

## Uso de tecnologías CRISPR-CAS9 en microalgas aplicado a la obtención de productos biotecnológicos de interés industrial

### Use of CRISPR-CAS9 Technologies in Microalgae to Obtain Highly Demanded Biotechnological Products for the Industry

**Dalia Yirasol Martínez Tapiero<sup>ab</sup>, María Anghela Martínez Rentería<sup>ac</sup>, Judith Elena Camacho Kurmen<sup>ad</sup>**

<sup>a</sup> Semillero de Investigación Bioprocesos y Control, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia

<sup>b</sup> [dyirasolmartinez@unicolmayor.edu.co](mailto:dyirasolmartinez@unicolmayor.edu.co) | <https://orcid.org/0009-0005-7874-1647>

<sup>c</sup> [manghelaamartinez@unicolmayor.edu.co](mailto:manghelaamartinez@unicolmayor.edu.co) | <https://orcid.org/0009-0009-8408-1103>

<sup>d</sup> [jelenacamacho@unicolmayor.edu.co](mailto:jelenacamacho@unicolmayor.edu.co) | <https://orcid.org/0000-0002-9588-9935>

**Citation:** Martínez Tapiero, D. Y., Martínez Rentería, M. A., Camacho Kurmen, J. E. (2024). Uso de tecnologías CRISPR-CAS9 en microalgas aplicado a la obtención de productos biotecnológicos de interés industrial. *Mutis*, 14(1).1- 28. <https://doi.org/10.21789/22561498.2044>

**Recibido:** 16 de agosto de 2023  
**Aceptado:** 21 de noviembre de 2023

**Copyright:** © 2024 por los autores. Licenciado para *Mutis*. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### RESUMEN

Las microalgas se destacan por su capacidad de adaptarse a diferentes medios de cultivo, participación en captura de CO<sub>2</sub> y productos de interés biotecnológico como biocombustibles, proteínas, biofertilizantes, suplementos alimenticios, pigmentos, entre otros. Se han trabajado diferentes tipos de estrés como variación del pH, deficiencia de nutrientes, estrés salino, cambios en la temperatura y alta irradiancia con el fin de aumentar la producción de metabolitos aplicado a diferentes industrias; sin embargo, la demanda de los productos biotecnológicos se ha incrementado ante las necesidades de la población, por lo que el uso de tecnologías de modificación genética ha surgido como una alternativa durante la última década gracias a la capacidad y eficiencia que muestran los métodos como mutagénesis aleatoria, supresión de genes y CRISPR-CAS9. Se propone como objetivo conocer la aplicación del CRISPR-CAS9 en microalgas relacionado con la obtención de productos biotecnológicos de interés industrial. Se determinó que esta tecnología aplicada en las microalgas con uso industrial incrementa la obtención de productos de interés biotecnológico como lípidos, carotenoides, proteínas y enzimas recombinantes.

**Palabras clave:** microalga; tecnologías de modificación genética; CRISPR-CAS9; metabolitos; productos biotecnológicos; ciencias naturales.

#### ABSTRACT

Microalgae stand out due to their ability to adapt to different cultivation environments and capture CO<sub>2</sub> and products of biotechnological interest such as biofuels, proteins, biofertilizers, food supplements, pigments, among others. Different types of stress have been used in different industries such as pH variation, nutrient deficiency, salt stress, changes in temperature and high irradiance in order to increase the production of metabolites. However, the demand for biotechnological products has increased due to the needs of the population. For this reason, the use of genetic modification technologies has emerged during the last decade as an alternative, thanks to the capacity and efficiency shown by methods such as random mutagenesis, gene deletion and CRISPR-CAS9. The objective of this research is to apply CRISPR-CAS9 in

microalgae to obtain biotechnological products that are highly demanded by the industry. The results revealed that applying this technology to microalgae for industrial use increases the production of highly demanded biotechnological products such as lipids, carotenoids, proteins and recombinant enzymes.

**Keywords:** Microalgae; CRISPR-CAS9; genetic modification technologies; Metabolites; Biotechnological products; Natural sciences.

## INTRODUCCIÓN

El término de microalga se refiere a aquellos microorganismos que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos capaces de realizar fotosíntesis oxigénica (Gomez, 2007). Se definen como organismos unicelulares fotosintéticos que habitan en diversos ecosistemas acuáticos y terrestres, y que se han convertido en objeto de estudio debido a su capacidad para producir una amplia variedad de biomasa y metabolitos de interés industrial y biotecnológico (Porta, 2021), con aplicación en la producción de biocombustibles, biomateriales y bioproductos útiles en diferentes industrias como la farmacéutica, alimentaria, nutracéutica, cosmética, piscícola y textil, reduciendo las concentraciones atmosféricas de CO<sub>2</sub> al utilizarlo como fuente de carbono a través de la fotosíntesis (Machado et al., 2021; Xu et al., 2015). Son organismos microscópicos ancestrales de origen polifilético indicando que no pertenecen a un solo ancestro común (Galarza, 2019), además de representar una gran biodiversidad de, por lo menos, 40 000 especies ya descritas y analizadas (Safi et al., 2014).

El uso de microalgas posee grandes ventajas gracias a la alta capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> que puede minimizar los costos asociados al tratamiento de gases de combustión (Anjos et al., 2013), o la producción de biofertilizantes como alternativas biotecnológicas sostenibles (Araujo y Collahuazo, 2019), y la obtención de diferentes metabolitos aplicables a industrias alimenticias, de cosméticos, de biofertilizantes, de biocombustibles, de fármacos, de producción de biomasa y de bioremediación. El biocombustible de algas, incluidos el bioetanol, el biogás, el biohidrógeno, el biodiesel y el bioaceite, se ha convertido en una solución ecológica, limpia y rentable para otros combustibles (Machado et al., 2021)

El interés de varias industrias hacia la producción de alimentos, nutracéuticos, pigmentos, cosméticos, proteínas, sustancias bioactivas y productos farmacéuticos obtenidos de microalgas ha aumentado la demanda de sus bioproductos (Patel et al., 2019; Machado et al., 2021). Además, su empleo se puede ver reflejado en la agricultura gracias a su contenido de compuestos bioactivos que se utilizan en la alimentación animal (Machado et al., 2021) o en la ingesta humana (Labbé, 2014). La versatilidad de las microalgas para adaptarse a diferentes medios de crecimiento, ya sea agua dulce o salada, y su capacidad para crecer tanto en condiciones *in vivo* o *in vitro*, incluso bajo condiciones de estrés como modificación del pH, luz artificial, tipo de cultivo y temperatura (Shah et al., 2016; Kong et al., 2021). Además, las microalgas también desempeñan un papel importante en los procesos ecológicos como tratamiento de aguas residuales (Zambrano et al., 2023) y absorción de metales (Jiang et al., 2023; Kong et al., 2021).

Debido a la utilidad industrial de las microalgas, se han ido empleando tecnologías que ayuden a una mayor obtención de productos que favorezcan a este sector industrial, entre ellos las tecnologías de modificación genética como la expresión de genes, mutagénesis dirigida, supresión de genes (*knock down*) y el CRISPR-CAS9, siendo

esta última una tecnología que surge de los estudios sobre la respuesta inmune adaptativa de los organismos procariotas (Li et al., 2022; Zhang et al., 2020). En particular, CRISPR (repeticiones cortas palindrómicas agrupadas y regularmente interespaciadas) es un locus que actúa como "archivador" de segmentos de los DNA extraños que infecta a las bacterias y arqueas.

La tecnología CRISPR-CAS9 se ha evaluado en mamíferos y plantas para su modificación genética obteniendo resultados eficaces (Uddin et al., 2020). Con esta tecnología se pueden realizar modificaciones genéticas en el DNA de interés de una manera específica, colocándose como una de las tecnologías usadas a nivel industrial para la modificación genética de microalgas y la obtención de sus bioproductos (Li et al., 2022). Actualmente, muchas empresas optan por el uso de CRISPR-CAS9 para la modificación genética de algas debido a la versatilidad y eficiencia permitiendo la edición de más de un gen de interés (Chang et al., 2020; Li y Ng et al., 2020; Spicer & Molnar, 2018).

La edición del genoma es crucial para la ingeniería genética de organismos para mejorar los rasgos, particularmente en microalgas debido a la necesidad urgente de producción de biocombustibles de próxima generación. Las microalgas se han convertido en las materias primas de biocombustibles de tercera generación que son excelentes fuentes de energía renovable y sostenible para el futuro. Su uso nos permitiría reemplazar los actuales combustibles fósiles a los que se ha atribuido graves problemas ambientales, entre ellos la contaminación en suelos, aguas superficiales y subterráneas consecuencia de la formación de lluvias ácidas y del aumento de sequías y también de inundaciones, además del calentamiento global, potenciando el efecto invernadero (Shin et al., 2016).

Con la implementación de las tecnologías de modificación genética se han obtenido resultados favorables que benefician ampliamente a las industrias biotecnológicas; CRISPR-CAS9 es una de estas, realizando modificaciones genéticas específicas con resultados esperados. El caso de *Chlorella vulgaris*, estudio en el cual se realizaron modificaciones en el gen FAD3 (Acido Graso Desaturasa 3), encargado de la producción de lípidos. Mediante la tecnología de CRISPR se obtuvo un incremento de 95% en la producción de lípidos en el laboratorio (Lin & Ng, 2020).

Por otro lado, en el caso de *Nannochloropsis oceanica*, donde se realizó una supresión de genes mediada por CRISPR-CAS9, se suprimió el gen NR (Nitrato Reductasa) encargado de la conversión de nitrato a nitrito, afectando el crecimiento de la microalga. Además, la eliminación de 5pb disminuyó el crecimiento y la capacidad de asimilación del nitrato sódico (Wang et al., 2016).

En *Tetraselmis sp* se realizó una mutación del gen AGP (proteína arabinogalactano), el cual cumple funciones de regulación en el flujo de carbono. El estudio se centró en el silenciamiento del gen AGP para cambiar el flujo de carbono y guiarlo hacia acumulación del almidón e incrementar producción de ácidos grasos para su uso en biocombustibles. En el estudio realizado la mutación del gen fue efectiva al incrementar la acumulación de ácidos grasos para uso industrial (Chang et al., 2020).

