



# CARACTERIZACIÓN *IN SILICO* Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA DE LA ACETIL-COENZIMA A CARBOXILASA HETEROMÉRICA DE DOS MICROALGAS

## *In Silico* Characterization and Expression Analysis Of The Alpha Subunit Of The Heteromeric Acetyl-Coenzyme A Carboxylase From Two Microalgae

Juan C. CASTRO<sup>1\*</sup>, J. Dylan MADDOX<sup>2,3</sup>, Segundo L. ESTELA<sup>4</sup>, Hicler N. RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, María Z. CASUSO<sup>4</sup>, Jae D. PAREDES<sup>4</sup>, Mariana COBOS<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad Especializada de Biotecnología, Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Psje, Los Paujiles S/N, Iquitos, Perú.

<sup>2</sup>Pritzker Laboratory for Molecular Systematics and Evolution, The Field Museum of Natural History, 1400 S. Lake Shore Dr., Chicago, USA.

<sup>3</sup>Environmental Sciences, American Public University System, 111 W, Congress Street, Charles Town, USA.

<sup>4</sup>Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética, Universidad Científica del Perú, Av. Abelardo Quiñones km 2.5, Iquitos, Perú.

\*For correspondence: [juan.castro@unapiquitos.edu.pe](mailto:juan.castro@unapiquitos.edu.pe), [mcobos@ucp.edu.pe](mailto:mcobos@ucp.edu.pe)

Received: 6<sup>th</sup> September 2018, Returned for revision: 13<sup>th</sup> October 2018, Accepted: 4<sup>th</sup> January 2019.

Associate Editor: Caroline Turchetto.

Citation/Citar este artículo como: Castro JC, Maddox JD, Estela SL, Rodríguez HN, Casuso MZ, Paredes JD, Cobos M. Caracterización *in silico* y análisis de la expresión de la subunidad alfa de la acetil-coenzima a carboxilasa heteromérica de dos microalgas. Acta biol. Colomb. 2019;24(2): 275-290. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v24n2.74727>

### RESUMEN

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos con gran potencial para abastecer las demandas energéticas mundiales. Sin embargo, los limitados conocimientos que se tienen de estos organismos, en particular a nivel molecular de los procesos metabólicos, han limitado su uso con estos propósitos. En esta investigación se ha realizado el análisis *in silico* de la subunidad alfa de la acetil-Coenzima A carboxilasa heteromérica ( $\alpha$ ACCasa), una enzima clave en la biosíntesis de lípidos de las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Asimismo, se ha medido la expresión de este gen en ambas especies cultivadas en medios deficientes de nitrógeno. Los resultados indican que la  $\alpha$ ACCasa muestra conservación estructural y funcional en ambas especies de microalgas y su mayor similitud genética con otras especies de microalgas. Asimismo, se ha mostrado que el nivel de expresión del gen se incrementa significativamente cuando las microalgas son cultivadas en ausencia de nitrógeno, lo cual se relaciona a su vez con una mayor acumulación de lípidos microalgales. En conclusión, el análisis *in silico* de la  $\alpha$ ACCasa de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. presentan características estructurales, funcionales y evolutivas muy similares con otras especies de microalgas y plantas. Asimismo, el estudio revela que en ambas especies el gen se sobreexpresa cuando las microalgas son sometidas a estrés por deficiencia de nitrógeno, el cual se relaciona significativamente con la acumulación de lípidos totales en estas células.

**Palabras clave:** Biología computacional, estrés biológico, estructura molecular 3D, lipogénesis, transcripción genética.

### ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic microorganisms with great potential to supply the world's energy demands. However, the limited knowledge of these organisms, particularly at the molecular level of metabolic processes, has limited their use to these purposes. In this investigation, the *in silico* analysis of the alpha subunit of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase ( $\alpha$ ACCCase), a key enzyme in lipid biosynthesis of microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. was carried out. Also, the expression of this gene has been measured in both species cultivated in nitrogen-depleted media. Results indicate that  $\alpha$ ACCCase shows structural and functional conservation in both species of microalgae and their greater genetic similarity with other species of microalgae. Also, it has been shown that the expression levels of this gene are significantly increased when the microalgae are cultured in the absence of nitrogen,

which in turn is related to a greater accumulation of microalgal lipids. In conclusion, the *in silico* analysis of the *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp.  $\alpha$ ACCCase reveals structural, functional and evolutionary characteristics very similar to other microalgae and plant species. Also, the study reveals that in both species the gene is overexpressed when microalgae are subjected to nitrogen deficiency stress, which is significantly related to total lipids accumulation in these cells.

**Keywords:** Biological stress, computational biology, genetic transcription, 3D molecular structure, lipogenesis.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente las microalgas son consideradas una buena alternativa para satisfacer la creciente demanda de biocombustibles. Esto se atribuye a su alto contenido y productividad de triglicéridos (Shrivastav *et al.*, 2015). Asimismo, estos microorganismos fotosintéticos sintetizan diversas biomoléculas que pueden servir de materia prima para producir varios tipos de biocombustibles (Demirbas, 2010). Es decir, representan una fuente energética segura, sustentable, renovable y amigable con el ambiente (Garibay *et al.*, 2009) que no ponen en riesgo la seguridad alimentaria (Amaro *et al.*, 2011).

Diversos estudios han demostrado que el contenido de lípidos totales depende de las cepas de microalgas y de las condiciones de cultivo. De acuerdo con Chisti, (2007) el contenido de lípidos en microalgas oscila de 1 a 75 % de su peso seco, excepcionalmente algunas especies pueden acumular hasta el 90 % de su peso seco. Por otra parte, las microalgas acumulan lípidos, específicamente los triglicéridos (TG), cuando son cultivadas en condiciones estresantes debido a fluctuaciones extremas de los parámetros físicos (elevadas temperaturas, altas intensidades de iluminación, fotoperiodo, etc) y químicos (deficiencia de nutrientes, pH ácidos o alcalinos, medios hipersalinos, etc) que limitan el crecimiento microalgal (Anand y Arumugam, 2015; Kamalanathan *et al.*, 2015; Cobos *et al.*, 2017).

Aunque existen avances importantes sobre el aislamiento y caracterización de diversas especies y cepas de microalgas (Karnataka, 2011; Pan *et al.*, 2011; Duong *et al.*, 2012; Cobos *et al.*, 2017) y han sido optimizadas las condiciones de cultivo para mejorar sus productividades de triglicéridos para muchos de estos aislados (Isleten-Hosoglu *et al.*, 2012; El-Sheekh *et al.*, 2013; Karpagam *et al.*, 2015). Sin embargo, hasta la fecha los estudios de caracterización a nivel molecular de los procesos metabólicos y por ende de las enzimas que controlan la producción de los triglicéridos son inexistentes o sólo están limitados para algunas especies de microalgas modelo como *Chlamydomonas reinhardtii* (Riekhof *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2011; Gargouri *et al.*, 2015).

Al respecto, investigaciones realizadas en plantas y microalgas sugieren que la biosíntesis de *novo* de ácidos grasos es controlada por la Acetil-CoA carboxilasa. Esta enzima cataliza la carboxilación de acetil-CoA para sintetizar malonil-CoA, la molécula precursora para la elongación enzimática de los ácidos grasos (Thelen y Ohlrogge, 2002). Varios reportes indican que en la naturaleza existen dos formas de Acetil-CoA carboxilasa, la homomérica y

la heteromérica (Sasaki y Nagano, 2004; Huerlimann y Heimann, 2013). Estructuralmente, la enzima heteromérica está formada por cuatro subunidades polipeptídicas: la biotina carboxilasa (BC), la proteína portadora de biotina-carboxilo (BCCP) y dos carboxiltransferasas (alfa [ $\alpha$ CT] y beta [ $\beta$ CT]). Las tres primeras cadenas polipeptídicas son codificadas por genes nucleares, mientras que la cuarta ( $\beta$ CT) es codificada por un gen cloroplástico (Cronan y Waldrop, 2002; Huerlimann y Heimann, 2013).

