, pues las tasas de supervivencia de microalgas cultivadas en un medio líquido fueron más altas en comparación con las sembradas en la superficie de placas con medio sólido (Lim *et al.*, 2015).

## 7.2 Crecimiento de mutantes en tratamiento de salinidad

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron corroborar la inhibición del crecimiento de *B. braunii* (Showa) dependiendo de la concentración de salinidad presente en el medio de cultivo (Fig. 12). Sin embargo, se observó una inhibición desde concentraciones menores a las reportadas por Furuhashi *et al.*, (2016b), sugiriendo que la falta de suministro de CO<sub>2</sub> bajo nuestras condiciones de cultivo aumentó la inhibición inducida por el estrés salino ante la baja fuente de carbono. Diversos estudios indican que la concentración de CO<sub>2</sub> enriquecido en el aire suministrado es un factor que influye significativamente la tasa de crecimiento de microalgas. Ortiz-Montoya *et al.*, (2014) aumentó la productividad lipídica y concentración de biomasa de *C. vulgaris* al aumentar el suministro de CO<sub>2</sub> del 1 al 8% (v/v). En otro estudio, Kaewkannetra *et al.*, (2012) demostró que al suministrar hasta un 15% (v/v) de CO<sub>2</sub> se logró incrementar el rendimiento de biomasa de *S. obliquus* en comparación con la ausencia de CO<sub>2</sub> (de 1.5 a 2.3 g/L). Igualmente, Yoshimura *et al.*, (2013) reportaron un incremento en la tasa de crecimiento específico de *B. braunii* (Showa) desde 0.24 día<sup>-1</sup> en aire ambiental (0.02% CO<sub>2</sub>) hasta alrededor de 0.35 día<sup>-1</sup> bajo suministro de aire enriquecido con 0.2-5% CO<sub>2</sub>. Sin embargo, bajo mayores concentraciones de CO<sub>2</sub>, el crecimiento de esta microalga fue afectado debido a que el exceso de CO<sub>2</sub> no utilizado en el medio fue posiblemente convertido en H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, reduciendo así el pH del medio. Por otra parte, la alta salinidad es un estrés ambiental que generalmente perjudica el crecimiento de microalgas de agua dulce, pues obstaculiza la absorción de agua y nutrientes, lo cual produce diferentes grados de daño celular (Zuppini *et al.*, 2010). El contenido relativamente elevado de NaCl es un factor desfavorable para la producción de biomasa en la cepa Showa de *B. braunii* raza B (Yoshimura *et al.*, 2013; Furuhashi *et al.*, 2016b). Asimismo, Cornejo-Corona *et al.*, (2016) demostraron que el NaCl fue el inductor de estrés más fuerte y rápido (10 min) de *B. braunii* (Showa), en cuanto a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como respuesta temprana para la adaptación bajo condiciones desfavorables.

Las microalgas también desarrollaron estrategias de adaptación en respuesta a las condiciones de estrés inducidas por la salinidad. Como se ha mencionado anteriormente, *B. braunii* presentó un aumento generalizado en el tamaño de sus colonias bajo condiciones de estrés salino (Furuhashi *et al.*, 2016b). Los datos obtenidos en este trabajo mostraron que algunas colonias de la población mutante EMS (1%; 4 h) presentaron una mayor aglutinación relativa en comparación a

la silvestre, sugiriendo una mayor respuesta a la presión osmótica en el medio con 50 mM NaCl (Fig. 13 A y B). Por el contrario, en la población mutante EMS (1%; 6 h) se presentó una respuesta similar al tratamiento con glicerol para liberar células individuales, contraria a la respuesta de las colonias silvestres que tienden en aumentar el tamaño de las colonias (Fig. 13 A y C). Además, las colonias mutantes inducidas por UV-C, las cuales fueron sometidas a estrés salino, presentaron fenotipos similares a la población mutante EMS (1%; 6 h) (Fig. 16). Hou *et al.*, (2013) sugirió que la liberación de células individuales de *B. braunii* por el glicerol se debió al incremento en la disolución de reactivos químicos en los aceites de hidrocarburos de la MEC, que ocasionó un aumento del volumen de la misma y generó la presión hidráulica necesaria para empujar las células atrapadas dentro de la MEC. Otros mecanismos de respuestas inducidos por la salinidad en microalgas incluyen la desintoxicación de ROS a través de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) (Chokshi *et al.*, 2017; Zuppini *et al.*, 2010); y la acumulación de osmolitos de bajo peso molecular como glicerol, prolina, manitol y sacarosa (Ishika *et al.*, 2017). Se ha demostrado que la microalga hipersalina *Dunaliella salina* aumenta la síntesis y el contenido de glicerol en respuesta a altos niveles de estrés por salinidad (Chen *et al.*, 2009). Igualmente, se reportó que *N. oleoabundans* incrementó su nivel de expresión en todos los genes implicados en la biosíntesis de prolina, aumentando el contenido de prolina bajo condiciones de salinidad (De Jeager *et al.*, 2018). Sin embargo, todavía no se ha evaluado la actividad de estas enzimas antioxidantes y osmolitos en *B. braunii* raza B bajo estrés salino, por lo cual se podría realizar un estudio a nivel transcriptómico y metabólico para elucidar el mecanismo osmorregulador de *B. braunii* (Showa) bajo condiciones de medio salino y óptimo durante ciclos de cultivo cortos y largos.