Por estas razones, el objetivo de este artículo es conocer la aplicación del CRISPR-CAS9 en microalgas relacionado con la obtención de productos biotecnológicos de interés industrial. Para ello se determinarán las microalgas con aplicación industrial y sus productos de interés industrial y el área de aplicación. Se analizarán los protocolos

y métodos experimentales para aplicación de CRISPR-CAS9 en microalgas, relacionadas con la obtención de productos de interés industrial, identificando el área principal que requiere más atención para mejorar su eficiencia. También se enfatizará en las microalgas *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella vulgaris*.

Los datos fueron analizados usando Excel 2016 con diferentes variables por analizar, incluyendo año de publicación, idioma, temas de estudio y enfoque del estudio. Finalmente, se acudió a estadística descriptiva para analizar los resultados, y los indicadores bibliométricos analizados y utilizados fueron citación, contenido y metodología (figuras 1, 2 y 3).

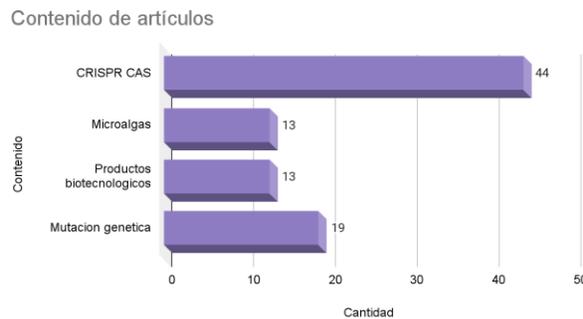
El 76,34% de las publicaciones revisadas se encuentran en el período de tiempo comprendido entre el 2016 y el 2023, incluyendo dentro de estos 88 artículos y un libro.

**Figura 1.** Relación de publicaciones revisadas por año de publicación



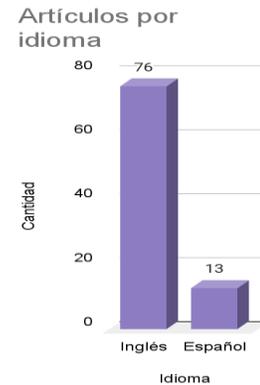
Fuente: Elaboración propia.

**Figura 2.** Contenido y metodología revisadas



Fuente: Elaboración propia.

**Figura 3.** Idioma de las publicaciones



Fuente: Elaboración propia.

Respecto al indicador de colaboración, en los 89 artículos revisados se relacionan 321 autores en total, respecto a los temas de interés. Para el caso del indicador de citación, el artículo titulado *Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-CAS system*, de Zetsche et al. (2015) presenta la mayor citación, con un valor de 3 992 citaciones. Se encontró en los artículos revisados que solo un 6.5% no presentaban todavía citación.

### SISTEMA CRISPR-CAS9

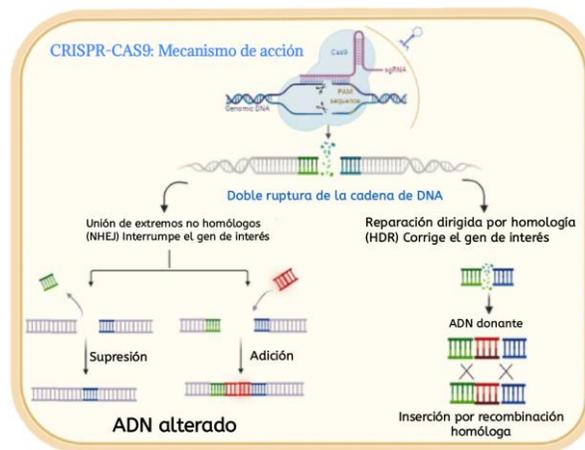
CRISPR-CAS9 es una tecnología de modificación genética con capacidad de adaptación, biogénesis e interferencia (Esquivel et al., 2022) que se compone de una proteína Cas endonucleasa, que infringe en las dos cadenas de DNA, y el RNA guía, que marcará el punto de unión para la proteína Cas9. La proteína Cas cumple la función de localizar y descomponer el material genético invasor, lo cual ocurre tanto en sistemas artificiales como naturales. Para el desempeño de su función cuenta con seis dominios: REC I, REC II, Bridge Helix (Rico en Arginina), PAM (Motivo Adyacente al Protoespaciador), HNH (dominio proteico asociado a CRISPR-CAS9, histidina, asparagina e histidina) y RuvC (proteína catalítica del DNA) (Jiang et al., 2014). REC I es el dominio más grande de la proteína Cas y se destaca por permitir la unión del RNA guía. Bridge Helix (abundante en el aminoácido arginina) es quien se encarga del inicio de la incisión del DNA invasor. El siguiente dominio PAM confiere la especificidad de la unión al material genético que se desea romper; por último, los dominios HNH y RuvC son quienes se encargan de la eliminación del ácido nucleico. CRISPR fue descrita después de estudios del sistema inmune en las bacterias en los años 80 por unos científicos japoneses (Ishino et al., 1987); además, el complejo CRISPR tiene la capacidad de transcribir y procesar la información de los DNA invasores dado por bacteriófagos y por plásmidos (Tian et al., 2017).

El CRISPR-CAS9 está compuesto por CRRNA y TRACRRNA, donde CRRNA tiene como fin guiar la proteína CAS9 a su sitio de unión e iniciar una fractura del ácido nucleico (Tian et al., 2017). En un principio se transcriben los PRECRRNA inmaduros como estructuras largas con repeticiones de información genética obtenido del DNA invasor; acá es donde el TRACRRNA desempeña un papel importante al eliminar las repeticiones pertenecientes a PRECRRNA, contribuyendo a su maduración y a unirse al CRRNA en un complejo duplex CRRNA-TRACRRNA único denominado como RNA guía (sgrRNA) (Liao &

Beisel, 2021; Tian et al., 2017). Una vez formado el RNA guía, este se unirá a la proteína CAS para realizar la degradación del material genético que se desea eliminar (Burmistrz et al., 2020; Tian et al., 2017).

Una vez la proteína CAS hace la incisión en el material genético hay dos alternativas: NHEJ (unión de extremos no homólogos) o HDR (reparación unida por homología) (Liu et al., 2019; Shams et al., 2022). La primera ocurre de manera natural durante el ciclo celular en caso de errores en la transcripción del DNA; sin embargo, da paso a mutaciones o pérdida de nucleótidos adicionales, por lo que es poco usado en ingeniería genética (Tian et al., 2017). El otro método repara el DNA mediante la inserción de una pieza homóloga presente en el medio para ser usada como plantilla y continuar con la transcripción del material genético (Figura 4) (Chen et al., 2022).

**Figura 4.** Mecanismo de acción CRISPR-CAS9



Fuente: Bharathkumar et al. (2022)

### TIPOS DE SISTEMAS CRISPR

La historia del CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciada) se puede rastrear gracias a Ishino y colaboradores desde la década de 1980 con el descubrimiento de una particular repetición corta en el genoma de *E. coli*. CRISPR es un sistema de defensa e inmunidad genética adaptativo mayormente arqueas y varias bacterias que actúan como protección contra los fagos y otros elementos genéticos móviles (Van der Oost et al., 2009) Debido a la rápida evolución y variabilidad de este método, su clasificación no ha sido sencilla. En un principio se utilizó una clasificación propuesta en el 2005 por Daniel H Haft y colaboradores que se basó en el análisis de 40 genomas bacterianos y arqueales (Haft et al., 2005), pero dada la ausencia de genes CAS universales y la frecuente recombinación celular en investigaciones más recientes se ha optado por un enfoque múltiple para la clasificación de los sistemas CRISPR-CAS9 dividiéndolos en dos clases distintas caracterizadas por diferentes principios del diseño del módulo efector (Koonin et al., 2017); la nueva clasificación incluye 2 clases, 6 tipos y 33 subtipos.

Los efectores de la clase 1 utilizan complejos multiproteicos, mientras que los efectores de la clase 2 dependen de proteínas efectoras de un solo componente (Zetsche et al., 2015). A su vez, en cada clase podemos encontrar diferentes tipos: en la clase 1 se incluyen los tipos I y III, que son dominante en arqueas, además de un tipo

considerado peculiar IV que incluye loci rudimentarios de CRISPR-CAS9 que carecen del módulo de adaptación (Patel et al., 2019). Los complejos efectores de CRISPR-CAS9 tipo I y tipo III son estructuras complejas que forman parte de los sistemas de defensa bacteriana. Estos complejos contienen subunidades proteicas, incluyendo proteínas RAMP (proteínas asociadas a repetición) como CAS7 y CAS5 (estas unidades forman la columna vertebral en el complejo), que interactúan con el RNA guía, el cual consiste en una secuencia espaciadora y una repetición. La subunidad CAS5 se une al extremo 5' del RNA guía y se conecta con una subunidad "grande" (CAS8 en tipo I, CAS10 en tipo III). Varias subunidades "pequeñas" se unen al RNA guía y se relacionan con el número de repeticiones presentes. Aunque hay diferencias en las secuencias proteicas, se cree que estos complejos tienen un origen común debido a similitudes estructurales (Koonin et al., 2017).

El tipo I de CRISPR-CAS9 contiene principalmente el gen CAS3, que codifica una proteína grande con actividades de helicasa y DNASA. Igualmente, se han identificado proteínas como CAS4, CAS5, CAS6 y CAS7, que forman complejos de la superfamilia RAMP (Makarova et al., 2006; Patel et al., 2019). El tipo IV se compone primordialmente por las proteínas CAS5 y CAS7, en cuyo tipo también se han caracterizado otras proteínas como la CAS11 (Patel et al., 2019), para el caso de los sistemas tipo III (Kolesnik et al. 2021) que, se considera, podrían ser los más antiguos de todos los sistemas CRISPR-CAS9.