Por tanto, con el propósito de ampliar nuestros conocimientos a nivel molecular de la biosíntesis de lípidos en las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., dos especies aisladas de la Amazonía peruana, en este estudio hemos realizado la caracterización *in silico* y analizado la expresión de la subunidad alfa de la acetil-Coenzima A carboxilasa heteromérica ( $\alpha$ ACCasa) de ambas especies. Entre las principales razones que hacen interesante investigar la  $\alpha$ ACCasa son: a) esta subunidad como componente del dominio carboxiltransferasa de la enzima participa en un mecanismo regulador inusual, porque regula su propia traducción al unirse a las regiones codantes de los ARNm que codifican sus subunidades, esta unión a su vez inhibe recíprocamente la actividad catalítica de transferencia de grupos carboxilo (Meades *et al.*, 2010), b) la determinación de su estructura tridimensional *in silico* nos proporcionaría nuevos conocimientos para delinear las relaciones de estructura-función, particularmente los mecanismos moleculares que gobiernan la catálisis de la subunidad carboxiltransferasa y el mecanismo regulatorio inusual previamente indicado. También, la estructura 3D podrá ser comparada con estructuras proteicas similares de bacterianas (Bilder *et al.*, 2006) a fin de poder resaltar las diferencias clave entre las isoenzimas bacterianas y microalgales. Asimismo, como la subunidad carboxiltransferasa bacteriana es un blanco para antibióticos (Wu y Seyedsayamdost, 2018; Zhang *et al.*, 2018), se puede determinar si esos antibióticos también inhiben a la carboxiltransferasa microalgal y nos puede servir de guía para el diseño de pequeñas moléculas inhibitorias útiles para la selección de cepas microalgales modificadas genéticamente con fines biotecnológicos, c) la caracterización *in silico* de la proteína codificada nos proporcionará información de sus relaciones filogenéticas con otros grupos de organismos para comprender mejor los procesos evolutivos implicados y d) al conocer si el nivel de expresión del gen que codifica la  $\alpha$ ACCasa influye en la producción de triglicéridos en las dos especies de microalgas de interés, se puede realizar la manipulación genética para

sobreexpresar este gen y los otros genes que codifican las demás subunidades de la acetil-Coenzima A carboxilasa heteromérica con una apropiada estequiometría y así tendríamos de cepas microalgales hiperproductoras de triglicéridos potencialmente útiles para la producción industrial de biodiesel.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Identificación y caracterización *in silico* de la $\alpha$ ACCasa

Se hizo una búsqueda Blast local con BlastStation 2 (TM Software, Arcadia, CA, USA) empleando la secuencia proteica correspondiente de *Chlamydomonas reinhardtii* (XP\_001696945.1) como un *query* para buscar en nuestra base de datos de los transcriptomas anotados de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. y seleccionó las secuencias con E-valor  $< 1 \times 10^{-5}$ . Las secuencias nucleotídicas candidatas fueron extraídas de las bases de datos y corroboradas su identidad mediante análisis Blastp (Altschul *et al.*, 1997) del GenBank (Benson *et al.*, 2013).

Posteriormente, la herramienta ExpASy translate (Artimo *et al.*, 2012) fue empleada para determinar las secuencias de las proteínas de  $\alpha$ ACCasa de ambas especies de microalgas. Plant-mPLoc (Chou y Shen, 2010) y TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2007) fueron utilizados para predecir la localización intracelular de las proteínas. Con el programa ProtParam (Artimo *et al.*, 2012) se calculó el peso molecular, número de aminoácidos, el pI teórico, entre otros parámetros. También, con el servidor PredictProtein (Yachdav *et al.*, 2014) se hicieron anotaciones estructurales (estructuras secundarias, accesibilidad al solvente, etc) y funcionales (términos de ontología de genes, sitios de unión, etc). Adicionalmente, se han realizado predicciones de las estructuras tridimensionales de las proteínas con los servidores Phyre<sup>2</sup> (Kelley *et al.*, 2015) y SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006). Las estructuras obtenidas fueron refinadas con el programa GalaxyRefine (Heo *et al.*, 2013) y la calidad de las estructuras obtenidas fueron analizadas con RAMPAGE (Lovell *et al.*, 2003) y ProSA-web (Wiederstein y Sippl, 2007). Finalmente, para analizar si existe conservación estructural de las  $\alpha$ ACCasa de ambas especies microalgales se hizo un alineamiento de las estructuras tridimensionales con el servidor TM-align (Zhang y Skolnick, 2005).

### Análisis filogenético

Secuencias homólogas de las proteínas fueron investigadas con el algoritmo Blastp (Altschul *et al.*, 1997) y descargadas del GenBank. Se hizo el alineamiento múltiple de las secuencias con Clustal Omega (Sievers y Higgins, 2014), editados con el programa BioEdit (Hall, 1999) y los árboles filogenéticos fueron construidos con el programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) empleando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) con distancias derivadas del modelo

evolutivo Jones-Taylor-Thornton (Jones *et al.*, 1992) y se hicieron 1000 réplicas bootstrap.

### Cultivo de las cepas en medio CHU-10 con y sin nitrógeno

Todos los ensayos se hicieron como previamente lo describió Cobos *et al.*, (2017) con las siguientes condiciones de cultivo: temperatura a  $25 \pm 1$  °C con ciclos de 12:12-h luz-oscuridad, empleando lámparas de fluorescente de luz blanca de  $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de intensidad y agitación continua a 150 rpm. La tasa de crecimiento específico de los cultivos microalgales se determinó de acuerdo con Cobos *et al.*, (2017). Al cabo de 7 días de cultivo las microalgas fueron cosechadas por centrifugación a 4000 rpm por 10 min a 4 °C.

### Análisis de la expresión de genes, productividad lipídica y contenido de lípidos totales

El ARN fue purificado como ha sido descrito previamente (Castro *et al.*, 2017). A partir del ARN purificado se realizó la síntesis del ADN complementario siguiendo las instrucciones del Applied Biosystems™ GeneAmp™ RNA PCR Core Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), empleando Oligo dT<sub>(16)</sub> como cebador en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . El nivel de expresión de los genes fue determinado por PCR en Tiempo Real en base a tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Mastercycler ep Gradient realplex S (Eppendorf, NY, USA) empleando los cebadores específicos (Chl\_ $\alpha$ ACCasa\_f:5'-GCGAGTACGAGCACATGAA-3', Chl\_ $\alpha$ ACCasa\_r:5'-GTTTGAGGAGTGGGTGGTC-3'; Sce\_ $\alpha$ ACCasa\_f:5'-CAGGCACTACGAGAACATGAG-3', Sce\_ $\alpha$ ACCasa\_r:5'-GTTTGAGGAGTGGGTGGTG-3'; Chl\_GFDH\_f:5'-GGCACCATGGTCAAGATCTAC-3', Chl\_GFDH\_r:5'-AAGATGGTGGCGGACAAG-3'; Sce\_GFDH\_f:5'-GTGGTGTCCACGGACTTT-3', Sce\_GFDH\_r:5'-TTTGTGAAGCTGGTCTCCTG-3'), y reactivos de la tecnología SYBR Green I. La eficiencia de las reacciones se determinó con el programa LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009) y la expresión relativa se estimó con el método comparativo del CT (Simon, 2003). Todos los datos de expresión se normalizaron con respecto al nivel de expresión del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GFDH), que en ensayos previos demostró mayor estabilidad de expresión con respecto a otros genes evaluados.

Los lípidos totales fueron extraídos con el método estándar de Bligh y Dyer, (1959). El contenido de lípidos totales se determinó gravimétricamente y tanto la productividad lipídica como el contenido de lípidos totales se calcularon según Yu *et al.*, (2012).

### Análisis estadísticos

Los cálculos para el test de normalidad de Shapiro-Wilk, prueba F de varianzas iguales, prueba t de Student, promedio, desviación estándar, ANOVA de una vía y la

prueba HSD de Tukey del nivel de expresión relativa del gen  $\alpha$ ACCasa y el contenido de lípidos totales fueron realizados con el programa R version 3.4.4. Las diferencias con  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

### Identificación y caracterización in silico de la $\alpha$ ACCasa

Mediante los análisis blast locales se ha identificado en nuestra base de datos de transcriptomas los genes que codifican la  $\alpha$ ACCasa de ambas especies de microalgas.

Los parámetros fisicoquímicos indican que las proteínas deducidas tienen pesos moleculares entre 53 y 55 kDa y muestran ligeras diferencias con respecto a otros parámetros evaluados como el pI, residuos con carga positiva, etc. (Tabla 1). Además, presentaron algunas diferencias en la composición de aminoácidos (Tabla S1). Los análisis blastp indican que ambas secuencias se tratan de la subunidad alfa de la acetil-CoA carboxilasa heteromérica, debido a que presentaron porcentajes de identidad mayores al 60 % con proteínas de otras especies de microalgas y plantas depositadas en el GenBank (Tablas S2 y S3). Adicionalmente, los análisis de ontología genética corroboran que se trata de esta proteína (Tablas S4 y S5). Finalmente, los análisis bioinformáticos de localización intracelular indican que es una proteína que se localiza en los cloroplastos.

Por otra parte, con base a las secuencias deducidas de las proteínas se ha mostrado que se trata de proteínas mixtas, por la composición de estructuras secundarias que presentan, es decir, estuvieron constituidas por hélices  $\alpha$ , hojas  $\beta$  y bucles (Fig. 1, Fig. S1).

También con base a las secuencias proteicas deducidas de ambos genes se ha podido predecir las estructuras tridimensionales (Fig. 2) empleando plantillas de proteínas que tienen sus estructuras 3D determinadas por cristalografía de rayos X. Los modelos predichos fueron refinados y analizados para verificar la calidad de los modelos obtenidos. Los resultados indican que estos modelos fueron

de alta calidad porque en los plots de Ramachandran y las puntuaciones obtenidas con ProSA-web no mostraron aberraciones estructurales (Fig. 3).

