





## RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL

### DATOS DEL/ DE LA DOCTORANDO/A:

Apellidos y nombre: León Vaz, Antonio	NIF/ Pasaporte: [REDACTED]	Nacionalidad: [REDACTED]
Dirección a efectos de notificaciones: [REDACTED]		
Teléfono: [REDACTED]	[REDACTED]	
[REDACTED]		

### DATOS DE LA TESIS DOCTORAL:

Título: Aplicaciones biotecnológicas y medioambientales de la microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>
Programa Oficial de Doctorado al que se adscribe: Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental
Departamento: Departamento de Química "Prof José Carlos Vilchez Martín"
Director/es: Dr./Dra.: Javier Vígara Fernández  ORCID: 0000-0002-2617-5410 Dr./Dra.: Rosa León Bañares  ORCID: 0000-0002-6243-6454
Resumen en <b>castellano</b> que será usado para la base de datos del Ministerio TESEO (máx. 4000 caracteres) Las microalgas son un grupo heterogéneo de microorganismos unicelulares fotosintéticos que poseen un gran interés como potenciales fijadores de CO <sub>2</sub> , productores de biocombustibles, o para la producción de compuestos de alto valor añadido. Además, algunas especies de microalgas pueden utilizar residuos agroindustriales como nutrientes y tolerar altas concentraciones de contaminantes, como los metales pesados, lo que las convierte en sistemas muy prometedores para bioremediación. En la presente Tesis doctoral se lleva a cabo un estudio de las diferentes aplicaciones biotecnológicas y medioambientales que posee la microalga clorofita <i>Chlorella sorokiniana</i> , una especie robusta y capaz de crecer con una alta tasa de crecimiento, incluso en condiciones adversas. Así, en el <b>Capítulo 3</b> se muestra como la microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> puede cultivarse en condiciones mixotróficas utilizando varios residuos industriales y se optimiza su cultivo en un reactor de 2 L en modo discontinuo con lías oxidadas de la industria vinícola, que resultaron ser la mejor fuente de carbono entre todas las testadas permitieron obtener altas productividades de biomasa (11,0 g L <sup>-1</sup> ) y lípidos neutros (38% DW). El <b>Capítulo 4</b> se inicia estudiando el efecto de metales pesados y metaloides, como el cobre, el cadmio y el arsénico (en sus estados de oxidación III y V), sobre el crecimiento, la asimilación de nitrógeno de <i>Chlorella sorokiniana</i> , así como sobre la capacidad de acumulación intracelular de dichos elementos, siendo el cadmio el elemento acumulado en mayor cantidad. A continuación, se muestra el efecto de los metales pesados sobre los niveles de expresión génica y de actividad enzimática de varias enzimas antioxidantes, y enzimas de la ruta de asimilación del nitrógeno y el azufre, observándose que, en general, la mayor parte de estas enzimas se inducen en presencia del metal. Finalmente, se presenta un estudio proteómico cuantitativo que compara la expresión de diferentes proteínas de <i>Chlorella sorokiniana</i> en presencia y ausencia de cadmio. Este estudio muestra que ciertas rutas metabólicas, como la fotosíntesis, la fosforilación oxidativa, la glucólisis o la biosíntesis de proteínas ribosomales se encuentran inhibidas en presencia de cadmio. Sin embargo, otras rutas como la fotorrespiración, las enzimas antioxidantes, la gluconeogénesis, la asimilación de nitrógeno y azufre o la biosíntesis de ciertos aminoácidos, se encuentran inducidas en las mismas condiciones. En el <b>Capítulo 5</b> se describe la optimización de la transformación nuclear de <i>Chlorella sorokiniana</i> mediante electroporación, utilizando diferentes promotores heterólogos. Entre ellos, el que proporcionaba mayor eficiencia de la transformación y mejor expresión, tanto a nivel génica como de proteínas, fue el promotor <i>CaMV 35S</i> . Además, se muestra el desarrollo un método de criopreservación a -80 °C, utilizando etilenglicol al 5% v/v como criopreservante. Este método permite mantener la viabilidad celular de los transformantes obtenidos durante periodos de 365 días. Finalmente, el en <b>Capítulo 6</b> , se compara el perfil aminoácido de 57 microalgas pertenecientes a 7 <i>phyla</i> y 38 <i>genera</i> , entre las que se incluye <i>Chlorella sorokiniana</i> . En el estudio se analizan tanto los aminoácidos estructurales como los aminoácidos libres. Se han determinado 17 aminoácidos mediante GC-MS, siendo mayoritarios, de manera general, glutamato/glutamina y aspartato/asparagina. Por otro lado, el <i>phylum</i> <i>miozoa</i> y las microalgas <i>Ochromonas sp.</i> y <i>Chroomonas salina</i> presentaron mayor contenido en aminoácidos esenciales y, por tanto, mayor valor nutricional. Además, se ha conseguido establecer una relación entre el perfil de aminoácidos libres y el grupo taxonómico al que pertenecen las especies estudiadas.
Resumen en <b>inglés</b> que será usado para la base de datos del Ministerio TESEO (máx. 4000 caracteres) Microalgae are a heterogeneous group of unicellular and photosynthetic microorganisms with high interest as potential CO <sub>2</sub> fixer organisms, producers of biofuel or to obtain high value compounds. Moreover, some microalgae can use industrial wastewaters as nutrients or tolerate high concentrations of contaminants, such as heavy metals. Subsequently creating the potential to be bioremediation systems. In the present doctoral thesis,