En este trabajo se logró tener una población de microalgas mutantes resistentes a ciertos niveles de salinidad, y se tiene la posibilidad de seleccionar líneas con mayor resistencia mediante continuos subcultivos bajo estrés salino. El hecho de que ninguna mutante mostró una diferencia significativa en la tasa de proliferación celular con respecto al silvestre, podría deberse a la heterogeneidad de las colonias mutantes (Tabla 4), que puede ocasionar una diversidad considerable en su tasa de crecimiento, con microalgas de crecimiento lento y rápido, así como varios posibles fenotipos con diferentes tamaños de células. Estudios previos han reportado que mutaciones en genes involucrados en el control del ciclo celular de microalgas afectan tanto el

tamaño de las células hijas como el número de divisiones celulares que realizan las microalgas verdes unicelulares (Cross & Umen, 2015). Por ejemplo, mutantes de *C. reinhardtii* que carecen de una proteína relacionada con retinoblastoma (RBR/MAT3), iniciaban prematuramente su división mitótica con un tamaño celular menor al silvestre, y luego se dividían demasiadas veces durante la transición S/M para producir células hijas pequeñas, aunque su tiempo de duplicación fue similar al silvestre (Umen & Goodenough, 2001). También se encontró que la concentración relativa de CDKG1, una cinasa dependiente de ciclina D localizada en el núcleo, estaba correlacionada con el número de divisiones celulares en *C. reinhardtii* mediante la regulación río arriba de RBR/MAT3 (Li *et al.*, 2016). Además, las células mutantes que carecían de CDKG1 sufrieron un insuficiente número de divisiones mitóticas que condujo a la generación de células hijas grandes, aunque mostraron un tiempo de duplicación similar al silvestre. Por el contrario, las células sobreproductoras de CDKG1 se dividían demasiadas veces y generaban células hijas pequeñas (Li *et al.*, 2016). Sin embargo, todavía no está claro cómo estas alteraciones en la maquinaria del ciclo celular por la ruta RBR afectan el desarrollo del cloroplasto y otros orgánulos de microalgas durante su ciclo celular, ni en la ruta de biosíntesis o catabolismo de metabolitos como lípidos y terpenoides con respecto a la cepa silvestre.

La reducción de los pigmentos fotosintéticos es una respuesta común de las microalgas en condiciones de estrés ambiental. En la acumulación de carotenoides, solamente la población mutante EMS (1%, 6 h) se vio significativamente reducida por las condiciones de estrés salino (Fig. 15B), lo cual puede indicar que esta población mutante es más sensible al estrés salino debido al mayor aumento de la cantidad de ROS en las células mutantes que la población silvestre. Chokshi *et al.*, (2017) han reportado que la reducción de carotenoides por la acumulación de ROS inducida por estrés salino también disminuyó la eficiencia fotosintética de esta microalga, por la probable peroxidación de los lípidos tilacoides y degradación del complejo PS II. Por otra parte, la acumulación de clorofila fue similar en las poblaciones mutantes EMS y silvestres por las condiciones de estrés salino, reflejando una similar capacidad fotosintética. Estos resultados obtenidos son contradictorios con estudios previos que reportan que los contenidos de clorofila también disminuyeron significativamente junto a los carotenoides cuando se incrementa la concentración de NaCl, probablemente por promover la degradación de la clorofila (Ji *et al.*, 2018; Chokshi *et al.*, 2017). Esta inconsistencia en los resultados podría deberse a la menor densidad de

células viables por colonia de la población mutante EMS (1%, 6 h) en comparación al silvestre, probablemente influyó en las mediciones de pigmentos. Asimismo, el método espectrofotométrico utilizado tiene la principal desventaja de carecer alta resolución y se requiere de la extracción de pigmentos que provenga de al menos 500 mg de biomasa para que los resultados sean significativos, aunque sigue siendo un método útil y sencillo de aplicar (Cornejo-Corona, 2017). Otros análisis necesarios para evaluar diferencias en la respuesta de las colonias mutantes y silvestres bajo estrés salino serían la detección fluorescente de ROS (Cornejo-Corona *et al.*, 2016), así como la determinación de la concentración endógena de ácido abscísico y la peroxidación lipídica en las colonias de *B. braunii* (Chokshi *et al.*, 2017).

Durante las condiciones de estrés, el flujo de carbono fotosintético en las células de microalgas canaliza la energía metabólica para sintetizar varios compuestos ricos en energía. En este trabajo solamente la población mutante EMS (1 %; 6 h) presentó un mayor contenido de EPS liberados que la otra población mutante EMS (1%; 4 h) (Fig. 15D), lo cual sugiere que la población mutante EMS (1 %; 6 h) tiene colonias que se ven menos afectados por el estrés salino. En un estudio realizado por Furuhashi *et al.*, (2016b), reportaron una reducción en las cantidades de galactosa y arabinosa sintetizadas, mientras la cantidad de glucosa se incrementó en medio salobre. Asimismo, los mismos autores sugirieron que en *B. braunii* raza B los azúcares de bajo peso molecular son dirigidos hacia la producción de osmolitos, posiblemente disacáridos compuestos de glucosa, para amortiguar el choque osmótico. Por otro lado, se observó una reducción en la densidad y número de fibrillas de polisacáridos, los cuales bloquean el contacto entre los hidrocarburos y el solvente, y sus componentes principales son galactosa y arabinosa (Furuhashi *et al.*, 2016a; 2016b).

Además, en este trabajo se observó que el contenido de hidrocarburos en *B. braunii* fue similar entre las poblaciones mutantes EMS y el silvestre (Fig. 15C). Furuhashi *et al.*, (2016b) reportaron que el contenido de hidrocarburos tendió a aumentar con el incremento de la salinidad, aunque las diferencias no fueron significativas. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que los efectos del estrés por salinidad son altamente específicos de especie, e inclusive de cepa. Rao *et al.*, (2007) informó un aumento en biomasa y lípidos, así como las proporciones relativas de ácido palmítico y ácido oleico en *B. braunii* raza A (LB 572), a diferentes niveles de salinidad.