Adicionalmente, se ha demostrado que ambas proteínas presentan el mismo plegamiento estructural (TM-Score= 0,98), lo que sugiere la gran conservación tridimensional de las mismas en estas especies de microalgas (Fig. S2).

### Análisis filogenético

Existen relaciones filogenéticas bien establecidas entre los diferentes grupos de organismos evaluados a nivel de las secuencias aminoacídicas de la  $\alpha$ ACCasa, porque ambas secuencias forman un clado junto con otras especies de microalgas. Asimismo, el clado que agrupa a las plantas superiores tiene mayor similitud genética con las microalgas. En contraste, las cianobacterias y las bacterias forman clados que están más distanciados genéticamente de las microalgas (Fig. 4, Fig. S3).

### Tasa de crecimiento, análisis de la expresión de genes y contenido de lípidos

Los resultados experimentales muestran que las tasas de crecimiento de las dos especies de microalgas difieren significativamente ( $t = 11,7$ ;  $gl = 8$ ;  $p < 0,001$ ) al ser cultivadas en medio con nitrógeno ( $0,142 \pm 0,008 \text{ d}^{-1}$  vs  $0,216 \pm 0,011 \text{ d}^{-1}$  para *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., respectivamente) y presentan tasas de crecimiento menores (~ 4 veces menos) y con diferencias estadísticas significativas ( $t = 16,1$ ;  $gl = 8$ ;  $p < 0,001$ ) al ser cultivadas en medio sin nitrógeno ( $0,034 \pm 0,002 \text{ d}^{-1}$  vs  $0,060 \pm 0,002 \text{ d}^{-1}$  para *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., respectivamente). Asimismo, es evidente que bajo condiciones de cultivo en ausencia de nitrógeno existe una significativa inducción en el nivel de expresión del gen que codifica las  $\alpha$ ACCasa tanto de *Chlorella* sp. como de *Scenedesmus* sp. Esta inducción de la expresión génica está relacionada con un aumento significativo ( $t = 11,4$ ;  $gl = 8$ ;  $p < 0,001$ ) en las productividades lipídicas de ambas especies microalgales ( $3,35 \pm 0,10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  vs  $4,55 \pm 0,23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  para *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.,

**Tabla 1.** Comparación de los parámetros fisicoquímicos de la secuencia de aminoácidos deducidas de las subunidades alfa de la Acetil-CoA carboxilasa heteromérica de las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.

Parámetros fisicoquímicos	Especie de microalga	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.
Peso molecular	55 034,68	53 626,92
Número de aminoácidos	501	491
pI teórico	9,16	9,06
Residuos con carga negativa	62	57
Residuos con carga positiva	71	64
Índice de inestabilidad	42,68	45,61
Índice alifático	78,40	79,16
Gran promedio de hidropatía	-0,456	-0,332

**Tabla S1.** Composición de aminoácidos de la  $\alpha$ ACCasa de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.

Aminoácido	<i>Chlorella</i> sp		<i>Scenedesmus</i> sp	
	Numero	%	Numero	%
Ala (A)	63	12,6	64	13,0
Arg(R)	48	9,6	42	8,6
Asn(N)	18	3,6	21	4,3
Asp(D)	22	4,4	17	3,5
Cys(C)	6	1,2	5	1,0
Gln(Q)	19	3,8	19	3,9
Glu (E)	40	8,0	40	8,1
Gly(G)	45	9,0	40	8,1
His(H)	6	1,2	6	1,2
Ile (I)	25	5,0	23	4,7
Leu (L)	38	7,6	32	6,5
Lys(K)	23	4,6	22	4,5
Met (M)	12	2,4	14	2,9
Phe (F)	13	2,6	15	3,1
Pro(P)	32	6,4	21	4,3
Ser(S)	22	4,4	33	6,7
Thr(T)	21	4,2	22	4,5
Trp(W)	7	1,4	7	1,4
Tyr(Y)	12	2,4	10	2,0
Val(V)	29	5,8	38	7,7

respectivamente) al ser cultivadas en medio sin nitrógeno. También, el aumento en la expresión de estos genes se relaciona con un incremento significativo en el contenido de lípidos totales en ambas especies de microalgas (Fig. 5), lo que sugiere que la actividad catalítica de la acetil-CoA carboxilasa heteromérica se ha incrementado.

## DISCUSIÓN

### Identificación y caracterización *in silico* de la $\alpha$ ACCasa

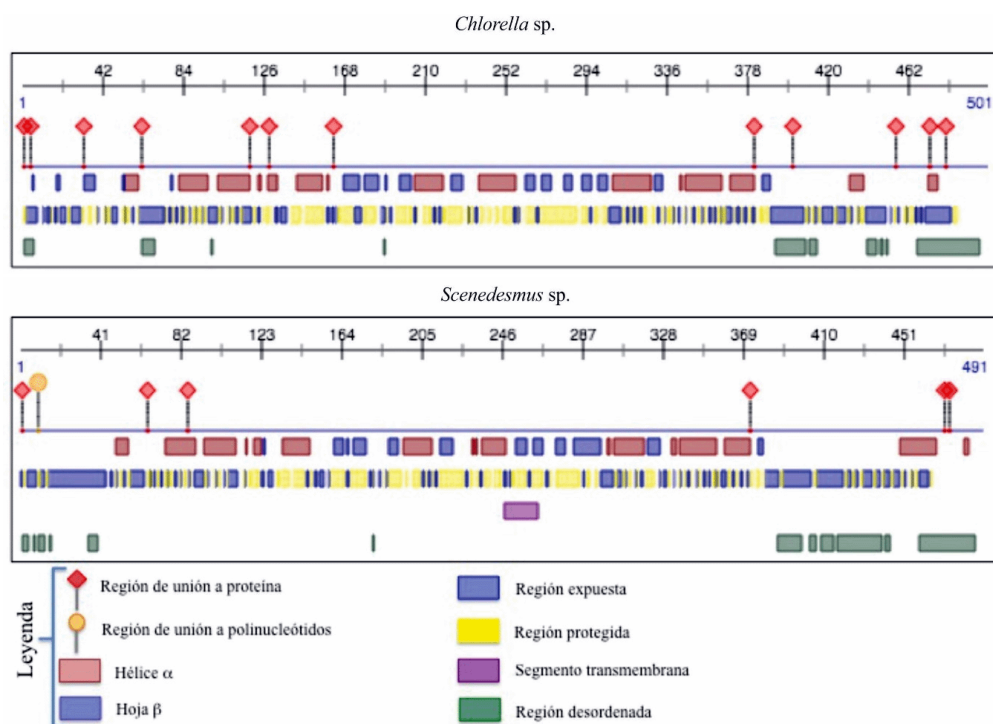
Los resultados muestran que ambas  $\alpha$ ACCasa presentan patrones de estructuras secundarias que son típicos en este tipo de proteínas, tal como han sido reportados en otros estudios (Cronan y Waldrop, 2002; Huerlimann y Heimann, 2013; Salie y Thelen, 2016). Respecto a la estructura tridimensional predecida se evidencia que tiene una gran similitud estructural con las correspondientes subunidades de acetil-CoA carboxilasa heteromérica de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, las que fueron previamente determinadas mediante cristalografía de rayos X a resoluciones de 2,0 y 3,0 Å, respectivamente (Bilder *et al.*, 2006). Además, cabe indicar que mediante análisis de filtración en gel, equilibrio de sedimentación y cristalografía de rayos X ha sido demostrado que las subunidades alfa y beta se ensamblan

**Tabla S2.** Resultados del análisis Blastp para la secuencia aminoacídica de la  $\alpha$ ACCasa de *Chlorella* sp.

Descripción	Puntuación Máxima	Puntuación Total	Cobertura	Valor E	Identidad	Código GenBank
Acetil-CoA carboxilasa ( <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> )	733	733	92	0	78	XP_001696945.1
Proteína hipotética VOLCADRAFT_120546 ( <i>Volvox carteri</i> )	721	721	90	0	77	XP_002948082.1
Subunidad alfa de acetil-CoA carboxilasa ( <i>Coccomyxa subellipsoidea</i> )	641	641	87	0	74	XP_005650555.1
Proteína hipotética CHLNCDRAFT36222 ( <i>Chlorella variabilis</i> )	638	638	90	0	69	XP_005845985.1
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Cicer arietinum</i> )	449	449	66	1x10 <sup>-147</sup>	66	XP_004514537.1
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Eucalyptus grandis</i> )	445	445	66	7x10 <sup>-146</sup>	64	XP_010044066.1
Subunidad alfa de la carboxiltransferasa ( <i>Glycine max</i> )	439	439	66	8x10 <sup>-145</sup>	64	NP_001236006.2
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Citrus sinensis</i> )	442	442	70	9x10 <sup>-145</sup>	62	XP_006480950.1
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Ricinus communis</i> )	441	441	66	2x10 <sup>-144</sup>	64	XP_002527864.1
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Daucus carota</i> )	440	440	67	3x10 <sup>-144</sup>	61	XP_017253473.1
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Gossypium arboreum</i> )	440	440	65	6x10 <sup>-144</sup>	64	XP_017615292.1
Subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	440	440	65	6x10 <sup>-144</sup>	64	NP_001314479.1
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Daucus carota</i> )	439	439	66	7x10 <sup>-144</sup>	63	XP_017247453.1
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Glycine max</i> )	438	438	66	8x10 <sup>-144</sup>	63	XP_006601861.2
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	439	439	65	1x10 <sup>-143</sup>	64	XP_016739006.1