Los módulos efectores de la clase 2 tienen una única proteína de unión al RNAR multidominio que es funcionalmente análoga a todo el complejo efector de la clase 1 (Makarova et al., 2020), mientras que los sistemas CRISPR-CAS9 clase 1 utilizan varias proteínas CAS y el CRRNA (RNA pequeño de transactivación de CRISPR) para formar complejos, los sistemas CRISPR-CAS9 clase 2 emplean una gran proteína CAS de un solo componente junto con CRRNA para mediar la interferencia (Zetsche et al., 2015). Este sistema CRISPR-CAS9 de clase 2 cuenta con tres tipos: II, V y VI, cada uno de los cuales se destaca por poseer estructuras distintas en sus módulos efector, los cuales contienen proteínas únicas que los identifican. Los complejos efectores de tipo II incluyen tres genes centrales: CAS1, CAS2, y la endonucleasa efectora CAS9, además del RNA transactivación de CRISPR (CRRNA) que se complementa a la secuencia de repetición CRISPR (Bernheim et al., 2017). En el tipo V se presenta una proteína efectora CPF1, la cual es una endonucleasa activa guiada por RNA que funciona aplicando algunos de los organismos en lugar de la CAS9; a diferencia de CAS9, CPF1 no depende del RNA transactivador de CRISPR (tracr) para llevar a cabo el proceso de corte del objetivo (Koonin et al., 2017). El tipo VI tiene tres subtipos con dos dominios HEPN que predicen la actividad de RNASA. (Patel et al., 2019).

### MODIFICACION GENETICA EN MICROALGAS

Entre las microalgas ampliamente usadas para aplicación industrial por sus bioproductos o su aplicación directa para la producción de biomasa, como la *Spirulina sp.* (Das, 2016) o el desarrollo de biofiltros se encuentran *Nannochloropsis sp.* (Wang et al., 2016), *H. pluvialis* (Camacho Kurmen et al., 2013; Shah et al., 2016; Gómez et al., 2019), *C. vulgaris* (Kim et al., 2021; Li et al., 2022), *Dunaliella sp.* (Hu et al., 2021) y *Chlamydomonas reinhardtii* (Kelterborn et al., 2022). Estos microorganismos cuentan con una gran capacidad de adaptabilidad convirtiéndose en huéspedes prometedores para producir compuestos de valor biotecnológico o expresar proteínas terapéuticas (Kim et al., 2021).

Se ha realizado actualmente la aplicación de tecnologías de modificación genética cómo la expresión de genes, mutagénesis dirigida, supresión de genes (knock down) y el CRISPR-CAS9. La expresión de genes es usada, por ejemplo, combinando factores de estrés como deficiencia de nutrientes, estrés salino, cambio de temperatura y alta irradiancia para aumentar la producción de astaxantina en *H. pluvialis* (Gómez et al., 2019; Miranda et al., 2019; Ahirwar et al., 2021) o la mutagénesis aleatoria, la cual se basa en acelerar procesos naturales al exponer el microorganismo a agentes mutagénicos (físicos o químicos) que generan cambios en las cadenas de DNA de manera aleatoria para generar una mayor variabilidad genética en el microorganismo. Gracias a CRISPR-CAS9 se pueden realizar cambios en nucleótidos, inserciones, deleciones o una reorganización del DNA (Trovão et al., 2022). La supresión de genes (*knock down*) es una técnica de biología molecular en donde se inhibe la expresión de genes o se reduce la expresión de un gen específico para la modulación de expresión (Kühn, 2009); esta técnica se puede realizar mediante la tecnología CRISPR-CAS9 (Dalvie et al., 2022) al eliminar un gen sin necesidad de marcadores selectivos.

También se puede realizar la supresión de genes por medio de RNAi (Han, 2018) o CRISPR-CAS9, una herramienta de modificación genética que se ha popularizado para la modificación específica de uno o más genes. Se ha empleado la tecnología CRISPR-CAS9 para la eliminación de genes o inserción de los mismos (Zhu, 2022) para generar en las microalgas una producción mejorada de biomasa o la mayor producción de bioproductos o biomateriales de importancia industrial, como productos farmacéuticos, nutracéuticos, pigmentos, moléculas bioactivas para llevarlos a escalamiento industrial (Patel et al., 2019).

**Tabla 1.** Microalgas de interés industrial y la tecnología de modificación genética.

Microalga	Tecnología genómica	Productos biotecnológicos	Aplicación industrial	Bibliografía
<i>Chlorella</i> sp	Mutación aleatoria	Lípidos	Biocombustibles, Biodiesel	Trovão et al. (2022)
<i>C. reinhardtii</i>	Knockout - RNAi	Lípidos	Biodiesel, biocombustibles	Kao y Ng, 2017; Luo et al., 2021)
<i>C. reinhardtii</i>	Expresión genes BKT	Carotenoides - ketoluteína y adonixantina	farmacéutica, alimentaria, cosmética, nutraceutica, acuicultura, avícola y textil	Patel et al. (2019)
<i>Chlamydomona</i> sp.	CRISPR -CAS	Lípidos	Biodiesel	Shin et al. (2019)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Knockout - RNAi	Lípidos	Biodiesel	Wei et al. (2017)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Expresión de genes BKT	Carotenoides: Astaxantina	Antioxidante y pigmento	Yue Yang et al., (2011); Gómez et al. (2019)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Mutagénesis aleatoria	Proteínas	Suplemento alimentario y aplicación nutracéutica	Schüler et al. (2020)
<i>Chlorella</i> sp.	Knockout	Proteínas recombinantes	Farmacéutica (vacunas, proteínas terapéuticas y anticuerpos)	Kim et al. (2023)
<i>Chlorella vulgaris</i>	CRISPR-CAS9	Lípidos	Biodiesel y aplicación industrial	Lin et al (2020)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Expresión de genes	Carotenoides y astaxantina	farmacéutica, alimentaria, cosmética, nutraceutica, acuicultura, avícola y textil	Patel et al. (2019)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	CRISPR-CAS9	Lípidos	Biodiesel	Wang et al. (2016)
<i>Dunaliella salina</i>	Mutagenesis	Carotenoides-Zeaxantina	farmacéutica, alimentaria, cosmética, nutraceutica, acuicultura, avícola y textil	Mendoza et al. (2008); Patel et al. (2019)
<i>Dunaliella salina</i>	Ingeniería genética	Enzimas recombinantes	Farmacéutica (vacunas, proteínas terapéuticas y anticuerpos)	Georgiana et al. (2013)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Ingeniería genética	Xylanasa, $\alpha$ -galactosidasa, fitasa, fosfato anidrolasa, y $\beta$ -mananas	farmacéutica, alimentaria, cosmética, alimentación animal	Georgiana et al. (2013)

Se puede observar que las aplicaciones industriales más frecuentes corresponden a la producción de lípidos para la obtención de biocombustibles, ya que son amigables con el medio ambiente y no presentan toxicidad. También se encuentra la producción de carotenoides utilizados como pigmentos y compuestos bioactivos con aplicación en industrias como la farmacéutica, alimentaria, cosmética, nutraceutica, acuicultura, avícola y textil (Yue Yang et al., 2011; Shah et al., 2016; Gómez et al., 2019; Ahirwar et al., 2021). Otro producto de interés en el que se puede incrementar su producción por la aplicación de tecnologías genéticas es la producción de enzimas y proteínas recombinantes para escalar su producción a nivel industrial utilizando biorreactores (Georgiana et al., 2013; Patel et al. 2019; Kim et al., 2023).

La obtención de lípidos de microalgas, enfocada en la producción en masa de biocombustibles deriva en la obtención de biodiesel, cuyas características se destacan por tener un mejor rendimiento del motor en comparación con el obtenido por petróleo. Además, el biodiesel obtenido de microalgas genera una menor emisión de azufres y otras partículas (Tiware & Kiran, 2018). Con el cambio climático y las afectaciones que tienen los métodos tradicionales se han empleado tecnologías más amigables con el medio ambiente para la obtención de biodiesel a partir de microalgas. Sin embargo, las condiciones de estrés empleadas no dan cobertura suficiente para la obtención del

combustible, por lo que se han implementado técnicas de modificación genética, como expresión de genes, ingeniería genética, mutagénesis, la supresión de genes (Knockout o Knockdown) y la alteración de las vías metabólicas o CRISPR-CAS9, obteniendo resultados favorables (Lakhawat et al., 2022; Sharma et al., 2018; Lin et al., 2020).

## MECANISMOS CRISPR-CAS9 EN MICROALGAS

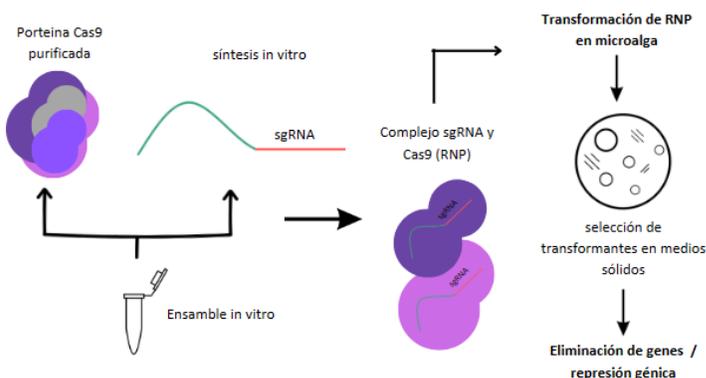
### Secuencias pam para mejorar la eficiencia de cas9

La precisión de la actividad CRISPR-CAS9 DSB requiere la presencia de los motivos adyacentes de protoespaciadores (PAM) que sirve como un sitio esencial para que el complejo CRISPR-CAS9-sgRNA aterrice en el DNA protoespaciador específico (Zhang et al., 2016). Los motivos adyacentes de protoespaciadores (PAM) restringen la densidad de las secuencias de reconocimiento en el DNA objetivo (Edraki et al., 2019; Lin et al., 2020), y son utilizadas debido a que la capacidad de las nucleasas CRISPR-CAS9 para reconocer secuencias está limitada por la presencia de PAM, cuya restricción dificulta la precisión necesaria para generar roturas de doble cadena (DBS) en diversas aplicaciones de edición genómica (Kleinstiver et al., 2015). Por esta razón se utilizan derivados de CAS9 con especificidades de PAM alteradas de manera intencional con el fin de ampliar el rango de secuencias.

