

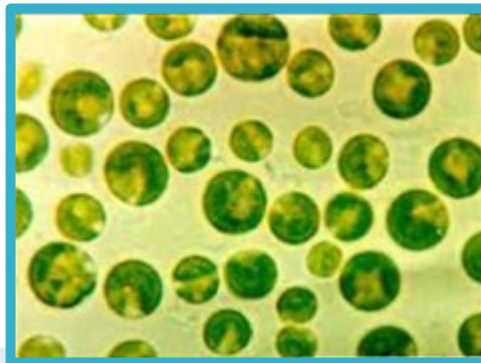
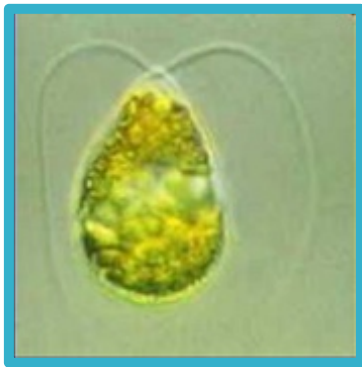
Detección de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos de la microalga *Botryococcus braunii*

Hernán Vera, Manuel Zapata A., David S. Holmes, Carlos Riquelme, Mariella Rivas A.

Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile.
2012

Introducción

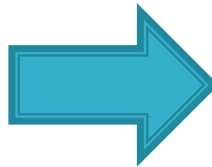
Las microalgas son microorganismos fotosintéticos capaces de vivir en amplio rango de condiciones. Estas son de gran interés industrial por su elevada capacidad de síntesis de compuestos con potencial comercial, dentro de ellos se encuentra el Biodiesel.



Introducción

El potencial de las microalgas, como productoras de Biodiesel radica en :

- ▶ Altos contenidos de compuestos lipídicos.
(40% – 75% de peso seco asociado a lípidos).
- ▶ Una elevada tasa de crecimiento
(tasa de duplicación de 2–5 días)
- ▶ Espacio y tiempo de cultivo menor
- ▶ Cultivo independiente de zona geográfica y época estacional
- ▶ Sistema de cultivo adaptable a otra fuente de energía para disminuir el impacto ambiental (TERMOELECTRICA).



Introducción

Materia prima	Productividad De Biodiesel (L/ha/año)	Superficie equivalente requerida (ha x 10 ⁶)	Porcen equivaler la superficie fértil requerida	(no necesariamente fértil) requerida
Palma	5,950	3.972	16.14	--
Jatropha	1,892	12.490	50.75	6.43
Colza	1,190	19.859	80.69	--
Girasol	952	24.823	100.9	--
Soya	446	52.986	215.3	--
Microalgas ^a	12,000	1.969	8.00	1.01
Microalgas ^b	20,000	1.181	4.80	0.61

^aRendimiento conservador de productividad de biodiesel microalgal acorde con Schenk *et al.* (2008).

^bProductividad de biodiesel microalgal asequible a través de la tecnología actualmente disponible, acorde con Wijffels (2008).



<i>Botryococcus braunii</i> var. A ^{2,5}	43.0 – 63.0
<i>Botryococcus braunii</i> var. B ^{2,5}	53.0 – 86.0