Ruangsombon (2012) reportó resultados similares obtenidos, pero variando otras condiciones adicionales como luz y nutrientes. Asimismo, se podría analizar la extractabilidad de hidrocarburos de diferentes cepas de *B. braunii* bajo las mismas condiciones de cultivo en medio óptimo y con diferentes concentraciones de NaCl en el medio.

Todavía se requieren evaluar estas poblaciones mutantes tanto en condiciones óptimas como en otros tipos de estrés abióticos como falta de nutriente o alta iluminación. El aislamiento de líneas mutantes de *B. braunii* es complicado porque es un alga que es incapaz de crecer rápidamente en la superficie de medios sólidos para obtener una sola colonia de células con fenotipo alterado. Sin embargo, diversas cepas de *B. braunii* fueron originalmente aisladas con micropipeta, porque tiene cierta ventaja para seleccionarla por su tamaño colonial con respecto a las microalgas unicelulares (Okada *et al.*, 1995). Este método es muy laborioso debido a que una microalga particular se recolecta con ayuda de un microscopio y luego se transfiere a un nuevo medio estéril varias veces para reducir significativamente los contaminantes después de cada ciclo de lavado (Vu *et al.*, 2017). Por lo tanto, se deben diseñar métodos novedosos de screening para lograr no solamente aislar líneas mutantes de *B. braunii*, sino también que permitan evaluar paralelamente tanto la tasa de crecimiento de microalgas como la producción y perfil de metabolitos. Recientemente, las plataformas microfluídicas ofrecen una alternativa atractiva sobre métodos convencionales en la investigación de microalgas como fuente de biocombustibles y bioproductos, pues ofrecen varias ventajas como análisis rápidos, alta sensibilidad a escala de nano o picolitro, portabilidad y capacidad de integrar funciones múltiples en un solo chip, y por lo tanto es una plataforma tecnológica ideal para superar muchos cuellos de botella encontrados en la biotecnología de microalgas (Kim *et al.*, 2018). Por ejemplo, Kim *et al.*, (2017) diseñaron una plataforma microfluídica de gota que permitió seleccionar exitosamente 8 mutantes potenciales de *C. reinhardtii* con alto rendimiento de crecimiento y producción de lípidos a partir de una biblioteca de 200,000 células de *C. reinhardtii* mutadas mediante EMS. Esta plataforma microfluídica permitió analizar y cuantificar simultáneamente la intensidad de la autofluorescencia de clorofila y la fluorescencia de BODIPY, para cuantificar el crecimiento celular y la producción de lípidos intracelulares de las microalgas encapsuladas en gotitas, respectivamente (Kim *et al.*, 2017). No obstante, se requeriría realizar adaptaciones en esta plataforma para favorecer el crecimiento óptimo de células individuales de *B. braunii*, especialmente en el suministro de CO<sub>2</sub>.

## 8. CONCLUSIÓN

- Desafortunadamente, no se logró obtener mutantes de rápido crecimiento por varios factores, entre los cuales se encuentra que el método de cultivo por membrana de nylon presentó complicaciones para su uso como método de selección de mutantes de *B. braunii*, debido a la alta variabilidad en el rendimiento de la formación de gránulos y su fuerte actividad de biofloculación.
- Las poblaciones mutantes inducidas por EMS mostraron algunas colonias con fenotipo alterado en el tratamiento de estrés salino. Aunque no se observaron diferencias significativas en sus parámetros de crecimiento, contenido de hidrocarburos y concentración de pigmentos, excepto en carotenoides totales y exopolisacáridos con respecto al silvestre; estas poblaciones ofrecen la posibilidad de seleccionar líneas resistentes a salinidad y productoras de hidrocarburos a partir de esas mutantes.



## 9. PERSPECTIVAS

Del presente trabajo se sugieren como perspectivas principales:

- ❖ Continuar aumentando la concentración de NaCl para reducir la heterogeneidad poblacional de las colonias mutantes inducidas por EMS o UV-C, especialmente en la población mutante EMS (1%, 6 h).
- ❖ Evaluar parámetros cinéticos y producción de metabolitos de mutantes inducidas por UV-C bajo medios salobres y óptimos.
- ❖ Realizar un screening de colonias mutantes de *B. braunii* (Showa) bajo condiciones de alta concentración de CO<sub>2</sub> (5-15 %) y salinidad (> 50 mM).
- ❖ Realizar pruebas de mutagénesis aleatoria con *B. braunii* raza A (Yamanaka) y raza L (Songkla Nakarin).
- ❖ Desarrollar e implementar otros métodos de cultivo sólido o semisólido que faciliten el crecimiento y selección de mutantes *B. braunii* (Showa), sugiriendo evaluar la adaptación y crecimiento de *B. braunii* cuando es encapsulado en perlitas de alginato.
- ❖ Evaluar y seleccionar mutantes de *B. braunii* inducidas por EMS o UV-C mediante la implementación de plataformas microfluídicas que permitan evaluar paralelamente la tasa de crecimiento y producción de lípidos neutrales o hidrocarburos.