### Enfoque basado en RNP

Las RNP (ribonucleoproteína) son complejos formados por RNA y proteínas que desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión génica y en diversos procesos celulares. Esta tecnología utiliza proteínas Cas9 purificada y gRNA sintetizada *in vitro*, las cuales se ensamblan previamente *in vitro* y se entregan directamente a las células de las microalgas, ya sea mediante electroporación o por método biolístico (Patel et al., 2019). La principal ventaja de los CAS9-RNP es ofrecer una función transitoria del complejo CAS9/sgRNA con menos incidencias de efectos fuera del objetivo (Ng et al., 2020). Otro rasgo distintivo de este mecanismo es la evasión de citotoxicidad y el desvío asociado con la expresión de CAS9 impulsada por vectores, como se ha visto en investigaciones realizadas por Shin et al. (2016), en donde se informaron mutaciones inducidas por CRISPR-CAS9 en los loci MAA7, CpSRP43 y ChIM de la microalga *C. reinhardtii* mediante la entrega de CAS9 RNP a través de electroporación. Este mecanismo reportó ser más simple que otros; sin embargo, requieren procesos estrictos de control de calidad (Figura 5).

Figura 5. Enfoque basado en RNP



Fuente: Elaboración propia

### **Regulación génica mediada por CRISPR/dCAS9**

La estrategia CRISPR-CAS9 de unir el DNA objetivo con un CAS9 deficiente de nucleasa (dCas9), generando un sistema llamado CRISPRi-dCAS9 para la represión génica dirigida, funciona como una herramienta flexible en la regulación de la expresión de genes en microorganismos fotosintéticos (Ng et al., 2020). En este sistema las proteínas CAS9 (dCAS9) catalíticamente inactivas guiadas por gRNAs permiten la localización de dominios efectores para reprimir o activar la transcripción génica sin modificar el DNA (Xu et al., 2023). dCAS9 puede unirse al sitio objetivo sin cortar el DNA, y esto puede interferir con procesos celulares, incluida la transcripción (Jeon et al., 2017). Esta técnica se ha demostrado en *C. reinhardtii* reduciendo la expresión de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), la cual es fundamental en la regulación del flujo de carbono que ingresa al ciclo del TCA (ciclo de ácido tricarbóxico), teniendo un rol vital al distribuir el carbono proveniente de distintos sustratos, compitiendo con la síntesis de lípidos (Kao & Ng, 2017). El sistema CRISPRi-dCAS9 proporciona una herramienta genética simple pero poderosa para controlar la expresión de genes objetivo (Dhamad & Lessner, 2020)

### **Aplicación de CRISPR-CAS9 en microalgas**

CRISPR-CAS9 se ha adaptado ampliamente para reorganizar las vías metabólicas de las microalgas (Zhang et al., 2019), en específico el sistema CRISPR-CAS9 de tipo II que se ha establecido con éxito en animales y vegetales (Musunuru et al., 2021). Esta tecnología eficaz muestra estar en auge con respecto a la edición genómica de estas algas microscópicas; sin embargo, la edición precisa del genoma de las algas industriales utilizando esta tecnología requiere de evoluciones en términos de entrega de DNA y mejora de las eficiencias de edición. En los últimos años se ha observado el uso de este sistema en la eliminación e inserción de genes, lo que permite manifestar la función de genes involucrados en la producción de lípidos u otros metabolitos como los carotenoides. En la tabla 2 se proporciona una lista de diferentes microalgas y genes editados mediante la tecnología de CRISPR-CAS9.

**Tabla 2.** Aplicación de tecnología CRISPR-CAS9 en microalgas.

Microalga	Método de edición	Gen blanco	Ventajas (contribución a mejorar producción)	Desventaja	Autor
<i>Chlorella vulgaris</i>	CAS9 RNP	NR y APT	Incremento en un 46% de la acumulación de lípidos	Expresión ineficaz de los genes	Kim et al. (2021)
<i>Chlorella vulgaris</i>	CRISPR-CAS9 se puede verificar por PCR de sgRNA	FAD3	Incremento de lípidos del 95,5 % al 146,3%		Lin & Ng (2020)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CAS9 RNP	MAA7, CpSRP43 y ChLM	Mejoró la eficiencia mutagénica y la especificidad del sistema CRISPR-CAS9 en los loci MAA7, CpSRP43 y ChLM		Shin et al. (2016)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Mediado por vectores	FKB12		Puede presentar citotoxicidad	Jiang et al. (2014)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CAS9/gRNA RNP	genes fotorreceptores COP1/2, COP3, COP4, COP5, PHOT, UVR8, VGCC, MAT3 y ACRY	Contribución a la comprensión de los mecanismos de percepción de la luz en esta especie.	La baja eficiencia de recombinación del DNA en <i>Chlamydomonas</i> sp. hace que el aislamiento de mutantes que carecen de fenotipos recién adquiridos fácilmente determinables sea problemático.	Greiner et al. (2017)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CAS9 RNP	CpFTSY y ZEP	Generación de una cepa que produce zeaxantina y muestra una productividad fotosintética mejorada		Baek et al. (2016)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CRISPR-CAS9	ARG, ALS, FKB12	posible desarrollo células de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> que sean resistentes al herbicida sulfometurón metilo	La expresión constitutiva de un gen Cas9 en <i>Chlamydomonas</i> puede ser letal para la célula.	Jiang & Weeks (2017)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CRISPR se puede verificar por Panel de superposición abierto	RFP y PEPC1	incremento en la producción de lípidos y la productividad		Kao & Ng (2017)
<i>Coccomyxa sp. cepa KJ</i>	CAS9 RNP	FTSY	Incremento de la productividad lipídica	Se limita a genes fácilmente detectables	Yoshimitsu et al. (2018)
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	CRISPR-CAS9	IMET1 NR		La eficiencia y la especificidad del método pueden mejorarse optimizando el diseño del vector o ajustando los parámetros del RNAg	Wang et al. (2016)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	CRISPR-CAS9	Regulador transcripcional NcGL0184	Duplicación de lípidos		Ajjawi et al. (2017)
<i>Phaeodactylum tricoratum</i>	CRISPR-CAS9 se puede verificar por PCR basados en fusión de alta resolución	CpSRP54			Nymark et al. (2016)
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	CRISPR-CAS9 se puede verificar por secuenciación sanger	Ureasa	Deleción del gen ureasa con una eficiencia de edición del 61.5%		Hopes et al. (2016)

<i>Tetraselmis sp</i>	CAS9 RNP	gen AGP (proteína arabinogalactano)	Aumento la producción de lípidos en un $\pm 148.72$ mg/g		Chang et al. (2020)
-----------------------	----------	-------------------------------------	--	--	---------------------

Fuente: Elaboración propia

Estas metodologías mejoran la producción de productos biotecnológicos de interés comercial en microalgas; sin embargo, es importante tener en cuenta que existen varias restricciones para la comercialización de productos naturales derivados de organismos genéticamente modificados (OGM), aplicando el principio de precaución. Estas restricciones deben abordarse antes de intentar un uso comercial para cepas genéticamente modificadas (Ren et al., 2021).

En este contexto, se han realizado investigaciones sobre dos especies de microalgas en particular: *C. vulgaris* y *H. pluvialis*. Estas microalgas se destacan por sus características distintivas y el potencial que ofrecen para la producción de compuestos bioactivos y antioxidantes. En este artículo se explorará en detalle la definición y el papel del sistema CRISPR-CAS9 en estas microalgas, así como las posibles aplicaciones y desafíos asociados con su manipulación genética para aprovechar su potencial biotecnológico.

### *Chlorella vulgaris*

Es una microalga unicelular que crece en agua fresca y se ha presentado en la tierra desde hace más de 2.5 billones de años, además de ser la primera microalga descrita con un núcleo definido (Safi et al., 2014). *C. vulgaris* es una microalga verde que mide aproximadamente 2 a 10  $\mu\text{m}$  perteneciente a la familia *Chlorellaceae*; este microorganismo se encuentra habitualmente en agua dulce, posee cloroplastos que serán de gran interés en crecimiento bajo estrés lumínico, ya que cuenta con una alta adaptabilidad a diferentes medios de crecimiento (autótrofos, heterótrofos, mixotrófico y foto biorreactor), en donde los últimos tienen una mayor cantidad de biomasa que puede ser posteriormente usada para la producción de biodiesel. Esta microalga es más conocida por la síntesis de proteínas para ser usado como suplemento dietético en humano por lo que es uno de los metabolitos más usados a nivel industrial (Coronado Reyes et al., 2022). Además, es de rápido crecimiento y puede desarrollarse de manera individual o formando colonias de más de 50 microalgas y no cuenta con algún tipo de proyección en su pared celular para moverse en los medios de crecimiento.

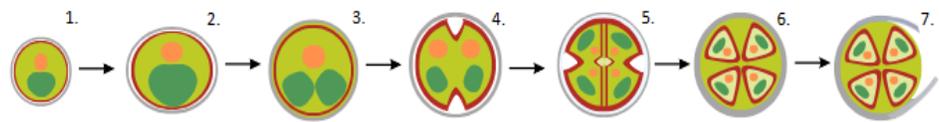
A pesar de las ventajas de *Chlorella sp.*, la inestabilidad de la expresión de proteínas y el rendimiento de producción relativamente bajo de productos químicos de alto valor impiden la expansión de su uso comercial. (Kim et al., 2021). Para aumentar el valor industrial y biotecnológico de *Chlorella sp.*, muchas industrias han optado por usar tecnologías tales como la de CRISPR-CAS9 con el fin de mejorar en la ingeniería genética de las microalgas, debido a la versatilidad de la misma.