Especie	%Contenido lipídico (gLípidos/gPeso-seco x100)	Especie	%Contenido lipídico (gLípidos/gPeso-seco x100)
			49.1
			7.1 – 47.0
			20.0 – 72.2
			39.3 – 40.0
<i>Chaetoceros gracilis</i> ²	46.0	<i>Nannochloris</i> sp. ^{1,8}	20.0 – 47.8
<i>Characium polymorphum</i> ²	42.0	<i>Nannochloropsis salina</i> ⁸	40.8 – 72.2
<i>Chlamydomonas applanata</i> ²	32.8	<i>Nannochloropsis</i> sp. ^{1,9}	28.7 – 68.0
<i>Chlorella emersonii</i> ^{9,10}	63.0	<i>Naviculla pelliculosa</i> ^{2,8}	22.0 – 44.8
<i>Chlorella minutissima</i> ^{9,10}	57.0	<i>Neochloris oleoabundans</i> ^{2,3}	18.9 – 88.8
<i>Chlorella protothecoides</i> ¹⁰	23.0	<i>Nitzschia laevis</i> ¹⁰	69.1
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> ^{2,8}	14.4 – 35.8	<i>Nitzschia pelea</i> Kutz ^{2,8}	27.2 – 39.5
<i>Chlorella sorokiana</i> ^{9,10}	22.0	<i>Nitzschia</i> sp. ^{1,4}	22.1 – 47.0
<i>Chlorella</i> sp. ¹	28.0 – 32.0	<i>Ochromonas danica</i> ^{2,8}	39.0 – 71.0
<i>Chlorella vulgaris</i> ⁹	5.1 – 56.0	<i>Oocystis polymorpha</i> ²	34.7
<i>Chlorococcum oleofaciens</i> ²	44.3	<i>Parietochloris incisa</i> ¹⁰	62.0
<i>Chlorosarcinopsis nagevensis</i> ²	32.2	<i>Ourococcus</i> sp. ^{2,8}	27.0 – 49.5
<i>Chroomonas salina</i> ⁸	44.0	<i>Peridinium cinctum</i> fa. Westi ²	36.0
<i>Chrysochromulina kappa</i> ^{2,8}	32.6	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> ²	31.0
<i>Chrysochromulina polylepsis</i> ^{2,8}	47.6	<i>Protosiphon botryoides</i> ^{2,8}	37.0
<i>Cosmarium laeve</i> ^{2,8}	15.0 – 33.0	<i>Prymnesium parvum</i> ^{2,8}	22.0 – 38.2
<i>Cryptocodinium cohnii</i> ¹	20.0	<i>Radiosphaera nagevensis</i> ^{2,8}	43.0
<i>Cyclotella cryptica</i> ²	36.8	<i>Scenedesmus dimorphus</i> ^{2,4,9}	6.0 – 40.0
<i>Cyclotella</i> sp. ²	54.0	<i>Scenedesmus obliquus</i> ⁹	11.0 – 55.0
<i>Cylindrotheca</i> sp. ¹	16.0 – 37.0	<i>Scotiella</i> sp. ^{2,8}	34.5 – 48.0
<i>Dunaliella primolecta</i> ^{1,2,8}	23.0 – 53.8	<i>Schizochytrium</i> sp. ¹	50.0 – 77.0
<i>Dunaliella salina</i> ^{2,4,8}	9.2 – 47.2	<i>Skeletonema costatum</i> ²	30.3
<i>Euglena gracilis</i> ²	55.0	<i>Stichococcus bacillaris</i> ²	38.9
<i>Hantzschia</i> sp. ²	61.0	<i>Tetraselmis sueica</i> ¹	15.0 – 23.0

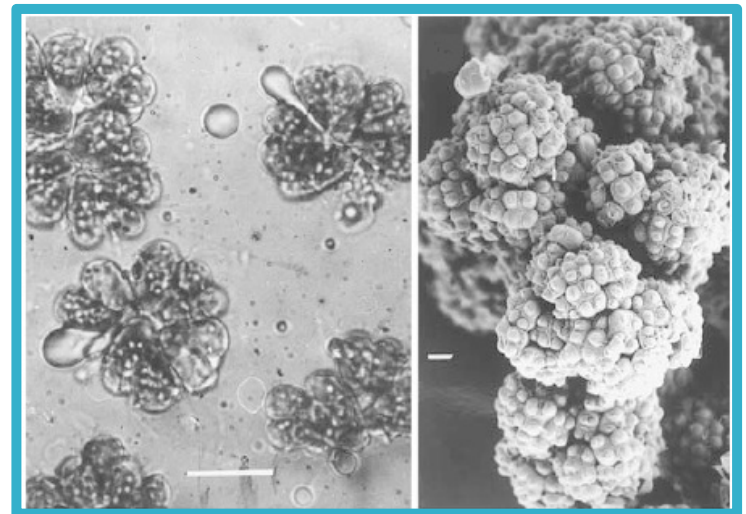
¹Chisti, 2007; ²Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; ³Gatenby *et al.*, 2003; ⁴Ben-Amotz *et al.*, 1985; ⁵Metzger & Largeau, 2005; ⁶Sheehan *et al.*, 1998; ⁷Vázquez-Duhalt & Greppin, 1987; ⁸Cohen, 1986; ⁹Gouveia & Oliveira, 2009; ¹⁰Li *et al.*, 2008.

Botryococcus braunii

Es una Microalga colonial de agua dulce, con un alto contenido de lípidos en relación a su peso seco.

Clasificada en 3 diferentes razas, según la composición química de sus lípidos (A-B-L).