**Tabla S3.** Resultados del análisis Blastp para la secuencia aminoacídica de la  $\alpha$ ACCasa de *Scenedesmus* sp.

Descripción	Puntuación Máxima	Puntuación Total	Cobertura	Valor E	Identidad	Código GenBank
Acetil-CoA carboxilasa ( <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> )	746	746	91	0	79	XP_001696945.1
Proteína hipotética VOLCADRAFT_120546 ( <i>Volvox carteri</i> )	736	736	86	0	81	XP_002948082.1
Subunidad alfa de acetil-CoA carboxilasa ( <i>Coccomyxa subellipsoidea</i> )	638	638	91	0	70	XP_005650555.1
Proteína hipotética CHLNCDRAFT_36222 ( <i>Chlorella variabilis</i> )	632	632	90	0	69	XP_005845985.1
Proteína predicha ( <i>Physcomitrella patens</i> )	461	461	71	1x10 <sup>-156</sup>	61	XP_001778207.1
Precursor de la alfa carboxiltransferasa ( <i>Glycine max</i> )	449	449	67	8x10 <sup>-149</sup>	63	NP_001236193.1
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Ricinus communis</i> )	452	452	67	8x10 <sup>-149</sup>	64	XP_002527864.1
Subunidad alfa de la carboxiltransferasa ( <i>Glycine max</i> )	449	449	67	8x10 <sup>-149</sup>	63	NP_001236006.2
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Cicer arietinum</i> )	451	451	67	1x10 <sup>-148</sup>	64	XP_004514537.1
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Nelumbo nucifera</i> )	451	451	67	2x10 <sup>-148</sup>	63	XP_010262746.1
Subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Ananas comosus</i> )	450	450	67	3x10 <sup>-148</sup>	63	XP_020112969.1
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Citrus sinensi</i> )	451	451	67	3x10 <sup>-148</sup>	63	XP_006480950.1
Predicha: subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Tarenaya hassleriana</i> )	450	450	67	3x10 <sup>-148</sup>	64	XP_010529773.1
Subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Sesamum indicum</i> )	449	449	67	9x10 <sup>-148</sup>	62	XP_011094964.1
Subunidad alfa transferasa de acetil-coenzima A carboxilasa ( <i>Amborella trichopoda</i> )	453	453	67	1x10 <sup>-147</sup>	62	XP_006827697.1



**Fig. 1.** Anotación estructural de las  $\alpha$ ACCasa de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. donde se muestran las regiones que corresponden a las estructuras secundarias típicas (hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$ ) presentes en estas proteínas. Además, se presentan regiones implicadas en la interacción con proteínas, polinucleótidos y regiones que están embebidas en el núcleo hidrofóbico o si se encuentran en la superficie de las  $\alpha$ ACCasa de ambas especies microalgales.

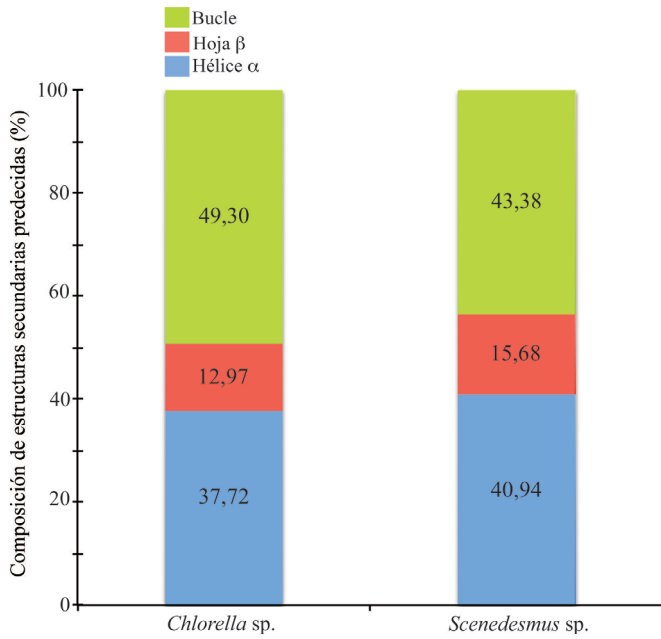
Tabla S4. Ontología genética de la  $\alpha$ ACCasa de *Chlorella* sp.

Función Molecular			Proceso Biológico			Componente celular					
Xo	Identidad GO	Término GO	Confiabilidad	Xo	Identidad GO	Término GO	Confiabilidad	Xo	Identidad GO	Término GO	Confiabilidad
1	GO:0016885	Actividad de ligasa para enlaces C-C	40	1	GO:0044281	Proceso metabólico de moléculas pequeñas	49	1	GO:0005623	Célula	52
2	GO:0003989	Actividad de acetil-CoA carboxilasa	40	2	GO:0044283	Proceso biosintético de moléculas pequeñas	49	2	GO:0005737	Citoplasma	52
3	GO:0016421	Actividad de CoA carboxilasa	40	3	GO:0044710	Proceso metabólico de organismos unicelulares	49	3	GO:0005622	Intracelular	52
4	GO:0035639	Unión de purina ribonucleósido trifosfato	38	4	GO:0044711	Proceso metabólico de organismos unicelulares	49	4	GO:0044424	Parte Intracelular	52
5	GO:0005488	unión	38	5	GO:0032787	Proceso metabólico de ácidos monocarboxílicos	49	5	GO:0044464	Parte Celular	52
6	GO:0000166	Unión de nucleótido	38	6	GO:0043436	Procesos metabólicos de oxoácidos	49	6	GO:0009317	Complejo acetil-CoA carboxilasa	37
7	GO:1901363	Unión de compuesto heterocíclico	38	7	GO:0016053	Proceso biosintético de ácidos orgánicos	49	7	GO:0043234	Complejo proteico	37
8	GO:1901363	Unión de nucleósido fosfato	38	8	GO:1901576	Proceso biosintético de ácidos monocarboxílicos	49	8	GO:1902494	Complejo catalítico	37
9	GO:0001882	Unión de nucleósido	38	9	GO:1901576	Procesos biosintéticos de sustancias orgánicas	49	9	GO:0032991	Complejo macromolecular	37
10	GO:0043168	Unión de aniones	38	10	GO:0008152	Proceso metabólico	49	10	GO:0044444	Parte citoplasmática	37

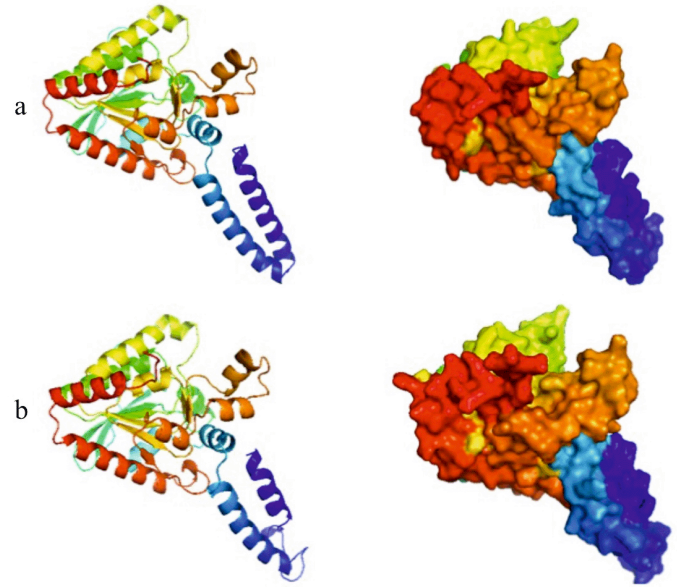
Tabla S5. Ontología genética de la  $\alpha$ ACCasa de *Scenedesmus* sp.