*C.vulgaris* es una microalga con una estructura celular completa, incluyendo pared celular, mitocondrias y cloroplastos. Estos últimos contienen clorofila a y b, permitiendo obtener energía autótrofamente a partir de la radiación. También

contiene carotenoides y fitobilinas. El cloroplasto tiene dos paredes una permeable para metabolitos e iones y otra selectiva para el transporte de proteínas. En él se almacenan pigmentos, principalmente clorofila, aunque también pueden estar presentes otros como la luteína, especialmente durante el estrés por falta de nitrógeno. La pared celular es crucial para su defensa frente a factores bióticos y metabólicos para obtener energía durante su crecimiento (Coronado Reyes et al., 2022).

El crecimiento de *C. vulgaris* puede dividirse en 7 diferentes fases en un período de 24 horas, iniciando así: 1. Crecimiento celular temprano; 2. Crecimiento celular tardío y producción de pared celular para la célula hija; 3. División del cloroplasto; 4. La división del protoplasto, y la pared celular empieza a dividirse; 5. División de protoplasto tardía, creación de las cuatro células hijas; 6. Maduración de las células hijas debidamente divididas con sus orgánulos; y 7. Fase de eclosión de la célula madre para la liberación de las cuatro células hijas. Esto se puede apreciar en la figura 6 (Coronado Reyes et al., 2022).

**Figura 6.** Ciclo de vida *C. vulgaris*

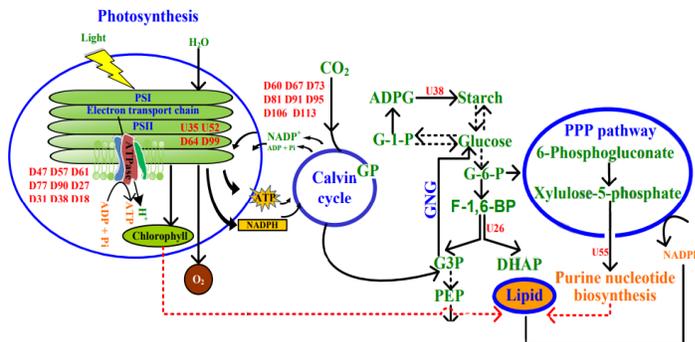


Fuente: Elaboración propia

*C. vulgaris* es una microalga cuyos metabolitos primarios constan de proteínas, lípidos y pigmentos, lo cual la hace interesante por todos estos bioproductos que se aplican en diferentes industrias, como la alimentaria, farmacéutica y cosmética gracias a su consumo humano seguro. Al ser una microalga fototrófica, obtiene sus metabolitos a partir de los fotones de la luz y el uso de CO<sub>2</sub>; sin embargo, se pueden realizar cambios en los cultivos de esta microalga para potenciar diferentes rutas metabólicas (Coronado-Reyes et al., 2022). Los metabolitos obtenidos a partir de la microalga sin condiciones de estrés se clasifican de la siguiente manera: en mayor concentración son las proteínas con una obtención de 42-58% del peso seco, seguidas de los lípidos con concentraciones de 5-40%, finalizando con los pigmentos representando 1-2% del peso seco (Coronado-Reyes et al., 2022). *C.vulgaris* también produce carbohidratos, minerales y vitaminas, pero para el interés de este artículo se ha decidido trabajar con los tres primeros mencionados.

La síntesis de lípidos ocurre en el cloroplasto a partir de NADPH y acetil-CoA, derivados del glicólisis y la vía pentosa fosfato, respectivamente. La acetil-CoA se convierte en malonil-CoA y luego se une a un cofactor proteico ACP, formando Malonil-ACP. Este complejo se involucra en reacciones de condensación con acil-ACP y acetil-CoA para sintetizar ácidos grasos de 16 a 18 carbonos. Una vez formados, los ácidos grasos se transportan y utilizan en diversas funciones, como la formación de membranas y la acumulación de lípidos y triglicéridos (Figura 7) (Castillo et al., 2017).

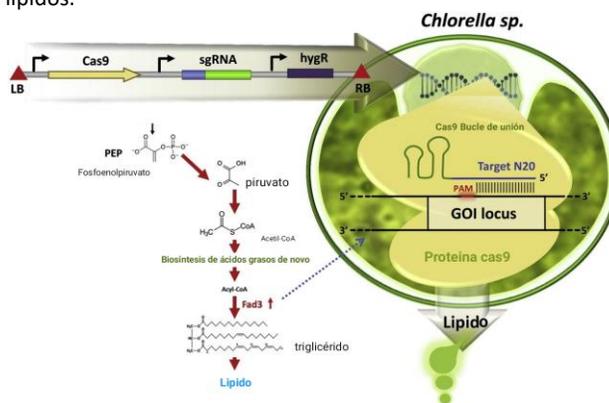
**Figura 7.** Ruta de biosíntesis de lípidos a partir de *Chlorella* sp.



Fuente: Li et al. (2015)

Según Kim et al. (2021), entre los medios de transformación genética, CRISPR-CAS9 ha demostrado ser una tecnología funcional para el caso de esta microalga. Mediante el uso de CAS9 RNP en investigaciones, se ha demostrado un incremento del 46% en la acumulación de lípidos (Tabla 2) de la microalga, logrando así reducir la inserción de genes extraños a diferencia de otros métodos que utilizan el gen de resistencia a antibióticos. Por otro lado, Lin y Ng (2020) describen otro ejemplo de una exitosa modificación genética en esta microalga, en donde mediante la interrupción del gen *fad3* implicado en la síntesis de lípidos de *C. vulgaris*, se reportó un incremento en la acumulación de lípidos del 95,5% al 146,3% (Figura 8). Esta investigación representa una gran ventaja para la producción de lípidos sustentables como alternativa al petróleo fósil y la reducción de la producción de CO<sub>2</sub>.

**Figura 8.** Desarrollo del sistema CRISPR-CAS9 en *Chlorella vulgaris* FSP-E para potenciar la acumulación de lípidos.



Fuente: Lin & Ng (2020)

Las desventajas que podemos observar al utilizar esta microalga se deben a la falta de recursos genéticos o datos de las especies de *Chlorella* sp., además de la baja eficiencia de los métodos de transformación debido a la rigidez de su pared celular (Lin & Ng, 2020), por lo que se deben optimizar la eficacia de los sistemas de transferencia de DNA para esta especie de algas.

### *Haematococcus pluvialis*

La microalga *H. pluvialis*, de la familia *Chlorophyceae*, está ampliamente distribuida en agua dulce, aunque se ha aislado de ambientes marinos y terrestres. Esta microalga se ha utilizado en la industria biotecnológica con el fin de producir el carotenoide astaxantina caracterizado por su color rojo brillante, un pigmento natural difundido entre las especies acuáticas (Ren et al., 2021). La producción de este carotenoide también se realiza de manera sintética por las industrias, aunque es preferible la producción natural mediada por esta microalga para el consumo humano, por sus propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas (Shah et al., 2016). Esta microalga de forma ovoide de alrededor de 30  $\mu\text{m}$  se reproduce de forma asexual y crece óptimamente en temperaturas de 25-28  $^{\circ}\text{C}$ . (Wu et al., 2021). Su ciclo de vida consta de dos fases primordiales: la primera es la fase vegetal, en donde es ovoide, biflagelada y cuenta con un único cloroplasto (Oslan et al., 2021); durante esta fase, la microalga se divide de forma asexual. La segunda fase se inicia una vez completada la división celular, durante la cual se potencia la acumulación de astaxantina y se producen cambios morfológicos que incluyen la pérdida de los flagelos de la microalga. Para mejorar la producción de carotenoides, se somete la fase vegetal a condiciones de estrés de forma constante alterando factores como pH, temperatura y estrés lumínico (Nino et al., 2017). La obtención de la astaxantina se realiza mediante la ruptura de la pared celular de la microalga, lo cual se dificulta por la rigidez y el grosor de la pared celular que se genera debido a los factores de estrés (Oslan et al., 2021). Esta microalga también es usada para la obtención de carotenoides, lípidos, proteínas, luteína y ácidos grasos (Oslan et al., 2021), posee dos flagelos que se ven con mayor facilidad en su fase vegetativa y se irán una vez la microalga se encuentre en la fase de quiste; además, presentan un protoplasto alejado de la pared celular (Ohlrogge & Browse, 1995)

**Figura 9.** Ciclo vida *H. pluvialis*.



Fuente: Hernández y Otálora (2022)

Durante el ciclo de vida de *H. pluvialis* se pueden distinguir 6 etapas: 1. Células verdes vegetativas en crecimiento; 2. Células vegetativas con dos flagelos de forma elipsoidal de crecimiento exponencial; 3. Células no móviles llamadas palmellas o fase de enquistamiento, en cuya fase la pared celular se vuelve más rígida e inicia la acumulación de astaxantina; 4. Células quísticas de color rojo también conocidas como células maduras o aplanosporas, en cuya maduración los flagelos desaparecen y la pared celular aumenta su grosor (Wu et al., 2021). En la etapa de quiste es en donde se da la mayor producción de astaxantina que es estimulada por los factores de estrés. Es importante mencionar que durante la fase vegetativa se encuentra en mayor proporción las proteínas y luteína que se verá disminuida una vez la microalga se enquiste (Figura 9) (Oslan et al., 2021).