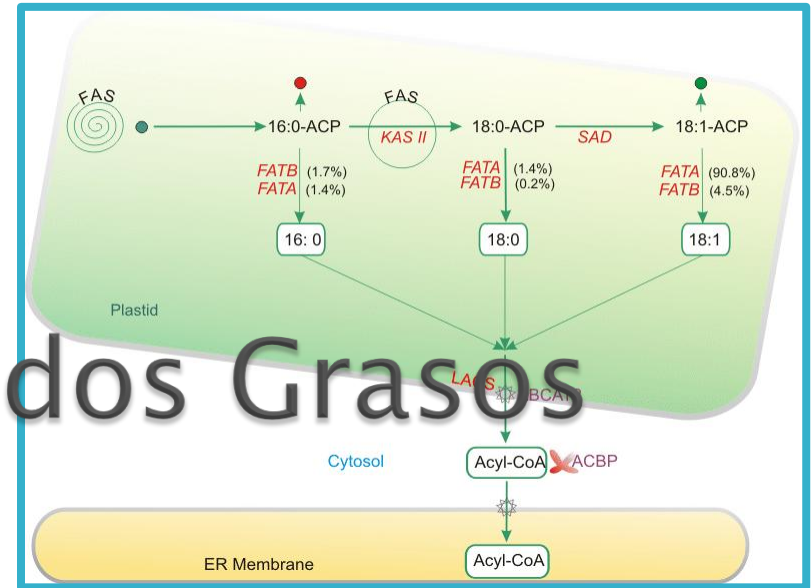
Utilizada también en la remediación de aguas residuales.



Botryococcus braunii

- ▶ Cada raza tiene diferentes cualidades y cantidad de lípidos de interés.

Compound	Race A			Race B	Race L
	Bolivia (Overjuyo)	UK (Maddingley)	Morocco (Oukaimden)	Martinique (La Manzo)	Ivory Coast (Yamoussoukro)
Total lipids	62	63	43	53	35
Hydrocarbons	0.4	9	20	32	3
Ether lipids	35	5	n.d.	0.2	13
Epoxides	n. d	4	n.d.	1	0.6
Triacylglycerols	2	6	n.d.	n.d.	n.d.
Sterols	n. d	0.1	n.d.	0.2	0.2