N°	Función Molecular				Proceso Biológico				Componente celular		
	Identidad GO	Término GO	Confiabilidad	Xo	Identidad GO	Término GO	Confiabilidad	Xo	Identidad GO	Término GO	Confiabilidad
1	GO:0016885	Actividad de ligasa para enlaces C-C	40	1	GO:0044281	Proceso metabólico de moléculas pequeñas	50	1	GO:0005623	Célula	52
2	GO:0003989	Actividad de acetil-CoA carboxilasa	40	2	GO:0044283	Proceso biosintético de moléculas pequeñas	50	2	GO:0005737	Citoplasma	52
3	GO:0016421	Actividad de CoA carboxilasa	40	3	GO:0044710	Proceso metabólico de organismos unicelulares	50	3	GO:0005622	Intracelular	52
4	GO:0035639	Unión de purina ribonucleósido trifosfato	38	4	GO:0044711	Proceso metabólico de organismos unicelulares	50	4	GO:0044424	Parte Intracelular	52
5	GO:0005488	Unión	38	5	GO:0032787	Proceso metabólico de ácidos monocarboxílicos	50	5	GO:0044464	Parte Celular	52
6	GO:0043167	Unión de ion	38	6	GO:0043436	Procesos metabólicos de oxoácidos	50	6	GO:0009317	Complejo acetil-CoA carboxilasa	37
7	GO:1901363	Unión de compuesto heterocíclico	38	7	GO:0016053	Proceso biosintético de ácidos orgánicos	50	7	GO:0043234	Complejo proteico	37
8	GO:0001883	Unión de nucleósido fosfato	38	8	GO:0072330	Proceso biosintético de ácidos monocarboxílicos	50	8	GO:1902494	Complejo catalítico	37
9	GO:0001882	Unión de nucleósido	38	9	GO:1901576	Procesos biosintéticos de sustancias orgánicas	50	9	GO:0032991	Complejo macromolecular	37
10	GO:0043168	Unión de aniones	38	10	GO:0008152	Proceso metabólico	50	10	GO:0044444	Parte citoplasmática	37

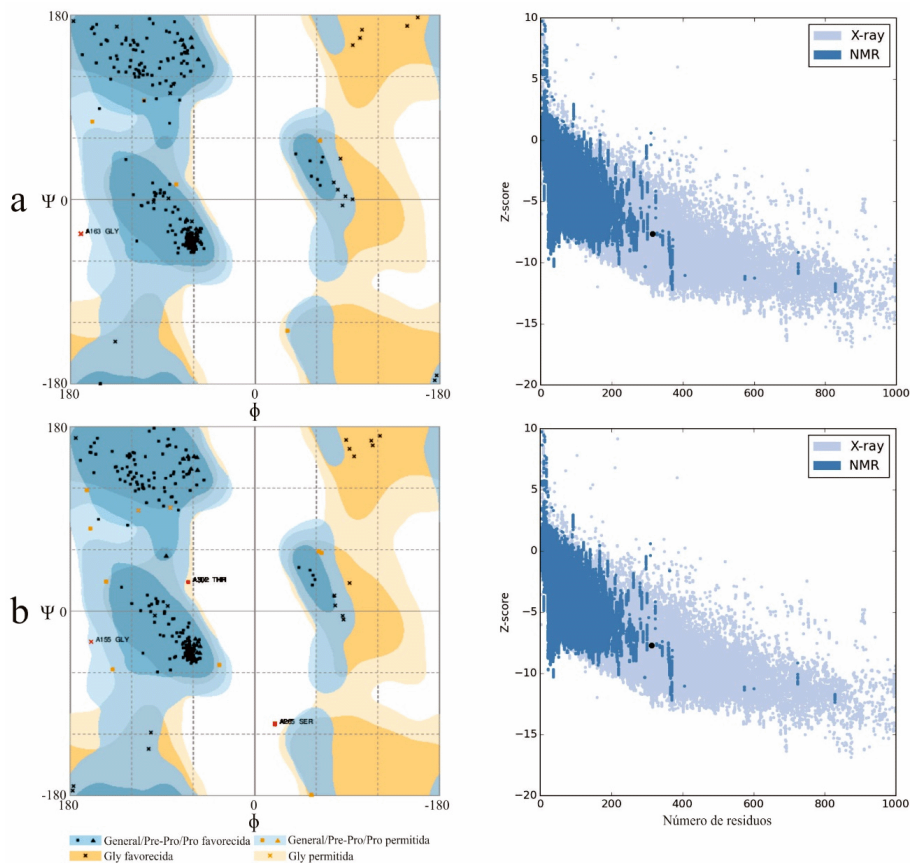




**Fig. S1.** Composición de estructuras secundarias predecidas en la proteína  $\alpha$ ACCasa de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.



**Fig. 2.** Comparación de las estructuras tridimensionales de las proteínas  $\alpha$ ACCasa de *Chlorella* sp. (a) y *Scenedesmus* sp. (b) generadas por predicción con base a estructuras 3D de proteínas homólogas que perviamente han sido obtenidas por cristalografía de rayos X. Ambas proteínas presentan el mismo patrón estructural corroborando su conservación funcional en la catálisis de la transferencia de grupos carboxilo.



**Fig. 3.** Análisis de la calidad de las estructuras tridimensionales predecidas de las proteínas  $\alpha$ ACCasa de *Chlorella* sp. (a) y *Scenedesmus* sp. (b) con los plots de Ramachandran y ProSA-web. Los patrones de distribución de los enlaces peptídicos de los aminoácidos y el Z-score obtenidos por las  $\alpha$ ACCasa de ambas microalgas está de acuerdo con los patrones comúnmente encontrados en las proteínas cuyas estructuras 3D han sido determinadas mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear.

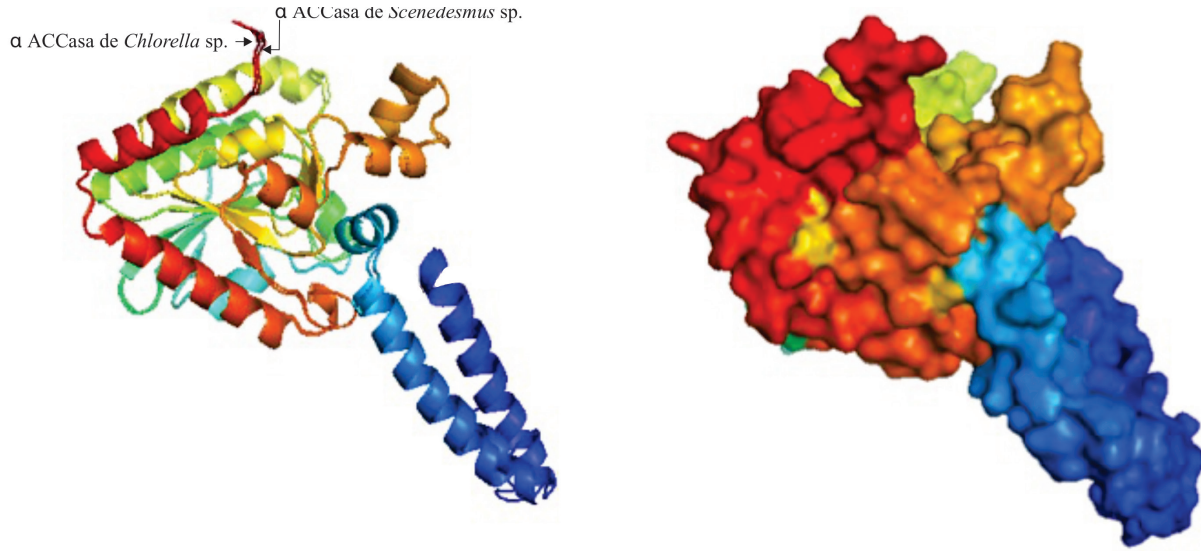


Fig. S2. Alineamiento estructural de las estructuras tridimensionales prededidas de las proteínas  $\alpha$ ACCasa de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.