## 10. REFERENCIAS

- Al-Hothaly, K. A., Adetutu, E. M., May, B. H., Taha, M., & Ball, A. S. (2015). Towards the commercialization of *Botryococcus braunii* for triterpenoid production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *42*, 1415-1418.
- Anandarajah, K., Mahendrapurumal, G., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2012). Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels. *Applied energy*, *96*, 371-377.
- Ashokkumar, V., & Rengasamy, R. (2012). Mass culture of *Botryococcus braunii* Kutz. under open raceway pond for biofuel production. *Bioresource technology*, *104*, 394-399.
- Ashokkumar, V., Agila, E., Sivakumar, P., Salam, Z., Rengasamy, R., & Ani, F. N. (2014). Optimization and characterization of biodiesel production from microalgae *Botryococcus* grown at semi-continuous system. *Energy conversion and management*, *88*, 936-946.
- Baba, M., Kikuta, F., Suzuki, I., Watanabe, M. M., & Shiraiwa, Y. (2012). Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. *Bioresource technology*, *109*, 266-270.
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2002). *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical reviews in biotechnology*, *22*, 245-279.
- Bazaes, J., Sepulveda, C., Ación, F. G., Morales, J., Gonzales, L., Rivas, M., & Riquelme, C. (2012). Outdoor pilot-scale production of *Botryococcus braunii* in panel reactors. *Journal of applied phycology*, *24*, 1353-1360.
- Beacham, T. A., Macia, V. M., Rooks, P., White, D. A., & Ali, S. T. (2015). Altered lipid accumulation in *Nannochloropsis salina* CCAP849/3 following EMS and UV induced mutagenesis. *Biotechnology reports*, *7*, 87-94.
- Casadevall, E., Dif, D., Largeau, C., Gudin, C., Chaumont, D., & Desanti, O. (1985). Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition. *Biotechnology and bioengineering*, *27*, 286-295.
- Chaturvedi, R., & Fujita, Y. (2006). Isolation of enhanced eicosapentaenoic acid producing mutants of *Nannochloropsis oculata* ST-6 using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis techniques and their characterization at mRNA transcript level. *Phycological research*, *54*, 208-219.

- Chaturvedi, R., Uppalapati, S. R., Alamsjah, M. A., & Fujita, Y. (2004). Isolation of quizalofop-resistant mutants of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) with high eicosapentaenoic acid following N-methyl-N-nitrosourea-induced random mutagenesis. *Journal of applied phycology*, *16*, 135-144.
- Chen, H., & Jiang, J. G. (2009). Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *Journal of cellular physiology*, *219*, 251-258.
- Cheng, P., Ji, B., Gao, L., Zhang, W., Wang, J., & Liu, T. (2013). The growth, lipid and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* with attached cultivation. *Bioresource technology*, *138*, 95-100.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, *25*, 294-306.
- Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., & Mishra, S. (2017). Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. *Bioresource technology*, *244*, 1376-1383.
- Cordero, B. F., Obratsova, I., Couso, I., Leon, R., Vargas, M. A., & Rodriguez, H. (2011). Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. *Marine drugs*, *9*, 1607-1624.
- Cornejo-Corona, I. (2017). Respuestas de estrés de la microalga *Botryococcus braunii* a inductores abióticos (Tesis doctoral). Cinvestav Unidad Irapuato, Irapuato, México.
- Cornejo-Corona, I., Thapa, H. R., Browne, D. R., Devarenne, T. P., & Lozoya-Gloria, E. (2016). Stress responses of the oil-producing green microalga *Botryococcus braunii* Race B. *PeerJ*, *4*, e2748.
- Cornejo-Corona, I., Thapa, H.R., Devarenne, T.P. & Lozoya-Gloria, E. (2015) The biofuel potential of the green colonial microalga *Botryococcus braunii*. Chapter 3 In: *Microalgae and other phototrophic bacteria: Culture, processing, recovery and new products*. Ed. Torres-Bustillos, L.G., Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, NY. pp. 41-58.
- Cross, F. R., & Umen, J. G. (2015). The *Chlamydomonas* cell cycle. *The plant journal*, *82*, 370-392.
- Dayananda, C., Sarada, R., Rani, M. U., Shamala, T. R., & Ravishankar, G. A. (2007). Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass and bioenergy*, *31*, 87-93.

- De Jaeger, L., Carreres, B. M., Springer, J., Schaap, P. J., Eggink, G., Dos Santos, V. A. M., ... & Martens, D. E. (2018). *Neochloris oleoabundans* is worth its salt: Transcriptomic analysis under salt and nitrogen stress. *PloS one*, *13*, e0194834.
- Doan, T. T. Y., & Obbard, J. P. (2012). Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. *Algal research*, *1*, 17-21.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, *28*, 350-356.
- Fu, W., Chaiboonchoe, A., Khraiwesh, B., Nelson, D. R., Al-Khairi, D., Mystikou, A., ... & Salehi-Ashtiani, K. (2016). Algal Cell Factories: Approaches, Applications, and Potentials. *Marine drugs*, *14*, 225.
- Furuhashi K, Hasegawa F, Saga K, Okada S, Kaizu Y, & Imou K. (2016b). Effects of culture medium salinity on the hydrocarbon extractability, growth and morphology of *Botryococcus braunii*. *Biomass and bioenergy*. *91*, 83–90.
- Furuhashi K, Noguchi T, Okada S, Hasegawa F, Kaizu Y, & Imou K. (2016a). The surface structure of *Botryococcus braunii* colony prevents the entry of extraction solvents into the colony interior. *Algal research*, *16*, 160–166.
- Furuhashi K, Saga K, Okada S. & Imou K (2013) Seawater-cultured *Botryococcus braunii* for efficient hydrocarbon extraction. *PloS One* *8*: e6648.
- Ge, Y., Liu, J., & Tian, G. (2011). Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO<sub>2</sub> concentration in photobioreactor. *Bioresource technology*, *102*, 130-134.
- Gong Y, Hu H, Gao Y, Xu X & Gao H (2011) Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *38*,1879-1890.
- González N. (23 enero 2018). Petróleo cae al peor nivel en 38 años; producción se reduce 9.6%. *Excelsior*. Recuperado de: <https://www.excelsior.com.mx/nacional/2018/01/23/1215363> .
- Gouveia, J. D. (2017). *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides and the role of associated bacteria (Tesis doctoral). Wageningen University & Research, Wageningen, Países Bajos.
- Gouveia, J. D., Ruiz, J., van den Broek, L. A., Hesselink, T., Peters, S., Kleinegris, D. M., ... & Wijffels, R. H. (2017). *Botryococcus braunii* strains compared for biomass productivity, hydrocarbon and carbohydrate content. *Journal of biotechnology*, *248*, 77-86.