Metabolismo Ácidos Grasos

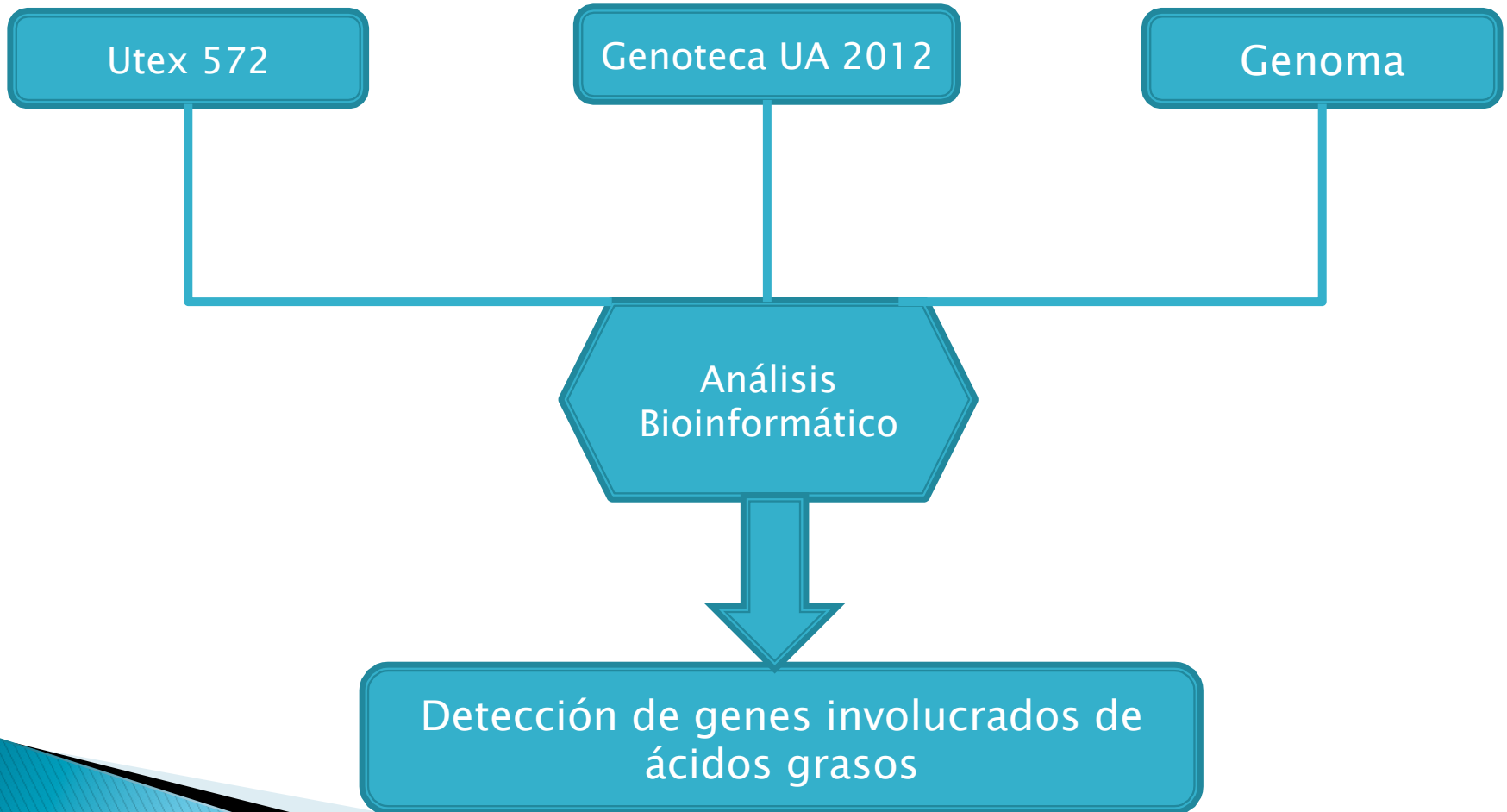


Objetivos

Predecir genes de las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de ácidos grasos.



Metodología



Resultados

Biosíntesis de Ácidos grasos	E-Value	Identidad	Hit
3 oxoacyl [ACP] Synthase 1	3e-114	49%	Algoriphagus
3 oxoacyl [ACP] Synthase 2	1e-132	62%	Bacillus sub.
3 oxoacyl [ACP] Reductase	9e-69	51%	Bacillus sub.
3R hydroxymyristoyl [ACP] Dehydrase	1E-59	62%	Mucilaginibacter
Acetyl-CoA Carboxylase subunit alpha	9e-143	63%	Mucilaginibacter
Acetyl-CoA Carboxylase subunit biotin	8E-169	63%	Mucilaginibacter
Enoyl [ACP] Reductase	8E-35	34%	Mucilaginibacter
Malonyl -CoA acyl Transferase	2E-77	44%	Mucilaginibacter
Oleoyl [ACP] Thioesterase	2E-18	43%	Coccomyxa sub
Stearoyl Desaturase (ω -9)	5E-116	62%	Coccomyxa sub.
Metabolismo de Glicerolipidos	E-value	Identidad	Hit
Alpha Galactosidase	3e-77	41%	Medicago tru.
Glycerate Kinase	3e-21	54%	Chlorella var.
Diacylglycerol Acyltransferase	7e-73	63%	Coccomyxa sub.