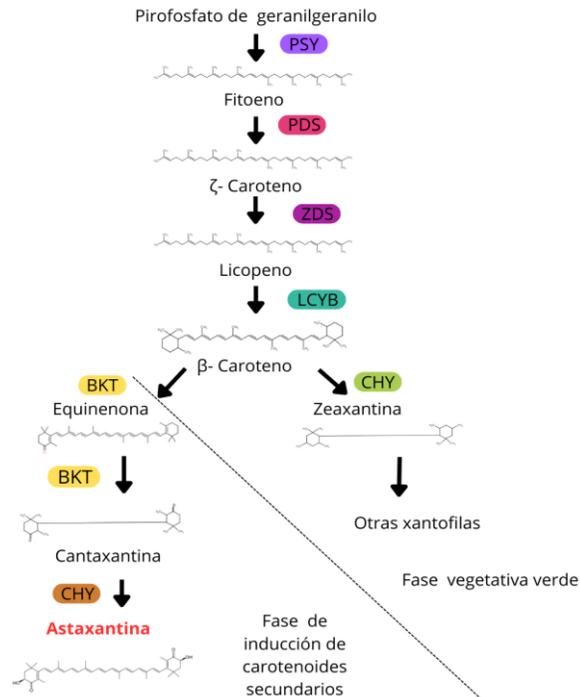
### Ruta de biosíntesis de Astaxantina en *H. pluvialis*

El aumento de la cadena isoprenoide se inicia con una molécula de dimetilalildifosfato (DMAPP) y una posterior adición lineal de tres moléculas de Isopentenilpirofosfato (IPP), catalizadas por una enzima geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPS). En la biosíntesis de carotenoides el primer paso es la condensación del geranyl-geranyl difosfato (GGPP) a fitoeno, modificado por la enzima fitoeno sintasa (PSY), como se observa en la figura 4. (Shah et al., 2016). La expresión del gen fitoenosintasa (*psy*) se aumenta en *Haematococcus sp.* estresadas con luz alta, produciendo cambio de las células de estado “verde” a “rojo” (Figura 9). Siguiendo la formación de un compuesto altamente insaturado por cuatro pasos de desaturación catalizada por dos fitoenodesaturasa (PDS) y una z-caroteno desaturasa (ZDS) con dos plastidoterminaloxidasas (PTOX1, PTOX2). De estas dos enzimas, PTOX1 se encuentra relacionado con la síntesis de astaxantina en *H. pluvialis* (Shah et al., 2016; Le-Feuvre et al., 2020).

Ambas terminales de licopeno se someten a ciclización catalizado por licopeno ciclasas (LCY-e y LCY-b). En *H. pluvialis* un nivel alto de transcritos de LCY-b han sido observadas bajo condiciones de estrés. Al final los dos pasos de oxigenación catalizado por  $\beta$ -carotenoketolasa (BKT) y b-carotenohidroxilasa (CRTR- b) son limitantes de la velocidad de síntesis rápida de astaxantina (Camacho Kurmen et al., 2013). La principal reacción catalizada por estas enzimas se debe a la alta especificidad del sustrato de bkt hacia  $\beta$ -caroteno que a zeaxantina favoreciendo la adición del grupo ceto antes de la selectividad de hidroxilación de cantaxantina a astaxantina cataliza por CrtR-b (Shah et al., 2016; Le-Feuvre et al., 2020).

Los siguientes pasos son llevados fuera de la membrana, localizando enzimas como fitoeno desaturasa (PDS) y licopeno  $\beta$ -ciclase (LCY). Según estudios realizados, la fitoeno desaturasa es regulada por los niveles del mRNA y se ha establecido que los carotenoides secundarios se acumulan fuera del cloroplasto, siendo transportados del sitio de biosíntesis (cloroplasto) al sitio de acumulación (vesículas localizadas en el citoplasma) (Shah et al., 2016; Le-Feuvre et al., 2020).

**Figura 10.** Ruta de biosíntesis de astaxantina.



En *H. pluvialis* en longitudes de onda blanca, azul y roja. PDS: fitoeno desaturasa; BKT: β-caroteno cetolasa; CBR: proteína relacionada con la biosíntesis de caroteno; CHY: hidroxilasa carotenoide; IPP: pirofosfato de isopentenilo; LCY: licopeno β ciclasa; PSY: fitoeno sintasa; IPI: isopentenil pirofosfato isomerasa (Le-Feuvre et al., 2020).

Fuente: Elaboración propia

Aunque los pasos específicos de biosíntesis de astaxantina son llevados fuera del citoplasma, las enzimas de la ruta carotenoide parecen estar localizadas en los cloroplastos (Vidhyavathi et al., 2008). Los estudios usando varios inhibidores indican que la carotenogénesis en general y la inducción de carotenoides secundarios está regulada a nivel transcripcional y transduccional, lo cual, como lo dicen algunos de los estudios revisados, no es muy claro, por lo cual este es un punto de interés a investigar para aclarar bien los genes involucrados, las proteínas y la actividad enzimática durante la inducción de acumulación de carotenoides secundarios, en especial astaxantina.

En *H. pluvialis* se ha realizado la sobreexpresión nuclear del gen PDS endógenamente mutado en el cloroplasto para incrementar la producción de astaxantina entre un 26 y 32% y también se ha realizado la integración del gen BKT de *H. pluvialis* mediante el uso de ingeniería metabólica en el cloroplasto de *Dunaliella salina*, que conduce a la producción de astaxantina. El aumento de astaxantina también se ha generado integrando el gen de la proteína de captación de hexosa (HUP1) de la microalga verde *Parachlorella kessleri* en el genoma nuclear de *Haematococcus sp.*, lo que resultó en la capacidad de utilizar glucosa en condiciones de oscuridad o poca luz (Waissman-Levy, et al., 2019), siendo la aplicación de CRISP-CAS9 útil para manipular genes relacionados con la síntesis de astaxantina en *H. pluvialis* como son los genes *psy*, *pds*, *lcy*, *bkt*, *chy*, un método productivo en futuras investigaciones (Ren et al., 2021), ya que la tecnología CRISPR-CAS9 se puede utilizar para generar de manera eficiente

mutaciones genéticas dirigidas estables en microalgas (Nymar et al., 2016; Sledzinski et al., 2021).

La demanda de carotenoides comercialmente esenciales a nivel mundial estimula la investigación en estas tecnologías, en donde los genes enzimáticos limitantes de la velocidad, como la fitoeno sintasa (PSY), el licopeno ciclasa (Lcy) y la hidroxilasa de  $\beta$ -caroteno (CHY), pueden fusionarse en un solo vector de expresión y sobreexpresarse como una cascada. La eliminación de genes carotenoides también se puede realizar mediante la tecnología CRISPR-CAS9 (Velmurugan y Muthukaliannan, 2022), lo cual se podría aplicar a la microalga *H. pluvialis*, quien produce el carotenoide astaxantina con diferentes usos a nivel industrial por sus propiedades como pigmento y compuesto biocativo. Se ha reportado la eliminación de la zeaxantina epoxidasa y el gen de la hidroxilasa de  $\beta$ -caroteno en *C. reinhardtii* (Baek et al., 2018) y *D. salina* (Hu et al., 2021), respectivamente.

## PERSPECTIVAS

La modificación genética en microalgas se ha expuesto como una de las mejores herramientas para la obtención de productos de interés biotecnológico y su aplicación industrial. La mutagénesis mediada por CRISPR-CAS9 se ha caracterizado por la mutación de microorganismos en uno o más genes de interés, como se describió en la tabla 2 la modificación en *C. vulgaris* con una mejora de hasta el 95% en la producción de lípidos.

*H. pluvialis* es una microalga ampliamente usada en la industria para la obtención del carotenoide más específicamente la astaxantina; sin embargo, no se han evidenciado modificaciones mediadas por CRISPR-CAS9 para la potenciación del carotenoide, aunque sí el uso de los genes responsables en la producción de pigmentos en otras microalgas cómo es el caso de *Y. lipolytica* (Wang et al., 2022). Se espera que el implemento de esta tecnología se realice en *H. pluvialis* para la mejora en la obtención de astaxantina mediado por mutagénesis.

## CONCLUSIONES

En este artículo se ha presentado una revisión de las aplicaciones de las tecnologías CRISPR-CAS9 en microalgas, con especial énfasis en la obtención de productos biotecnológicos de interés industrial. Se ha descrito el funcionamiento y las ventajas de este sistema de edición genómica, así como los principales métodos de transformación y selección de microalgas modificadas. Se han expuesto algunos ejemplos de productos biotecnológicos obtenidos a partir de microalgas editadas con CRISPR-CAS9 siendo *C. reinhardtii* la microalga más empleada en esta tecnología para la obtención de productos tales como biocombustibles o pigmentos. Finalmente, se han discutido los retos y las perspectivas futuras de esta línea de investigación, destacando la necesidad de mejorar la eficiencia y la seguridad de las tecnologías CRISPR-CAS9, así como de ampliar el conocimiento sobre la biología y el metabolismo de las microalgas. Se concluye que las tecnologías CRISPR-CAS9 ofrecen un gran potencial para el desarrollo de la biotecnología basada en microalgas, lo que podría contribuir a la solución de problemas ambientales y sociales relacionados con la producción de energía y la salud humana.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y al grupo Bioprocesos y control y su semillero.

## REFERENCIAS

Ajjawi, I., Verruto, J., Aqui, M., Soriaga, L. B., Coppersmith, J., Kwok, K., Peach, L., Orchard, E., Kalb, R., Xu, W., Carlson, T. J., Francis, K., Konigsfeld, K., Bartalis, J., Schultz, A., Lambert, W., Schwartz, A. S., Brown, R., & Moellering, E. R. (2017). Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. *Nature Biotechnology*, 35(7), 647-652. <https://doi.org/10.1038/nbt.3865>

Ahirwar, A., Meignen, G., Khan, M. J., Sirotiya, V., Scarsini, M., Roux, S., ... Vinayak, V. (2021). Light modulates transcriptomic dynamics upregulating astaxanthin accumulation in *Haematococcus*: A review. *Bioresource Technology*, 340, 125707. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125707>

Anjos, M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., & Dragone, G. (2013). Optimization of CO<sub>2</sub> bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 139, 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.032>

Araujo Abad, S. y Collahuazo Reinoso, Y. (2019). Producción de Biofertilizantes a Partir de Microalgas. *CEDAMAZ*, 9(2), 81-87.