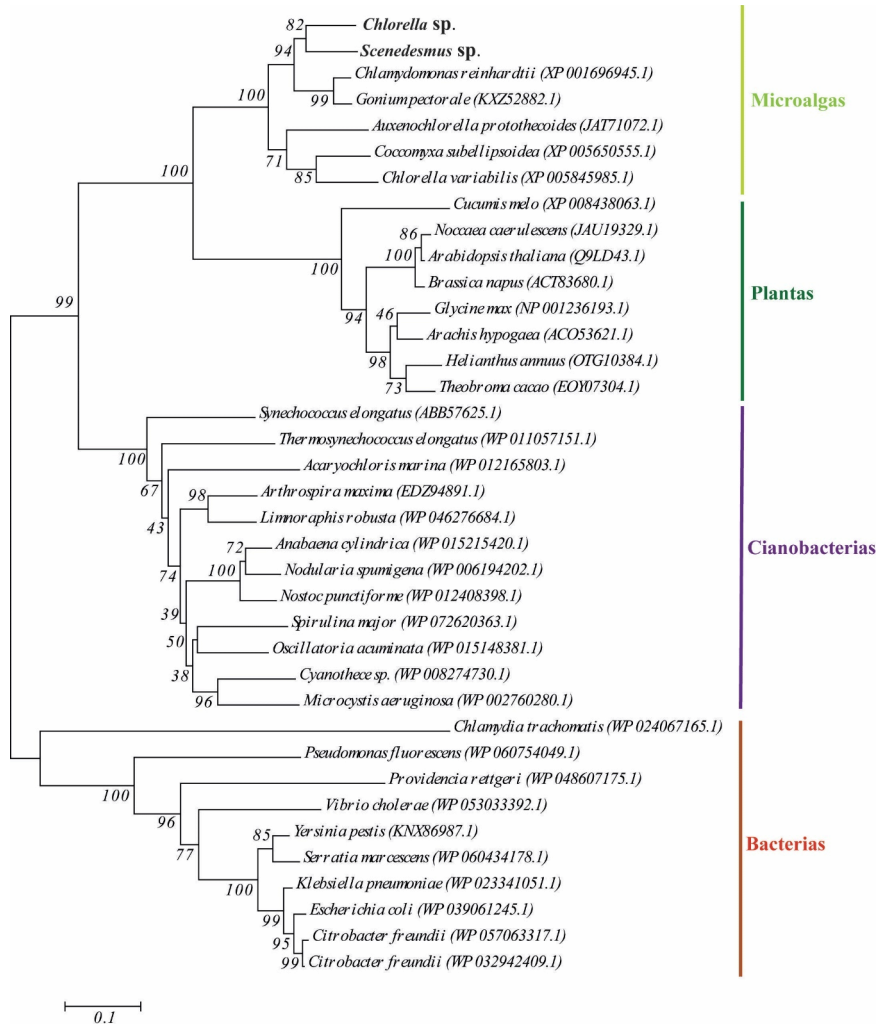


Fig. 4. Análisis filogenético de las  $\alpha$ ACCasa con base a las secuencias deducidas de las proteínas homólogas de microalgas, plantas, cianobacterias y bacterias. El árbol filogenético fue construido empleando el método Neighbor-Joining y las distancias de las ramas son las proporciones de las sustituciones de aminoácidos derivadas del modelo evolutivo Jones-Taylor-Thornton. Los valores de bootstrap corresponden a los porcentajes obtenidos a partir de 1000 réplicas.

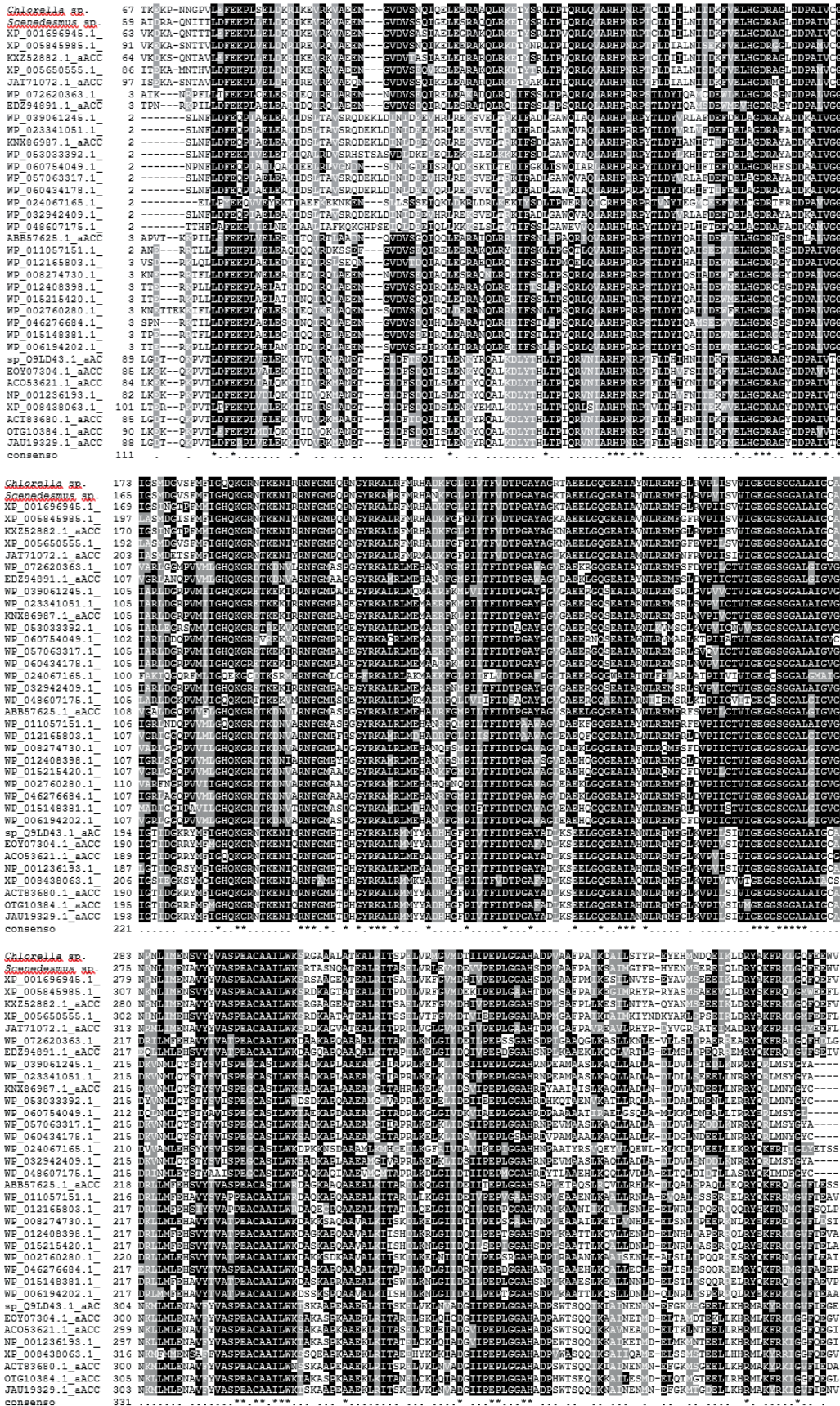
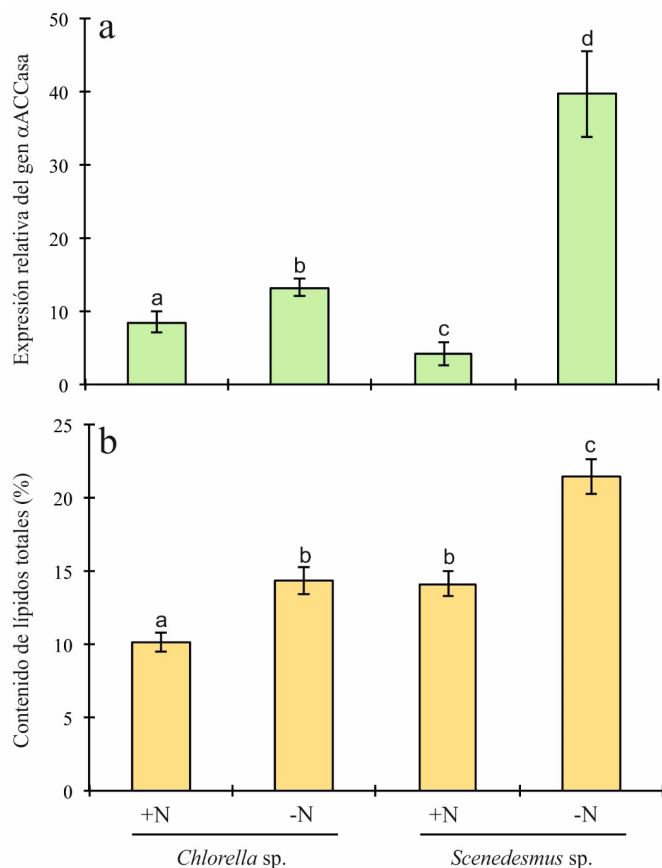


Fig. S3. Alineamiento de las secuencias proteicas de la  $\alpha$ ACCasa de las microalgas en estudio con las de otras especies



**Fig. 5.** Expresión relativa del gen  $\alpha$ ACCasa (a) y contenido de lípidos totales (b) en las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. sometidas a estrés nutritivo por deficiencia de nitrógeno. Las columnas representan los promedios obtenidos de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Las barras de error indican valores de desviación estándar y letras diferentes (p.ej., a, b, c, etc.) sobre las columnas significa que existen diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ )

como heterotretámeros ( $\alpha 2\beta 2$ ) funcionales, sin que exista un cambio estructural en las estructuras tridimensionales de cada subunidad (Guchhait *et al.*, 1974; Bilder *et al.*, 2006). Por tanto, la predicción de la estructura tridimensional realizada es una aproximación apropiada para conocer la estructura de estas proteínas, que posteriormente deberán ser corroboradas experimentalmente.