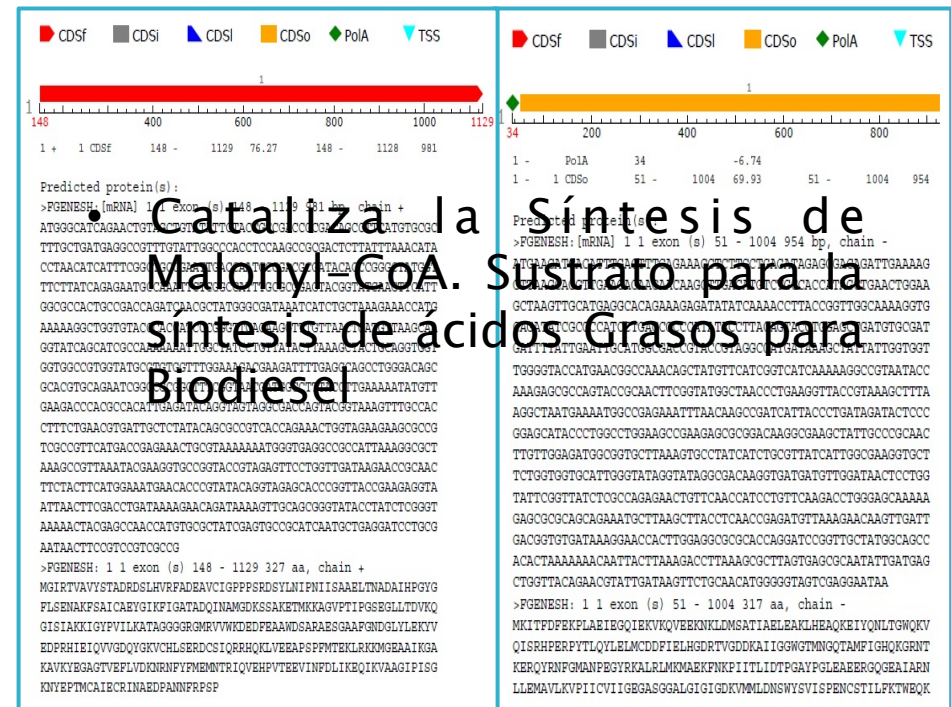
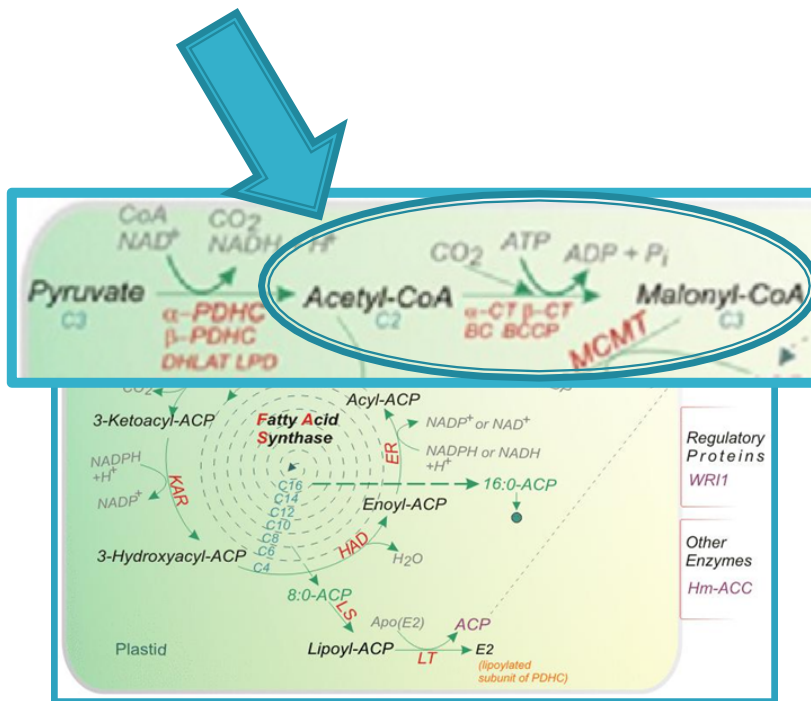
Resultados

Síntesis de ácidos grasos insaturados	E-Value	Identidad	Hit
Fatty acids Desaturase (ω 3 - 6)	1e-47 , 1e-45	40% , 47%	Ricinus com
Long chain acyl-CoA Synthase	9e-40	68%	Coccomyxa
Trans-2-enoyl-CoA Reductase	4E-44	68%	Coccomyxa
3-hydroxy acyl-CoA Dehydratase	3E-63	62%	Coccomyxa

Elongación de Ácidos grasos	E-Value	Identidad	Hit
3-hidroxy acyl-CoA Dehydratase	3e-63	62%	Coccomyxa
3-ketoacyl-CoA Synthase	4e-40	73%	Coccomyxa
Beta-ketoacyl Reductase	5e-67	52%	Pinus tae.
Elongation of very long... (ELOVL)	1e-35	68%	Coccomyxa
Enoyl-CoA Reductase	4e-44	68%	Coccomyxa
Palmitoyl Thioesterase	1e-22	46%	Coccomyxa