Baek, K., Kim, D. H., Jeong, J., Sim, S. J., Melis, A., Kim, J., Jin, E. & Bae, S. (2016). DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Scientific Reports*, 6(1), 30620. <https://doi.org/10.1038/srep30620>

Bernheim, A., Calvo-Villamañán, A., Basier, C., Cui, L., Rocha, E. P. C., Touchon, M., & Bikard, D. (2017). Inhibition of NHEJ repair by type II-A CRISPR-Cas systems in bacteria. *Nature Communications*, 8(1), 2094-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02350-1>

Bharathkumar, N., Sunil, A., Meera, P., Aksah, S., Kannan, M., Saravanan, K. M., & Anand, T. (2022). CRISPR/Cas-Based Modifications for Therapeutic Applications: A Review. *Molecular Biotechnology*, 64(4), 355-372. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00422-8>

Burmistrz, M., Krakowski, K., & Krawczyk-Balska, A. (2020). RNA-Targeting CRISPR-Cas Systems and Their Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1122. <https://doi.org/10.3390/ijms21031122>

Camacho Kurmen, J. E., González, G. y Klotz, B. (2013). Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *Nova*, 11(19), 93. <https://doi.org/10.22490/24629448.1022>

Castillo, O., Torres-Badajoz, S., Núñez-Colín, C., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. y Rodríguez-Núñez, J. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352. <https://search.proquest.com/docview/2097445304>

Chang, K. S., Kim, J., Park, H., Hong, S., Lee, C., & Jin, E. (2020). Enhanced lipid productivity in AGP knockout marine microalga *Tetraselmis* sp. using a DNA-free CRISPR-Cas9 RNP method. *Bioresource Technology*, 303, 122932. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122932>

Chaumont, D. & Thépenier, C. (1995). Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sunlight cycle. *Journal of applied phycology*, 7, 529-537

Chen, E., Lin-Shiao, E., Trinidad, M., Saffari Doost, M., Colognori, D., & Doudna, J. A. (2022). Decorating chromatin for enhanced genome editing using CRISPR-Cas9. *Nevada RNformation*, 119(49), e2204259119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2204259119>

Coronado-Reyes, J. A., Salazar-Torres, J. A., Juárez-Campos, B., & González-Hernández, J. C. (2022). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Ciência E Tecnologia De Alimentos*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.37320>

Dalvie, N. C., Lorgeree, T., Biedermann, A. M., Love, K. R., & Love, J. C. (2022). Simplified Gene Knockout by CRISPR-Cas9-Induced Homologous Recombination. *ACS Synthetic Biology*, 11(1), 497-501. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00194>

Das, D. (2016). Engineering *Spirulina* for Enhanced Medicinal Application. *Algal Biorefinery: An Integrated Approach* (pp. 235-252). Springer International Publishing AG. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6_11)

Dhamad, A. E., & Lessner, D. J. (2020). A CRISPR-dCas9 System for Archaea and Its Use to Examine Gene Function during Nitrogen Fixation by *Methanosarcina acetivorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(21). <https://doi.org/10.1128/AEM.01402-20>

Edraki, A., Mir, A., Ibraheim, R., Gainetdinov, I., Yoon, Y., Song, C., Cao, Y., Gallant, J., Xue, W., Rivera-Pérez, J. A., & Sontheimer, E. J. (2019). A Compact, High-Accuracy Cas9 with a Dinucleotide PAM for in Vivo Genome Editing. *Molecular Cell*, 73(4), 714-726.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.12.003>

Esquivel Álvarez, A., Quesada Morales, E., Villegas Calero, M. P., Matarrita Brenes, D., Rojas Salas, M. F., Madrigal Redondo, G., Chavarría Rojas, M., & Baltodano Viales, E. (2022). CRISPR-Cas Technology, the Tool of the Future. *European Journal of Biology and Biotechnology*, 3(2), 1-9. <https://doi.org/10.24018/ejbio.2022.3.2.332>

Galarza, V. O. (2019). Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos funcionales. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.04319>

Georgianna, D. R., Hannon, M. J., Marcuschi, M., Wu, S., Botsch, K., Lewis, A. J., ... & Mayfield, S. P. (2013). Production of recombinant enzymes in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Algal Research*, 2(1), 2-9.

Gómez Luna, L. M. (2007). Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista cubana de química*, 19(2), 3.

Gómez, L., Orozco, M. I., Quiroga, C., Díaz, J. C., Huérfano, J., Díaz, L. E., Rodríguez, J., & Camacho K., J. E. (2019). Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia: Producción de astaxantina y expresión de genes en *H. pluvialis*. *Mutis*, 9(2), 7-24. <https://doi.org/10.21789/22561498.1532>

Greiner, A., Kelterborn, S., Evers, H., Kreimer, G., Sizova, I., & Hegemann, P. (2017). Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-Finger Nucleases and CRISPR/Cas9. *The Plant Cell*, 29(10), 2498-2518. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00659>

Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., & Nelson, K. E. (2005). A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Computational Biology*, 1(6), e60. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010060>

Han, H. (2018). *RNA Interference to Knock Down Gene Expression. Disease Gene Identification*. Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16)

Hopes, A., Nekrasov, V., Kamoun, S., & Mock, T. (2016). Editing of the urease gene by CRISPR-Cas in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Methods*, 12(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0148-0>

Hu, L., Feng, S., Liang, G., Du, J., Li, A., & Niu, C. (2021). CRISPR/Cas9-induced  $\beta$ -carotene hydroxylase mutation in *Dunaliella salina* CCAP19/18. *AMB Express*, 11(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01242-4>

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429-5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>

Jeon, S., Lim, J., Lee, H., Shin, S., Kang, N. K., Park, Y., Oh, H., Jeong, W., Jeong, B., & Chang, Y. K. (2017). Current status and perspectives of genome editing technology for microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 267. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0957-z>

Jiang, W. Z., & Weeks, D. P. (2017). A gene-within-a-gene Cas9/sgRNA hybrid construct enables gene editing and gene replacement strategies in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*, 26(C), 474-480. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.001>

Jiang, W., Brueggeman, A. J., Horken, K. M., Plucinak, T. M., & Weeks, D. P. (2014). Successful Transient Expression of Cas9 and Single Guide RNA Genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 13(11), 1465-1469. <https://doi.org/10.1128/EC.00213-14>

Jiang, X., Liu, Y., Yin, X., Deng, Z., Zhang, S., Ma, C., & Wang, L. (2023). Efficient removal of chromium by a novel biochar-microalga complex: Mechanism and performance. *Environmental Technology & Innovation*, 31, 103156. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103156>

Kao, P., & Ng, I. (2017). CRISPRi mediated phosphoenolpyruvate carboxylase regulation to enhance the production of lipid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology*, 245(Pt B), 1527-1537. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.111>

Kelterborn, S., Boehning, F., Sizova, I., Baidukova, O., Evers, H., & Hegemann, P. (2022). Gene Editing in Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins. *Methods in molecular biology*, 45-65. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1791-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1791-5_3)

Kim, J., Chang, K. S., Lee, S., & Jin, E. (2021). Establishment of a Genome Editing Tool Using CRISPR-Cas9 in *Chlorella vulgaris* UTEX395. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 480. <https://doi.org/10.3390/ijms22020480>

Kim, M., Kim, S., Kim, Y., & Choi, T. (2023). Enhancement of *Chlorella* transformation efficacy by insert fragmentation. *Algal Research (Amsterdam)*, 72, 103146. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103146>

Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Topkar, V. V., Nguyen, N. T., Zheng, Z., Gonzales, A. P. W., Li, Z., Peterson, R. T., Yeh, J. J., Aryee, M. J., & Joung, J. K. (2015). Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature (London)*, 523(7561), 481-485. <https://doi.org/10.1038/nature14592>

Kolesnik, M. V., Fedorova, I., Karneyeva, K. A., Artamonova, D. N., & Severinov, K. V. (2021). Type III CRISPR-Cas Systems: Deciphering the Most Complex Prokaryotic Immune System. *Biochemistry (Moscow)*, 86(10), 1301-1314. <https://doi.org/10.1134/S0006297921100114>

Kong, W., Shen, B., Lyu, H., Kong, J., Ma, J., Wang, Z., & Feng, S. (2021). Review on carbon dioxide fixation coupled with nutrients removal from wastewater by microalgae. *Journal of Cleaner Production*, 292, 125975. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.125975>

Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>

Kühn, R. (2009). Gene knockout protocols (2. ed. ed.). Humana Press.

Lakhawat, S. S., Malik, N., Kumar, V., Kumar, S., & Sharma, P. K. (2022). Implications of CRISPR-Cas9 in Developing Next Generation Biofuel: A Mini-review. *Current Protein & Peptide Science*, 23(9), 574-584. <https://doi.org/10.2174/1389203723666220907110310>

Le-Feuvre, R., Moraga-Suazo, P., Gonzalez, J., Martin, S. S., Henríquez, V., Donoso, A., & Agurto-Muñoz, C. (2020). Biotechnology applied to *Haematococcus pluvialis* Fotow: challenges and prospects for the enhancement of astaxanthin accumulation. *Journal of Applied Phycology*, 32, 3831-3852.

Li, C., Chu, W., Gill, R. A., Sang, S., Shi, Y., Hu, X., Yang, Y., Zaman, Q. U., & Zhang, B. (2022). Computational Tools and Resources for CRISPR/Cas Genome Editing. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.02.006>

Li, Y., Xu, H., Han, F., Mu, J., Chen, D., Feng, B., & Zeng, H. (2015). Regulation of lipid metabolism in the green microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophy–photoinduction cultivation regime. *Bioresource Technology*, 192, 781-791. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.028>

Liao, C., & Beisel, C. L. (2021). The tracrRNA in CRISPR Biology and Technologies. *Annual Review of Genetics*, 55(1), 161-181. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-071719-022559>

Lin, W., & Ng, I. (2020). Development of CRISPR/Cas9 system in *Chlorella vulgaris* FSP-E to enhance lipid accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 133, 109458. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109458>

Liu, M., Rehman, S., Tang, X., Gu, K., Fan, Q., Chen, D., & Ma, W. (2019). Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Frontiers in Genetics*, 9, 691. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00691>

Luo, Q., Zou, X., Wang, C., Li, Y., & Hu, Z. (2021). The roles of Cullins E3 ubiquitin ligases in the lipid biosynthesis of the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4695. <https://doi.org/10.3390/IJMS22094695>

Machado Sierra, E., Serrano, M. C., Manares, A., Guerra, A., & Aranguren Díaz, Y. (2021). Microalgae: Potential for Bioeconomy in Food Systems. *Applied Sciences*, 11(23), 11316. <https://doi.org/10.3390/app112311316>

Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 1(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnyš, V., Terns, M. P., Venclovas, Č, White, M. F., Yakunin, A. F., . . . Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(2), 67-83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>

Mendoza, H., Jara, A. D. L., Freijanes, K., Cormona, L., Ramos, A. A., Duarte, V. D. S., et al. (2008). Characterization of Dunaliella salina strains by flow cytometry: A new approach to select carotenoid hyperproducing strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(4), 5–6. <https://doi.org/10.2225/vol11-issue4-fulltext-2>.