- Gouveia, L., Marques, A. E., Da Silva, T. L., & Reis, A. (2009). *Neochloris oleabundans* UTEX# 1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36, 821-826.
- Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., & Gelbart, W.M. (2000). An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. New York: W. H. Freeman. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21936/> .
- Griffiths, M. J., & Harrison, S. T. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of applied phycology*, 21, 493-507.
- Grung, M., Metzger, P., & Liaaen-jensen, S. (1989). Primary and secondary carotenoids in two races of the green alga *Botryococcus braunii*. *Biochemical systematics and ecology*, 17, 263-269.
- Guionet, A., Hosseini, B., Teissié, J., Akiyama, H., & Hosseini, H. (2017). A new mechanism for efficient hydrocarbon electro-extraction from *Botryococcus braunii*. *Biotechnology for biofuels*, 10, 39.
- Hathwaik, L. T., Cushman, J. C., (2017). Strain Selection Strategies for Improvement of Algal Biofuel Feedstocks. Chapter 11, In: *Biofuels and bioenergy*. Eds. Love, J., & Bryant, J. A., John Wiley & Sons Ltd. pp. 173-189.
- Hillen, L. W., Pollard, G., Wake, L. V., & White, N. (1982). Hydrocracking of the oils of *Botryococcus braunii* to transport fuels. *Biotechnology and bioengineering*, 24, 193-205.
- Hou, L., Park, H., Okada, S., & Ohama, T. (2014). Release of single cells from the colonial oil-producing alga *Botryococcus braunii* by chemical treatments. *Protoplasma*, 251, 191-199.
- Ioki M., Ohkoshi M., Nakajima N., Nakahira-Yanaka Y., Watanabe M.M. (2011) Isolation of herbicide-resistant mutants of *Botryococcus braunii*. *Bioresources technology* 109, 300–303.
- Ishika, T., Moheimani, N. R., & Bahri, P. A. (2017). Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: a critical review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 78, 356-368.
- Jackson, B. A., Bahri, P. A., & Moheimani, N. R. (2017). Repetitive non-destructive milking of hydrocarbons from *Botryococcus braunii*. *Renewable and sustainable energy reviews*, 79, 1229-1240.

- Ji, X., Cheng, J., Gong, D., Zhao, X., Qi, Y., Su, Y., & Ma, W. (2018). The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga—*Scenedesmus obliquus* XJ002. *Science of the total environment*, *633*, 593-599.
- Jiang, Z., Kempinski, C., Bush, C. J., Nybo, S. E., & Chappell, J. (2016). Engineering triterpene and methylated triterpene production in plants provides biochemical and physiological insights into terpene metabolism. *Plant physiology*, *17*, 702–716.
- Jiang, Z., Kempinski, C., Kumar, S., Kinison, S., Linscott, K., Nybo, E., ... & Chappell, J. (2018). Agronomic and chemical performance of field-grown tobacco engineered for triterpene and methylated triterpene metabolism. *Plant biotechnology journal*, *16*, 1110-1124.
- Jin, J., Dupré, C., Yoneda, K., Watanabe, M. M., Legrand, J., & Grizeau, D. (2016). Characteristics of extracellular hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* for biofuels production: Recent advances and opportunities. *Process biochemistry*, *51*, 1866-1875.
- Kaewkannetra, P., Enmak, P., & Chiu, T. (2012). The effect of CO<sub>2</sub> and salinity on the cultivation of *Scenedesmus obliquus* for biodiesel production. *Biotechnology and bioprocess engineering*, *17*, 591-597.
- Kamath, B. S., Vidhyavathi, R., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2008). Enhancement of carotenoids by mutation and stress induced carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* mutants. *Bioresource technology*, *99*, 8667-8673.
- Katarzyna, L., Sai, G., & Singh, O. A. (2015). Non-enclosure methods for non-suspended microalgae cultivation: literature review and research needs. *Renewable and sustainable energy reviews*, *42*, 1418-1427.
- Kawachi, M., Tanoi, T., Demura, M., Kaya, K., & Watanabe, M. M. (2012). Relationship between hydrocarbons and molecular phylogeny of *Botryococcus braunii*. *Algal research*, *1*, 114-119.
- Kempinski, C., & Chappell, J. (2018). Engineering triterpene metabolism in the oilseed of *Arabidopsis thaliana*. *Plant biotechnology journal*.
- Kempinski, C., Jiang, Z., Zinck, G., Sato, S. J., Ge, Z., Clemente, T. E., & Chappell, J. (2018). Engineering linear, branched-chain triterpene metabolism in monocots. *Plant biotechnology journal*. <https://doi.org/10.1111/pbi.12983> .
- Khatri, W., Hendrix, R., Niehaus, T., Chappell, J., & Curtis, W. R. (2014). Hydrocarbon production in high density *Botryococcus braunii* race B continuous culture. *Biotechnology and bioengineering*, *111*, 493-503.