### Análisis filogenético

El análisis filogenético nos revela que entre microalgas existe una alta similitud genética a nivel de secuencias aminoacídicas de la  $\alpha$ ACCasa y diferentes niveles de distancia genética con respecto a las secuencias correspondientes de otros organismos analizados (plantas, cianobacterias y bacterias). De acuerdo con Huerlimann *et al.*, (2015), el entendimiento de la filogenia de las microalgas se complica por el desconocimiento del número de eventos de transferencia genética horizontal y procesos endosimbióticos primarios, secundarios y terciarios. Adicionalmente, estos investigadores manifiestan que los plástidos de las microalgas

que surgieron por eventos endosimbióticos primarios contienen las acetil-CoA carboxilasas heteroméricas, las que consisten en tres subunidades codificadas en el núcleo y una subunidad codificada en el cloroplasto. Este origen común de los cloroplastos microalgales y de las plantas superiores explicaría la gran similitud genética entre estos grupos de organismos (Fig. 4, Fig. S3). Aunque a nivel de secuencias aminoacídicas se evidencia distanciamiento genético de las microalgas con otros grupos de organismos analizados (Fig. 4), sin embargo, es preciso destacar que existe una alta conservación estructural y funcional de esta subunidad en los dominios de unión (Huerlimann y Heimann, 2013), toda vez que por acoplamiento con la subunidad beta forman un sitio activo con actividad carboxiltransferasa que reconoce ésteres de coenzima A y por ende cataliza la semireacción que consiste en la transferencia del grupo carboxilo activado a la acetil-Coenzima A para producir malonil-Coenzima A (Bilder *et al.*, 2006; Tong, 2013).

### Tasa de crecimiento, análisis de la expresión de genes y contenido de lípidos totales

Los resultados muestran que al cultivar ambas especies de microalgas en medio deficiente de nitrógeno disminuyen significativamente sus tasas de crecimiento. Este comportamiento ha sido evidenciado en estudios similares con varias especies de microalgas (Lin y Lin, 2011; Do Nascimento *et al.*, 2012; Cobos *et al.*, 2017). De acuerdo con algunas investigaciones la disminución en la tasa de crecimiento de las microalgas en cultivos deficientes de nitrógeno se debe a una detención del ciclo celular en su etapa inicial, particularmente en la Fase G1 (Olson y Chisholm, 1986; Vaultot *et al.*, 1987). Además, recientemente ha sido demostrado que la disminución en la tasa de crecimiento de las microalgas se asocia con un descenso en los niveles de expresión de genes que regulan el crecimiento de las células y el ciclo celular (Li *et al.*, 2012). Por otra parte los resultados indican que existe correlación positiva entre el nivel de expresión de los genes analizados y la productividad y la acumulación de lípidos totales bajo deficiencia de nitrógeno. Similares resultados han sido reportados en otras especies de microalgas, que muestran sobreexpresión de los genes involucrados en el metabolismo lipídico cuando son sometidos a deficiencia de nitrógeno (Guarnieri *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Rismani-Yazdi *et al.*, 2012). También, varios estudios han demostrado que tanto en plantas como en microalgas existe una correlación positiva entre los niveles de expresión de las cuatro subunidades de la acetil-CoA carboxilasa heteromérica y la acumulación de lípidos (Fan *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2017).

Adicionalmente, es preciso señalar que el cultivo de las microalgas en un medio deficiente de nitrógeno causa cambios significativos en el contenido de sus principales biomoléculas, es decir, además de incrementarse el contenido lipídico, también hay aumento de los carbohidratos, pero

una disminución marcada de las proteínas (Do Nascimento *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2015; Cobos *et al.*, 2017). Esto sugiere que bajo estas condiciones de cultivo las microalgas redireccionan su metabolismo hacia la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos, procesos que están determinados por una sobreexpresión de los genes involucrados en la glucólisis, degradación de almidón, biosíntesis de ácidos grasos y de triglicéridos. Simultáneamente, existe una disminución significativa en la expresión de genes que participan en la gluconeogénesis, síntesis de almidón, degradación de triglicéridos y  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (Lim *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Sirikhachornkit *et al.*, 2018).

En contraste a nuestros hallazgos, Li *et al.*, (2014) revelaron que la microalga oleaginosa *Nannochloropsis oceanica* al ser sometida a condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno disminuye el nivel de expresión de los genes de la acetil-CoA carboxilasa heteromérica. Asimismo, Huerlimann *et al.*, (2014) en base a experimentos realizados con *Chromera velia* e *Isochrysis aff. galbana*, concluyen que los niveles de expresión de la Acetil-CoA carboxilasa homomérica y heteromérica cambian con la fase de crecimiento de las microalgas y el contenido de nutrientes de una manera especie-específica y que la limitación del nitrógeno en los medios de cultivo no siempre induce la acumulación de lípidos.

Consecuentemente, aún existen grandes vacíos para comprender por completo varios procesos claves, tales como los componentes moleculares de las vías de señalización intracelular por el cual el estrés nutritivo estimula la expresión de genes involucrados directa e indirectamente con la acumulación de lípidos, la magnitud y el tiempo de la deficiencia de nutrientes requerida para la inducción y las interacciones entre crecimiento celular y contenido de lípidos (Goncalves *et al.*, 2016). Por tanto, es necesario realizar más investigaciones integrando diversas aproximaciones tales como análisis transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos para comprender la interdependencia y regulación de las vías anabólicas y catabólicas de lípidos y de otros compuestos (p.ej., carbohidratos y proteínas) bajo condiciones de estrés nutritivo, que nos permita tener el conocimiento básico suficiente para desarrollar nuevas cepas microalgales con capacidades mejoradas para canalizar los metabolitos hacia precursores para la producción de biocombustibles (Msanne *et al.*, 2012).

## CONCLUSIONES

El análisis *in silico* de la  $\alpha$ ACCasa de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. presentan características estructurales, funcionales y evolutivas muy similares al de otras especies de microalgas y plantas. Asimismo, el estudio revela que en ambas especies el gen se sobreexpresa cuando las microalgas son sometidas a estrés por deficiencia de nitrógeno, el cual se relaciona significativamente con la acumulación de lípidos totales en estas células.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el Programa Nacional para la Competitividad y Productividad (PNICP-INNOVATE PERÚ) contrato No. 383-PIBA-2P-031-14.

## CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaramos que no tenemos conflictos de interés.

## REFERENCIAS

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389-3402. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy.* 2011;88(10):3402-3410. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014>
- Anand J, Arumugam M. Enhanced lipid accumulation and biomass yield of *Scenedesmus quadricauda* under nitrogen starved condition. *Bioresour Technol.* 2015;188:190-194. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.097>
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 2006;22(2):195-201. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti770>
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, *et al.* ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(1):597-603. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gks400>
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, *et al.* GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):36-42. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Bilder P, Lightle S, Bainbridge G, Ohren J, Finzel B, Sun F, *et al.* The Structure of the Carboxyltransferase Component of Acetyl-CoA Carboxylase Reveals a Zinc-Binding Motif Unique to the Bacterial Enzyme. *Biochemistry.* 2006a;45(6):1712-1722. Doi: <https://dx.doi.org/10.1021/bi0520479>
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37(8):911-917. Doi: <https://dx.doi.org/10.1139/o59-099>
- Castro JC, Rodriguez HN, Maddox JD, Jiu B, Petterman JB, Marapara JL, *et al.* A Simple and efficient method for high-quality total RNA isolation from Oleaginous microalgae. *Plant Cell Biotechnol Mol Biol.* 2017;18(1-2):15-21.
- Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 2007;25(3):294-306. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chou KC, Shen HB. Plant-mPLoc: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS One.* 2010;5(6):e11335. Doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011335>