Posibles Genes de Interés

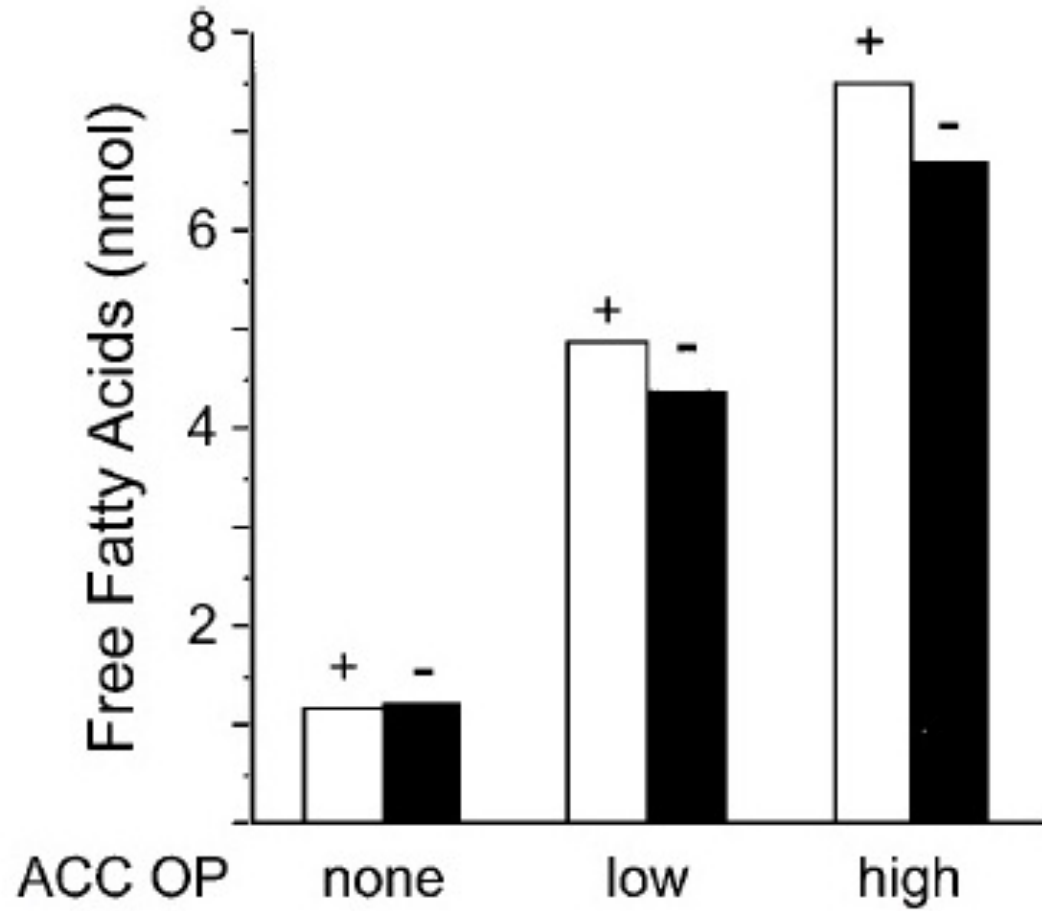
► Acetyl-CoA Carboxylasa:



Posibles Genes de Interés

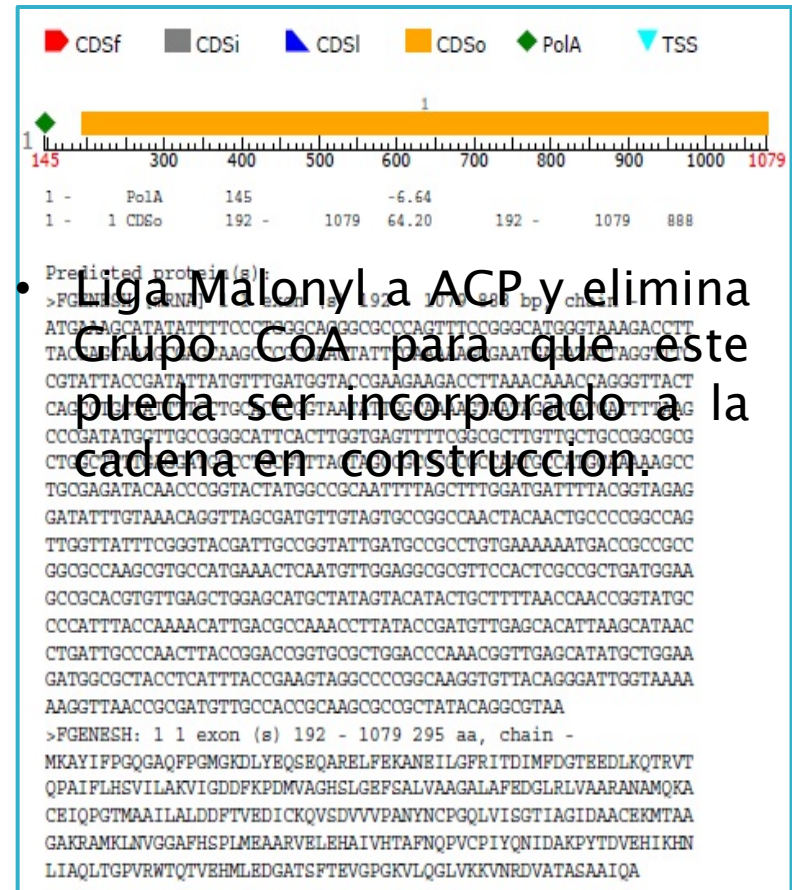
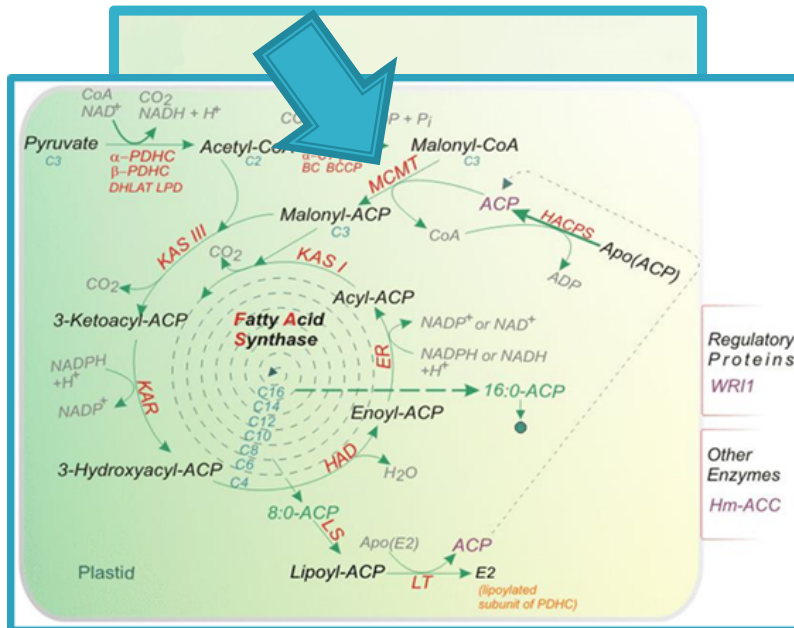
Posible Modificación