- Kim, H. S., Devarenne, T. P., & Han, A. (2018). Microfluidic systems for microalgal biotechnology: a review. *Algal research*, 30, 149-161.
- Kim, H. S., Hsu, S. C., Han, S. I., Thapa, H. R., Guzman, A. R., Browne, D. R., ... & Han, A. (2017). High-throughput droplet microfluidics screening platform for selecting fast-growing and high lipid-producing microalgae from a mutant library. *Plant direct*, 1, e00011.
- Lee, D. Y., & Fiehn, O. (2008). High quality metabolomic data for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant methods*, 4, 7.
- Lee, S. J., Kim, S. B., Kim, J. E., Kwon, G. S., Yoon, B. D., & Oh, H. M. (1998). Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Letters in applied microbiology*, 27, 14-18.
- Li, Y., Liu, D., Lopez-Paz, C., Olson, B. J., & Umen, J. G. (2016). A new class of cyclin dependent kinase in *Chlamydomonas* is required for coupling cell size to cell division. *Elife*, 5, e10767.
- Lian, M., Huang, H., Ren, L., Ji, X., Zhu, J., & Jin, L. (2010). Increase of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. through mutagenesis and enzyme assay. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162, 935-941.
- Liang, S., Guo, L., Lin, G., Zhang, Z., Ding, H., Wang, Y., & Yang, G. (2017). Improvement of *Nannochloropsis oceanica* growth performance through chemical mutation and characterization of fast growth physiology by transcriptome profiling. *Chinese journal of oceanology and limnology*, 35, 792-802.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Vol. 148, In: *Methods in enzymology*, Academic Press. pp. 350-382.
- Lim, D. K., & Schenk, P. M. (2017). Microalgae selection and improvement as oil crops: GM vs non-GM strain engineering. *AIMS bioengineering*, 4, 151-161.
- Lim, D. K., Schuhmann, H., Sharma, K., & Schenk, P. M. (2015). Isolation of high-lipid *Tetraselmis suecica* strains following repeated UV-C mutagenesis, FACS, and high-throughput growth selection. *BioEnergy research*, 8, 750-759.
- Liu, S., Zhao, Y., Liu, L., Ao, X., Ma, L., Wu, M., & Ma, F. (2015). Improving cell growth and lipid accumulation in green microalgae *Chlorella* sp. via UV irradiation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175, 3507-3518.
- Magota, A., Saga, K., Okada, S., Atobe, S., & Imou, K. (2012). Effect of thermal pretreatments on hydrocarbon recovery from *Botryococcus braunii*. *Bioresource technology*, 123, 195-198.

- Maity, J. P., Bundschuh, J., Chen, C. Y., & Bhattacharya, P. (2014). Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives—A mini review. *Energy*, 78, 104-113.
- Matsushima, D., Jenke-Kodama, H., Sato, Y., Fukunaga, Y., Sumimoto, K., Kuzuyama, T.,... & Okada, S. (2012). The single cellular green microalga *Botryococcus braunii*, race B possesses three distinct 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases. *Plant science*, 185, 309-320.
- Mehtani, J., Arora, N., Patel, A., Jain, P., Pruthi, P. A., Poluri, K. M., & Pruthi, V. (2017). Augmented lipid accumulation in ethyl methyl sulphonate mutants of oleaginous microalga for biodiesel production. *Bioresource technology*, 242, 121-127.
- Melis, A. (2012). Photosynthesis-to-fuels: from sunlight to hydrogen, isoprene, and botryococcene production. *Energy & environmental science*, 5, 5531-5539.
- Metzger, P., & Largeau, C. (2005). *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied microbiology and biotechnology*, 66, 486-496.
- Molnár, I., Lopez, D., Wisecaver, J.H., Devarenne, T.P., Weiss, T.L., Pellegrini, M. & Hackett, J.D. (2012). Bio-crude transcriptomics: gene discovery and metabolic network reconstruction for the biosynthesis of the terpenome of the hydrocarbon oil-producing green alga, *Botryococcus braunii* race B (Showa). *BMC Genomics*, 13, 576-603.
- Morales-de la Cruz, X., Ozawa-Uyeda, T.A. & Lozoya-Gloria, E. La microalga colonial *Botryococcus braunii* como biorefinería sustentable de energía. Comunicación Personal.
- Nagano, S., Yamamoto, S., Nagakubo, M., Atsumi, K., & Watanabe, M. M. (2012). Physical properties of hydrocarbon oils produced by *Botryococcus braunii*: Density, kinematic viscosity, surface tension, and distillation properties. *Procedia Environmental Sciences*, 15, 73-79.
- Nakahira-Yanaka, Y., Ioki, M., Ohkoshi, M., Nakajima, N. & Watanabe, M. (2014). Herbicide-resistant mutants of *Botryococcus braunii* race B (strain BOT-22). *Journal of applied phycology*, 26, 25-28.
- Nakamura, H., Matsunaga, S., Kawagishi, H., & Okada, S. (2016). Effects of 2-azahypoxanthine on extracellular terpene accumulations by the green microalga *Botryococcus braunii*, race B. *Algal research*, 20, 267-275.