the different biotechnological and environmental applications of the chlorophyte microalga *Chlorella sorokiniana* are studied. This microalga not only has a high growth rate, but also is a robust species able to grow under adverse conditions. Thus, Chapter 3 shows that the microalga *Chlorella sorokiniana* can grow in mixotrophic cultures using different industrial wastes and its culture in a fed-batch 2 L bioreactor is optimized using wine waste lees, the best carbon source. This allows to get a high productivity in biomass (11.0 g L<sup>-1</sup>) and neutral lipids (38% DW) terms. In Chapter 4 the effect that heavy metals and metalloids, such as copper, cadmium or arsenic (III and V), produced in growth, nitrogen assimilation and intracellular accumulation of these elements in *Chlorella sorokiniana* is studied, being the highest values of accumulation cadmium ones. Moreover, the effect that these heavy metals produce in gene expression and enzymatic activity levels in different antioxidant enzymes or enzymes involved nitrogen and sulphur assimilation, are tested, showing a general upregulation for most of these enzymes. Finally, a quantitative proteomic approach that compares the expression of *Chlorella sorokiniana* proteins with or without cadmium in the culture media is performed. The results enable us to conclude that different metabolic pathways, such as photosynthesis, oxidative phosphorylation, glycolysis or ribosomal proteins biosynthesis are downregulated with cadmium in the culture medium. However, other pathways, such as photorespiration, antioxidant enzymes, gluconeogenesis, nitrogen and sulphur assimilation or biosynthesis of some amino acids are upregulated under the same conditions. In Chapter 5 the optimization of an electroporation method for nuclear transformation in the microalga *Chlorella sorokiniana* is described. For this method, different heterologous promoters were tested. The most efficient promoter for *Chlorella sorokiniana* is the CaMV 35S promoter, which allowed the highest efficiency and the highest gene and protein expression. Additionally, a cryopreservation method, at -80 °C, using ethylene glycol 5% v/v as cryopreservant and able to guarantee cell viability of transformants over 365 days, is developed. Finally, in Chapter 6, the aminoacidic profile of 57 microalgae belonging to 8 phyla and 38 genera, including *Chlorella sorokiniana*, is compared. This study analyses structural and free amino acids. 17 amino acids were determined by GC-MS, being the most common in almost all the species glutamate/glutamine and aspartate/asparagine. Moreover, miozoa, as phylum, and *Ochromonas* sp. and *Chroomonas salina*, as species, showed the highest essential amino acids content and, consequently, the highest nutritional value. Furthermore, a relationship is established between free amino acids profile and the taxonomic groups to which the strains belongs.

Palabras claves en **castellano** que deben coincidir con las enviadas a la base de datos TESEO (máx. 5 descriptores o palabras claves, separadas por coma)

Microalga, *Chlorella sorokiniana*, Residuos industriales, Biorremediación, Valor nutricional

Palabras claves en **inglés** que deben coincidir con las enviadas a la base de datos TESEO (máx. 5 descriptores o palabras claves, separadas por coma)

Microalgae, *Chlorella sorokiniana*, Industrial wastes, Biorremediation, Nutritional value

Materias UNESCO (seleccione, picando en [+], alguno de los campos, disciplinas o subdisciplinas que aparecen en la siguiente url: <http://rabida.uhu.es/dspace/page/unesco>)

2302 Bioquímica

**¿TESIS POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES?**  SI  NO (tachar lo que no proceda)

Algunas publicaciones, por respeto a los posibles conflictos de propiedad intelectual relativos a su difusión, serán sustituidas por referencia, resumen y DOI o enlace al artículo.

En Huelva, 21 de diciembre de 2020

Firma del interesado

Fdo. Antonio León Vaz