Estudios en *E. coli* demuestran que la sobreexpresión de esta enzima puede lograr un aumento de 6 veces en la concentración de ácidos grasos. (Mark S. Davis et al. 2000)



Posibles Genes de Interés

▶ Malonyl-ACP Transferasa:

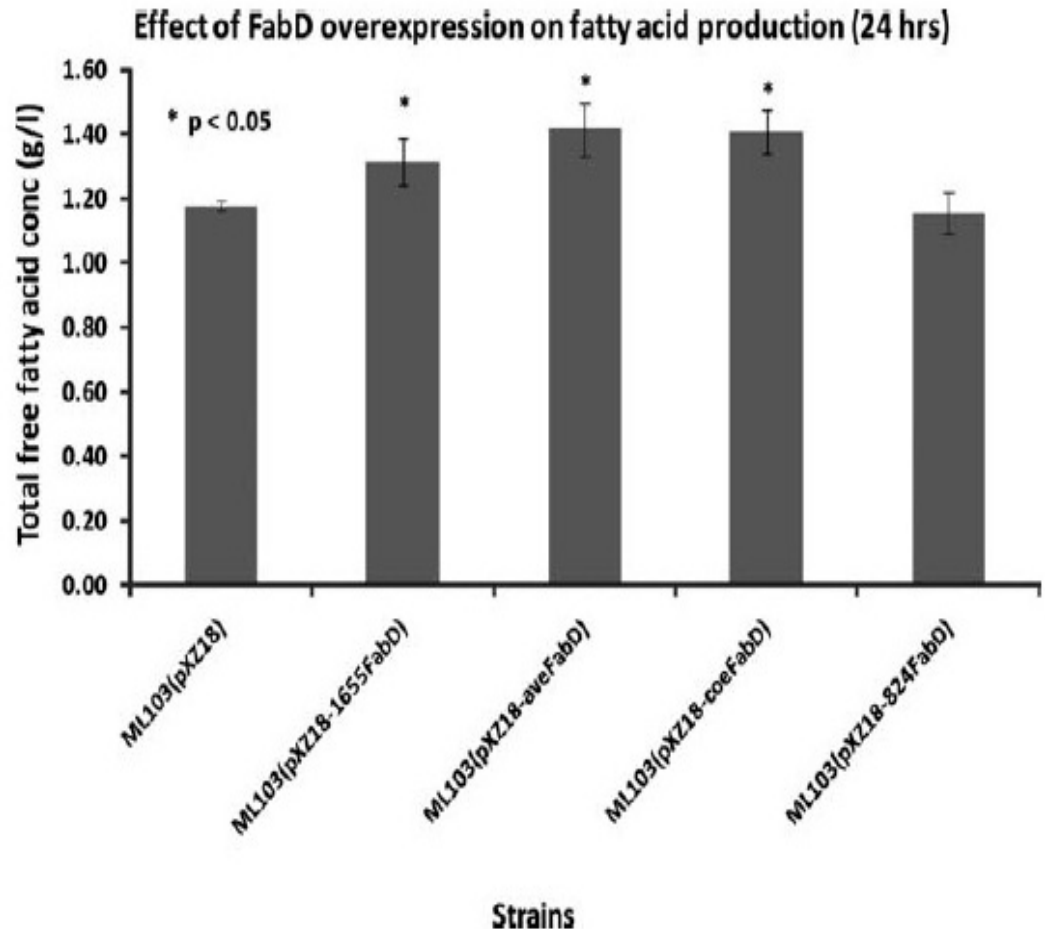


- Liga Malonyl a ACP y elimina Grupo CoA para que este pueda ser incorporado a la cadena en construcción.