- Nakamura, H., Shiozaki, T., Gonda, N., Furuya, K., Matsunaga, S., & Okada, S. (2017). Utilization of ammonium by the hydrocarbon-producing microalga, *Botryococcus braunii* Showa. *Algal research*, 25, 445-451.
- Niehaus, T.D., Kinison, S., Okada, S., Yeo, Y., Bell, S.A., Cui, P., Devarenne, T.P., & Chappell, J. (2012). Functional identification of triterpene methyltransferases from *Botryococcus braunii* race B. *Journal of biological chemistry*, 287, 8163-8173.
- Niehaus, T.D., Okada, S., Devarenne, T.P., Watt, D.S., Sviripa, V. & Chappell, J. (2011). Identification of unique mechanisms for triterpene biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108, 12260-12265.
- Nojima, D., Ishizuka, Y., Muto, M., Ujira, A., Kodama, F., Yoshino, T.,... & Tanaka, T. (2017). Enhancement of Biomass and Lipid Productivities of Water Surface-Floating Microalgae by Chemical Mutagenesis. *Marine drugs*, 15, 151.
- Okada, S., Devarenne, T. P., & Chappell, J. (2000). Molecular characterization of squalene synthase from the green microalga *Botryococcus braunii*, race B. *Archives of biochemistry and biophysics*, 373, 307-317.
- Okada, S., Devarenne, T.P., Murakami, M., Abe, H. & Chappell, J. (2004). Characterization of botryococcene synthase enzyme activity, a squalene synthase-like activity from the green microalga *Botryococcus braunii*, Race B. *Archives of biochemistry and biophysics*, 422, 110-118.
- Okada, S., Matsuda, H., Murakami, M., & Yamaguchi, K. (1996). Botryoxanthin A, a member of a new class of carotenoids from the green microalga *Botryococcus braunii* Berkeley. *Tetrahedron Letters*, 37, 1065-1068.
- Okada, S., Murakami, M., & Yamaguchi, K. (1995). Hydrocarbon composition of newly isolated strains of the green microalga *Botryococcus braunii*. *Journal of applied phycology*, 7, 555-559.
- Okada, S., Tonegawa, I., Matsuda, H., Murakami, M., & Yamaguchi, K. (1997). Braunixanthins 1 and 2, new carotenoids from the green microalga *Botryococcus braunii*. *Tetrahedron*, 53, 11307-11316.
- Okada, S., Tonegawa, I., Matsuda, H., Murakami, M., & Yamaguchi, K. (1998). Botryoxanthin B and  $\alpha$ -botryoxanthin A from the green microalga *Botryococcus braunii* Kawaguchi-1. *Phytochemistry*, 47, 1111-1115.

- Ortiz-Montoya, E. Y., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Perego, P., Converti, A., & de Carvalho, J. C. M. (2014). Production of *Chlorella vulgaris* as a source of essential fatty acids in a tubular photobioreactor continuously fed with air enriched with CO<sub>2</sub> at different concentrations. *Biotechnology progress*, *30*, 916-922.
- Ozkan, A., Kinney, K., Katz, L., & Berberoglu, H. (2012). Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor. *Bioresource technology*, *114*, 542-548.
- Rao, A. R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T. R., & Ravishankar, G. A. (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource technology*, *98*, 560-564.
- Rao, A. R., Ravishankar, G. A., & Sarada, R. (2012). Cultivation of green alga *Botryococcus braunii* in raceway, circular ponds under outdoor conditions and its growth, hydrocarbon production. *Bioresource technology*, *123*, 528-533.
- Razzak, S. A., Ilyas, M., Ali, S. A. M., & Hossain, M. M. (2015). Effects of CO<sub>2</sub> concentration and pH on mixotrophic growth of *Nannochloropsis oculata*. *Applied biochemistry and biotechnology*, *176*, 1290-1302.
- Ruangsomboon, S. (2012). Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. *Bioresource technology*, *109*, 261-265.
- Ruangsomboon, S., Prachom, N., & Sornchai, P. (2017). Enhanced growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* KMITL 2 by optimum carbon dioxide concentration and concentration-dependent effects on its biochemical composition and biodiesel properties. *Bioresource technology*, *244*, 1358-1366.
- Sachdeva, N., Gupta, R. P., Mathur, A. S., & Tuli, D. K. (2016). Enhanced lipid production in thermo-tolerant mutants of *Chlorella pyrenoidosa* NCIM 2738. *Bioresource technology*, *221*, 576-587.
- Saga, K., Hasegawa, F., Miyagi, S., Atobe, S., Okada, S., Imou, K., ... & Yamagishi, T. (2015). Comparative evaluation of wet and dry processes for recovering hydrocarbon from *Botryococcus braunii*. *Applied energy*, *141*, 90-95.

- Sarayloo, E., Tardu, M., Unlu, S.Y., Simsek, S., Cevahir, G., Erkey, C. & Kavakli, I.H. (2017). Understanding lipid metabolism in high-lipid-producing *Chlorella vulgaris* mutants at the genome-wide level. *Algal research*, 28, 244-252.
- Sato, Y., Ito, Y., Okada, S., Murakami, M., & Abe, H. (2003). Biosynthesis of the triterpenoids, botryococenes and tetramethylsqualene in the B race of *Botryococcus braunii* via the non-mevalonate pathway. *Tetrahedron letters*, 44, 7035-7037.
- SENER. (2017). Balance Nacional de Energía 2016. México: *Secretaría de Energía*. Recuperado de: <https://www.gob.mx/sener/documentos/balance-nacional-de-energia> .
- Sivaramakrishnan, R., & Incharoensakdi, A. (2017). Enhancement of lipid production in *Scenedesmus* sp. by UV mutagenesis and hydrogen peroxide treatment. *Bioresource technology*, 235, 366-370.
- Talukdar, J., Kalita, M. C., & Goswami, B. C. (2013). Characterization of the biofuel potential of a newly isolated strain of the microalga *Botryococcus braunii* Kützing from Assam, India. *Bioresource technology*, 149, 268-275.
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., & Zhong, J. (2011). CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresource technology*, 102, 3071-3076.
- Tasić, M. B., Pinto, L. F. R., Klein, B. C., Veljković, V. B., & Maciel Filho, R. (2016). *Botryococcus braunii* for biodiesel production. *Renewable and sustainable energy reviews*, 64, 260-270.
- Tatli, M., Naik, M. T., Okada, S., Dangott, L. J., & Devarenne, T. P. (2017). Isolation and Characterization of Cyclic C<sub>33</sub> Botryococenes and a Trimethylsqualene Isomer from *Botryococcus braunii* Race B. *Journal of natural products*, 80, 953-958.
- Thapa, H. R., Naik, M. T., Okada, S., Takada, K., Molnár, I., Xu, Y., & Devarenne, T. P. (2016). A squalene synthase-like enzyme initiates production of tetraterpenoid hydrocarbons in *Botryococcus braunii* Race L. *Nature communications*, 7, 11198.
- Tsutsumi, S., Saito, Y., Matsushita, Y., & Aoki, H. (2018). Effect of mechanical pretreatment on hydrocarbon extraction from concentrated wet hydrocarbon-rich microalga, *Botryococcus braunii*. *Energy & fuels*, 32, 1761-1770.