- Cobos M, Paredes JD, Maddox JD, Vargas-Arana G, Flores L, Aguilar CP, *et al.* Isolation and Characterization of Native Microalgae from the Peruvian Amazon with Potential for Biodiesel Production. *Energies*. 2017;10(2):224. Doi: <https://dx.doi.org/10.3390/en10020224>
- Cronan Jr. JE, Waldrop GL. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Prog Lipid Res*. 2002;41(5):407-435. Doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00007-3](https://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00007-3)
- Cui Y, Liu Z, Zhao Y, Wang Y, Huang Y, Li L, *et al.* Overexpression of Heteromeric GhACCase Subunits Enhanced Oil Accumulation in Upland Cotton. *Plant Mol Biol Report*. 2017;35(2):287-297. Doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s11105-016-1022-y>
- Demirbas A. Use of algae as biofuel sources. *Energy Convers Manag*. 2010;51(12):2738-2749. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.010>
- Do Nascimento M, Ortiz-Marquez JCF, Sanchez-Rizza L, Echarte MM, Curatti L. Bioprospecting for fast growing and biomass characterization of oleaginous microalgae from South-Eastern Buenos Aires, Argentina. *Bioresour Technol*. 2012;125:283-290. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.057>
- Duong VT, Li Y, Nowak E, Schenk PM. Microalgae isolation and selection for prospective biodiesel production. *Energies*. 2012;5(12):1835-1849. Doi: <https://dx.doi.org/10.3390/en5061835>
- El-Sheekh M, Abomohra AE-F, Hanelt D. Optimization of biomass and fatty acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel production. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013;29(5):915-922. Doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s11274-012-1248-2>
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc*. 2007;2(4):953-971. Doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.131>
- Fan J, Andre C, Xu C. A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett*. 2011;585(12):1985-1991. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.018>
- Fan J, Cui Y, Wan M, Wang W, Li Y. Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnol Biofuels*. 2014;7(1):17. Doi: <https://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-7-17>
- Gargouri M, Park J-J, Holguin FO, Kim M-J, Wang H, Deshpande RR, *et al.* Identification of regulatory network hubs that control lipid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Exp Bot*. 2015;66(15):4551-4566. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/jxb/erv217>
- Garibay A, Vásquez-Duhalt R, Sánchez MP, Serrano L, Martínez A. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*. 2009;13(3):38-61.
- Goncalves EC, Wilkie AC, Kirst M, Rathinasabapathi B. Metabolic regulation of triacylglycerol accumulation in the green algae: identification of potential targets for engineering to improve oil yield. *Plant Biotechnol J*. 2016;14(8):1649-1660. Doi: <https://dx.doi.org/10.1111/pbi.12523>
- Guarnieri MT, Nag A, Smolinski SL, Darzins A, Seibert M, Pienkos PT. Examination of triacylglycerol biosynthetic pathways via de novo transcriptomic and proteomic analyses in an unsequenced microalga. *PloS One*. 2011;6(10):e25851. Doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025851>
- Guchhait RB, Polakis SE, Dimroth P, Stoll E, Moss J, Lane MD. Acetyl Coenzyme A Carboxylase system of *Escherichia coli*. Purification and properties of the Biotin Carboxylase, Carboxyltransferase, and Carboxyl Carrier Protein components. *J Biol Chem*. 1974;249(20):6633-6645.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999;41:95-98.
- Heo L, Park H, Seok C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(1):384-388. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt458>
- Huerlimann R, Heimann K. Comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae. *Crit Rev Biotechnol*. 2013;33(1):49-65. Doi: <https://dx.doi.org/10.3109/07388551.2012.668671>
- Huerlimann R, Steinig EJ, Loxton H, Zenger KR, Jerry DR, Heimann K. The effect of nitrogen limitation on acetyl-CoA carboxylase expression and fatty acid content in *Chromera velia* and *Isochrysis aff. galbana* (TISO). *Gene*. 2014;543(2):204-211. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.022>
- Huerlimann R, Zenger KR, Jerry DR, Heimann K. Phylogenetic Analysis of Nucleus-Encoded Acetyl-CoA Carboxylases Targeted at the Cytosol and Plastid of Algae. *PloS One*. 2015;10(7):e0131099. Doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131099>
- Isleten-Hosoglu M, Gultepe I, Elibol M. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochem Eng J*. 2012;61:11-19. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.12.001>
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci CABIOS*. 1992;8(3):275-282.
- Kamalanathan M, Gleadow R, Beardall J. Impacts of phosphorus availability on lipid production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res*. 2015;12:191-196. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.021>
- Karnataka J. Isolation of microalgae with biodiesel productivity prospects. *Agric Sci*. 2011;24(4):585-588.
- Karpagam R, Raj KJ, Ashokkumar B, Varalakshmi P. Characterization and fatty acid profiling in two fresh water microalgae for biodiesel production: Lipid enhancement methods and media optimization using response surface methodology. *Bioresour Technol*. 2015;188:177-184. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.053>

- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 2015;10(6):845-858. Doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kumar R, Biswas K, Singh PK, Singh PK, Elumalai S, Shukla P, *et al.* Lipid production and molecular dynamics simulation for regulation of accD gene in cyanobacteria under different N and P regimes. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10(1):94. Doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s13068-017-0776-2>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-1874. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Li J, Han D, Wang D, Ning K, Jia J, Wei L, *et al.* Choreography of transcriptomes and lipidomes of *Nannochloropsis* reveals the mechanisms of oil synthesis in microalgae. *Plant Cell.* 2014;26(4):1645-1665. Doi: <https://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.121418>
- Li Y, Fei X, Deng X. Novel molecular insights into nitrogen starvation-induced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene expression analysis in green algae *Micractinium pusillum*. *Biomass Bioenergy.* 2012;42:199-211. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.010>
- Lim DKY, Schuhmann H, Thomas-Hall SR, Chan KCK, Wass TJ, Aguilera F, *et al.* RNA-Seq and metabolic flux analysis of *Tetraselmis* sp. M8 during nitrogen starvation reveals a two-stage lipid accumulation mechanism. *Bioresour Technol.* 2017;244(Pt 2):1281-1293. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.003>
- Lin Q, Lin J. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresour Technol.* 2011;102(2):1615-1621. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.008>
- Lovell SC, Davis IW, Arendall WB 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, *et al.* Structure validation by C $\alpha$  geometry: phi, psi and C $\beta$  deviation. *Proteins.* 2003;50(3):437-450. Doi: <https://dx.doi.org/10.1002/prot.10286>
- Meades G, Benson BK, Grove A, Waldrop GL. A tale of two functions: enzymatic activity and translational repression by carboxyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(4):1217-1227. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp1079>
- Msanne J, Xu D, Konda AR, Casas-Mollano JA, Awada T, Cahoon EB, *et al.* Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry.* 2012;75:50-59. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.007>
- Olson RJ, Chisholm SW. Effects of light and nitrogen limitation on the cell cycle of the dinoflagellate *Amphidinium carteri*. *J Plankton Res.* 1986;8(4):785-793. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/plankt/8.4.785>
- Pan YY, Wang ST, Chuang LT, Chang YW, Chen CN. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. *Bioresour Technol.* 2011;102(22):10510-10517. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.091>
- Riekhof WR, Sears BB, Benning C. Annotation of Genes Involved in Glycerolipid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discovery of the Betaine Lipid Synthase BTA1Cr. *Eukaryot Cell.* 2005;4(2):242-252. Doi: <https://dx.doi.org/10.1128/EC.4.2.242-252.2005>
- Rismani-Yazdi H, Haznedaroglu BZ, Hsin C, Peccia J. Transcriptomic analysis of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* reveals metabolic insights into triacylglyceride accumulation. *Biotechnol Biofuels.* 2012;5(74):1-16. Doi: <https://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-5-74>
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, *et al.* Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(6):e45. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp045>
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4(4):406-425. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Salie MJ, Thelen JJ. Regulation and structure of the heteromeric acetyl-CoA carboxylase. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2016;1861(9, Part B):1207-1213. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.04.004>
- Sasaki Y, Nagano Y. Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68(6):1175-1184. Doi: <https://dx.doi.org/10.1271/bbb.68.1175>
- Shrivastav A, Mishra SK, Suh WI, Farooq W, Moon M, Kim T-H, *et al.* Characterization of newly isolated oleaginous microalga *Monoraphidium* sp. for lipid production under different conditions. *Algal Res.* 2015;12:289-294. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.015>
- Sievers F, Higgins DG. Clustal omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2014;1079:105-116. Doi: [https://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7\\_6](https://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6)
- Simon P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics.* 2003;19(11):1439-1440.
- Singh P, Guldhe A, Kumari S, Rawat I, Bux F. Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology. *Bioch Engg J.* 2015;94:22-29. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.019>

- Sirikhachornkit A, Suttangkakul A, Vuttipongchaikij S, Juntawong P. De novo transcriptome analysis and gene expression profiling of an oleaginous microalga *Scenedesmus acutus* TISTR8540 during nitrogen deprivation-induced lipid accumulation. *Sci Rep.* 2018;8(1):3668. Doi: <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22080-8>
- Thelen JJ, Ohlrogge JB. The multisubunit acetyl-CoA carboxylase is strongly associated with the chloroplast envelope through non-ionic interactions to the carboxyltransferase subunits. *Arch Biochem Biophys.* 2002;400(2):245-257. Doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00025-5](https://dx.doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00025-5)
- Tong L. Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(5):863-891. Doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00018-012-1096-0>.
- Wang H, Gao L, Shao H, Zhou W, Liu T. Lipid accumulation and metabolic analysis based on transcriptome sequencing of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus* at different growth phases. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2017;40(9):1327-1335. Doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00449-017-1791-1>
- Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(supl\_2):W407-410. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm290>
- Wu Y, Seyedsayamdost MR. The Polyene Natural Product Thailandamide A Inhibits Fatty Acid Biosynthesis in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Biochemistry.* 2018;57(29):4247-4251. Doi: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00678>
- Vaulot D, Olson RJ, Merkel S, Chisholm SW. Cell-cycle response to nutrient starvation in two phytoplankton species, *Thalassiosira weissflogii* and *Hymenomonas carterae*. *Mar Biol.* 1987;95(4):625-630. Doi: <https://dx.doi.org/10.1007/BF00393106>
- Yachdav G, Kloppmann E, Kajan L, Hecht M, Goldberg T, Hamp T, et al. PredictProtein--an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(1):337-343. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gku366>
- Yu X, Zhao P, He C, Li J, Tang X, Zhou J, et al. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresour Technol.* 2012;121:256-262. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.002>
- Zhang W, Wei S, Wu W. Preliminary studies on the antibacterial mechanism of Yanglingmycin. *Pestic Biochem Physiol.* 2018;147:27-31. Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.011>
- Zhang Y, Skolnick J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(7):2302-2309. Doi: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gki524>