Posibles Genes de Interés

Posible Modificación:

La sobreexpresión en E.coli de esta enzima de 3 diferentes bacterias, realzó la producción de Ácidos grasos en un 11%.
(Xiujun Zhang, 2011)



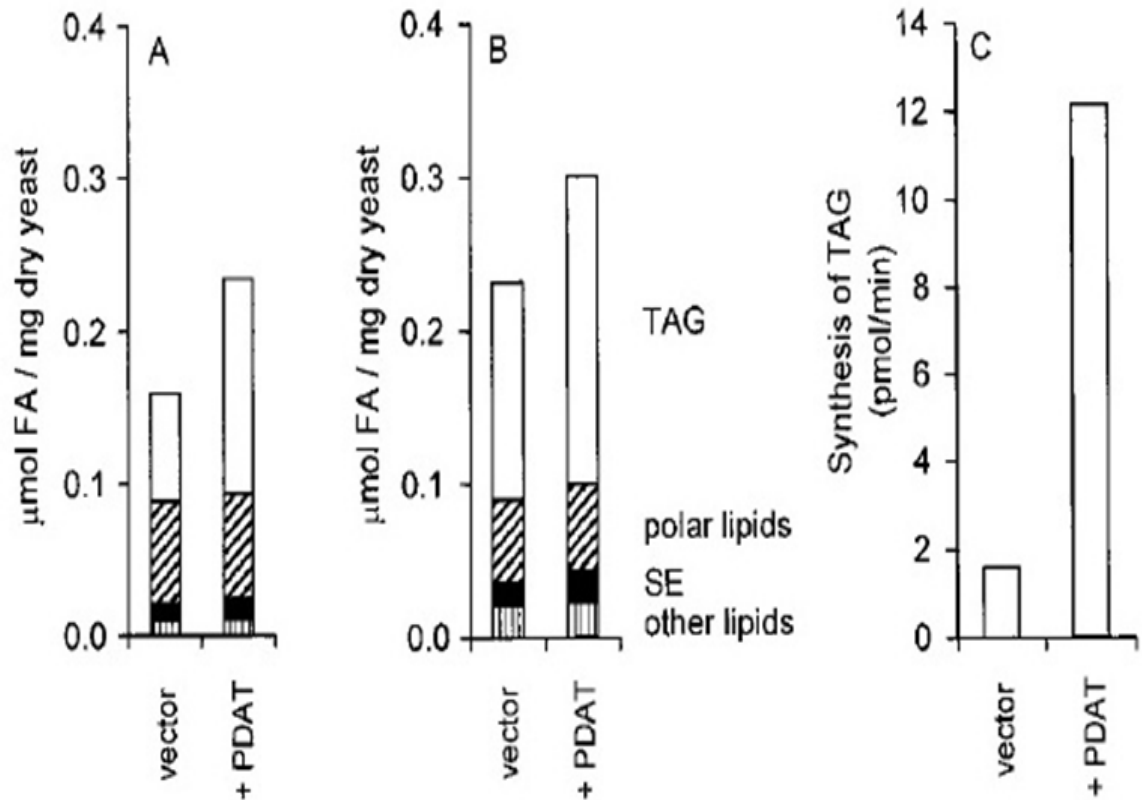
Cataliza la Reducción de S-cetoacyl-ACP a S-hydroxyacyl-ACP, en presencia de NADPH como agente reductor, paso esencial para la síntesis de ácidos grasos

Possible Modification:
Estudios en Brassica napus muestra que ejerce una gran influencia en la acumulación de compuestos oleaginosos
(Harwood, J.L. 2005)

Predicted protein(s):
>FGENESH: [mRNA] 1 4 exon (s) 425 - 1554 196 bp, chain -
un 29 a 47% el
contenido lipídico.
(Anders Dahlqvist et al, 2000)

Posibles Genes de Interés

Posible modificación:
Sobreexpresión en levadura
aumenta entre un 29 a 47%
el contenido lipidico. (Anders
Dahlqvist, et al. 2000)



Conclusión y Proyecciones

La Predicción de genes, nos permite dar el primer paso para la modificación genética de esta microalga.

Esto puede significar un gran avance en la producción de Biodiesel a través de microalgas en el norte de Chile.



Gracias