- Uchida, H., Sumimoto, K., Ferriols, V. M. E., Imou, K., Saga, K., Furuhashi, K., ... & Okada, S. (2015). Isolation and characterization of two squalene epoxidase genes from *Botryococcus braunii*, Race B. *PloS one*, *10*, e0122649.
- Umen, J. G., & Goodenough, U. W. (2001). Control of cell division by a retinoblastoma protein homolog in *Chlamydomonas*. *Genes & development*, *15*, 1652-1661.
- Ummalyma, S. B., Gnansounou, E., Sukumaran, R. K., Sindhu, R., Pandey, A., & Sahoo, D. (2017). Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae—An overview. *Bioresource technology*, *242*, 227-235
- Vigeolas, H., Duby, F., Kaymak, E., Niessen, G., Motte, P., Franck, F., & Remacle, C. (2012). Isolation and partial characterization of mutants with elevated lipid content in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus*. *Journal of biotechnology*, *162*, 3-12.
- Volkman, J. K. (2014). Acyclic isoprenoid biomarkers and evolution of biosynthetic pathways in green microalgae of the genus *Botryococcus*. *Organic geochemistry*, *75*, 36-47.
- Vu, C. H. T., Lee, H. G., Chang, Y. K., & Oh, H. M. (2017). Axenic cultures for microalgal biotechnology: Establishment, assessment, maintenance, and applications. *Biotechnology advances*, *36*, 380–396.
- Weiss, T. L., Roth, R., Goodson, C., Vitha, S., Black, I., Azadi, P., ... & Goodenough, U. (2012). Colony organization in the green alga *Botryococcus braunii* (Race B) is specified by a complex extracellular matrix. *Eukaryotic cell*, EC-00184.
- Wijihastuti, R. S., Moheimani, N. R., Bahri, P. A., Cosgrove, J. J., & Watanabe, M. M. (2017). Growth and photosynthetic activity of *Botryococcus braunii* biofilms. *Journal of applied phycology*, *29*, 1123-1134.
- Wolf, F.R., Nemethy, E.K., Blanding, J.H. & Bassham, J. A. (1985). Biosynthesis of unusual acyclic isoprenoids in the alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, *24*, 733-737.
- World Bank Group. (2018). Consumo de energía procedente de combustibles fósiles (% del total). Recuperado de: <https://datos.bancomundial.org/indicador/EG.USE.COMM.FO.ZS?end=2015&locations=MX&start=1971> .
- Xu, L., Liu, R., Wang, F., & Liu, C. Z. (2012). Development of a draft-tube airlift bioreactor for *Botryococcus braunii* with an optimized inner structure using computational fluid dynamics. *Bioresource technology*, *119*, 300-305.

- Xu, L., Wang, S.K., Wang, F., Guo, C. & Liu, C.Z. (2014). Improved biomass and hydrocarbon productivity of *Botryococcus braunii* by periodic ultrasound stimulation. *BioEnergy research*, 7, 986-992.
- Yamamoto, S., Mandokoro, Y., Nagano, S., Nagakubo, M., Atsumi, K., & Watanabe, M. M. (2014). Catalytic conversion of *Botryococcus braunii* oil to diesel fuel under mild reaction conditions. *Journal of applied phycology*, 26, 55-64.
- Yildiz-Ozturk, E., & Yesil-Celiktas, O. (2017). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of hydrocarbons from *Botryococcus braunii* as a promising bioresource. *The journal of supercritical fluids*, 130, 261-266.
- Yildiz-Ozturk, E., Ilhan-Ayisigi, E., Togtema, A., Gouveia, J., & Yesil-Celiktas, O. (2018). Effects of hydrostatic pressure and supercritical carbon dioxide on the viability of *Botryococcus braunii* algae cells. *Bioresource technology*, 256, 328-332.
- Yoshimura, T., Okada, S., & Honda, M. (2013). Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: Optimal CO<sub>2</sub>, salinity, temperature, and irradiance conditions. *Bioresource technology*, 133, 232-239.
- Zhang, H., Wang, W., Li, Y., Yang, W., & Shen, G. (2011). Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*. *Biomass and bioenergy*, 35, 1710-1715.
- Zhang, Q., Chang, C., Bai, J., Fang, S., Zhuang, X., & Yuan, Z. (2018). Mutants of *Scenedesmus* sp. for purifying highly concentrated cellulosic ethanol wastewater and producing biomass simultaneously. *Journal of applied phycology*, 30, 969-978.
- Zhang, Y., He, M., Zou, S., Fei, C., Yan, Y., Zheng, S., ... & Wang, C. (2016). Breeding of high biomass and lipid producing *Desmodesmus* sp. by Ethylmethane sulfonate-induced mutation. *Bioresource technology*, 207, 268-275.
- Zheng, H., Gao, Z., Yin, J., Tang, X., Ji, X., & Huang, H. (2012). Harvesting of microalgae by flocculation with poly ( $\gamma$ -glutamic acid). *Bioresource technology*, 112, 212-220.
- Zhuang, X., & Chappell, J. (2015). Building terpene production platforms in yeast. *Biotechnology and bioengineering*, 112, 1854-1864.
- Zuppini, A., Gerotto, C. & Baldan, B. (2010). Programmed cell death and adaptation: two different types of abiotic stress response in a unicellular chlorophyte. *Plant cell physiology* 51, 884-895.