Musunuru, K., Chadwick, A. C., Mizoguchi, T., Garcia, S. P., DeNizio, J. E., Reiss, C. W., Wang, K., Iyer, S., Dutta, C., Clendaniel, V., Amaonye, M., Beach, A., Berth, K., Biswas, S., Braun, M. C., Chen, H., Colace, T. V., Ganey, J. D., Gangopadhyay, S. A., . . . Kathiresan, S. (2021). In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. *Nature (London)*, 593(7859), 429-434. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03534-y>

Ng, I., Keskin, B. B., & Tan, S. (2020). A Critical Review of Genome Editing and Synthetic Biology Applications in Metabolic Engineering of Microalgae and Cyanobacteria. *Biotechnology Journal*, 15(8), e1900228-n/a. <https://doi.org/10.1002/biot.201900228>

Nino Castillo, C. M., Rodriguez Rivera, F. C., Diaz, L. E., & Lancheros Diaz, A. G. (2017). Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga Haematococcus pluvialis. *Nova: Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 15(28), 19-31. <https://doi.org/10.22490/24629448.2073>

Nymark, M., Sharma, A. K., Sparstad, T., Bones, A. M., & Winge, P. (2016). A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Scientific Reports*, 6(1), 24951. <https://doi.org/10.1038/srep24951>

Ohlrogge, J., & Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *The plant cell*, 7(7), 957.

Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., Oslan, S. N., Arumugam, K., Ariff, A. B., Sulaiman, A. Z., & Mohamed, M. S. (2021). A Review on Haematococcus pluvialis Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules (Basel, Switzerland)*, 11(2), 256. <https://doi.org/10.3390/biom11020256>

Patel, V. K., Soni, N., Prasad, V., Sapre, A., Dasgupta, S., & Bhadra, B. (2019). CRISPR–Cas9 System for Genome Engineering of Photosynthetic Microalgae. *Molecular Biotechnology*, 61(8), 541-561. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00185-3>

Porta Helena. (2021). Conceptos básicos y avances de la transformación genética de las microalgas, 25(5), 127-139.

Ren, Y., Deng, J., Huang, J., Wu, Z., Yi, L., Bi, Y., & Chen, F. (2021). Using green alga Haematococcus pluvialis for astaxanthin and lipid co-production: Advances and outlook. *Bioresource Technology*, 340, 125736. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125736>

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

Schüler, L., Greque de Moraes, E., Trovão, M., Machado, A., Carvalho, B., Carneiro, M., Maia, I., Soares, M., Duarte, P., Barros, A., Pereira, H., Silva, J., & Varela, J. (2020). Isolation and Characterization of Novel *Chlorella Vulgaris* Mutants with Low Chlorophyll and Improved Protein Contents for Food Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 469. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00469>

Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in Plant Science*, 7, 531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>

Shams, F., Bayat, H., Mohammadian, O., Mahboudi, S., Vahidnezhad, H., Soosanabadi, M., & Rahimpour, A. (2022). Advance trends in targeting homology-directed repair for accurate gene editing: An inclusive review of small molecules and modified CRISPR-Cas9 systems. *BioImpacts: BI*, 12(4), 371-391. <https://doi.org/10.34172/bi.2022.23871>

Sharma, P. K., Saharia, M., Srivastava, R., Kumar, S., & Sahoo, L. (2018). Tailoring Microalgae for Efficient Biofuel Production. *Frontiers in Marine Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00382>

Shin, S., Lim, J., Koh, H. G., Kim, E. K., Kang, N. K., Jeon, S., Kwon, S., Shin, W., Lee, B., Hwangbo, K., Kim, J., Ye, S. H., Yun, J., Seo, H., Oh, H., Kim, K., Kim, J., Jeong, W., Chang, Y. K., & Jeong, B. (2016). CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific Reports*, 6(1), 27810. <https://doi.org/10.1038/srep27810>

Shin, Y. S., Jeong, J., Nguyen, T. H. T., Kim, J. Y. H., Jin, E., & Sim, S. J. (2019). Targeted knockout of phospholipase A2 to increase lipid productivity in *Chlamydomonas reinhardtii* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 271, 368-374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.121>

Sledzinski, P., Dabrowska, M., Nowaczyk, M., & Olejniczak, M. (2021). Paving the way towards precise and safe CRISPR genome editing. *Biotechnology Advances*, 49, 107737.

Spicer, A., & Molnar, A. (2018). Gene Editing of Microalgae: Scientific Progress and Regulatory Challenges in Europe. *Biology (Basel, Switzerland)*, 7(1), 21. <https://doi.org/10.3390/biology7010021>

Tian, P., Wang, J., Shen, X., Rey, J. F., Yuan, Q., & Yan, Y. (2017). Fundamental CRISPR-Cas9 tools and current applications in microbial systems. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(3), 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.08.006>

Trovão, M., Schüler, L. M., Machado, A., Bombo, G., Navalho, S., Barros, A., Pereira, H., Silva, J., Freitas, F., & Varela, J. (2022). Random Mutagenesis as a Promising Tool for Microalgal Strain Improvement towards Industrial Production. *Marine Drugs*, 20(7), 440. <https://doi.org/10.3390/md20070440>

Uddin, F., Rudin, C. M., & Sen, T. (2020). CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Frontiers in Oncology*, 10, 1387. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01387>

Van der Oost, J., Jore, M. M., Westra, E. R., Lundgren, M., & Brouns, S. J. J. (2009). CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences (Amsterdam. Regular Ed.)*, 34(8), 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.05.002>

Velmurugan, A., & Muthukaliannan, G. K. (2022). Genetic manipulation for carotenoid production in microalgae an overview. *Current Research in Biotechnology*, 4, 221-228.

Vidhyavathi, R., Venkatachalam, L., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2008). Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of experimental botany*, 59(6), 1409-1418.

Wang, Q., Lu, Y., Xin, Y., Wei, L., Huang, S., & Xu, J. (2016). Genome editing of model oleaginous microalgae *Nannochloropsis* spp. by CRISPR/Cas9. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 88(6), 1071-1081. <https://doi.org/10.1111/tpj.13307>

Waissman-Levy, N., Leu, S., Khozin-Goldberg, I., & Boussiba, S. (2019). Manipulation of trophic capacities in *Haematococcus pluvialis* enables low-light mediated growth on glucose and astaxanthin formation in the dark. *Algal Research*, 40, 101497.

Wei, L., Xin, Y., Wang, Q., Yang, J., Hu, H., & Xu, J. (2017). RNAi-based targeted gene knockdown in the model oleaginous microalgae *Nannochloropsis oceanica*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 89(6), 1236-1250. <https://doi.org/10.1111/tpj.13411>

Wu, K., Ying, K., Zhou, J., Liu, D., Liu, L., Tao, Y., Hanotu, J., Zhu, X., & Cai, Z. (2021). Optimizing the growth of *Haematococcus pluvialis* based on a novel microbubble-driven photobioreactor. *iScience*, 24(12), 103461. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103461>

Xu, H., Xiao, T., Chen, C., Li, W., Meyer, C. A., Wu, Q., Wu, D., Cong, L., Zhang, F., Liu, J. S., Brown, M., & Liu, X. S. (2015). Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome Research*, 25(8), 1147-1157. <https://doi.org/10.1101/gr.191452.115>

Xu, P., Li, J., Qian, J., Wang, B., Liu, J., Xu, R., Chen, P., & Zhou, W. (2023). Recent advances in CO<sub>2</sub> fixation by microalgae and its potential contribution to carbon neutrality. *Chemosphere (Oxford)*, 319, 137987. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137987>

Yoshimitsu, Y., Abe, J., & Harayama, S. (2018). Cas9-guide RNA ribonucleoprotein-induced genome editing in the industrial green alga *Coccomyxa* sp. strain KJ. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 326. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1327-1>

Yue Yang, Jeong Min Seo, Nguyen, A., Pham, T. X., Hea Jin Park, Park, Y., Kim, B., Bruno, R. S., & Jiyoung Lee. (2011). Astaxanthin-Rich Extract from the Green Alga *Haematococcus pluvialis* Lowers Plasma Lipid Concentrations and Enhances Antioxidant Defense in Apolipoprotein E Knockout Mice. *The Journal of Nutrition*, 141(9), 1611-1617. <https://doi.org/10.3945/jn.111.142109>

Zambrano, J., García-Encina, P. A., Jiménez, J. J., Ciardi, M., Bolado-Rodríguez, S., & Irusta-Mata, R. (2023). Removal of veterinary antibiotics in swine manure wastewater using microalgae-bacteria consortia in a pilot scale photobioreactor. *Environmental Technology & Innovation*, 103190. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103190>

Zetsche, B., Gootenberg, J., Abudayyeh, O., Slaymaker, I., Makarova, K., Essletzbichler, P., Volz, S., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E., & Zhang, F. (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*, 163(3), 759-771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>

Zhang, S., Guo, F., Yan, W., Dai, Z., Dong, W., Zhou, J., Zhang, W., Xin, F., & Jiang, M. (2020). Recent Advances of CRISPR/Cas9-Based Genetic Engineering and Transcriptional Regulation in Industrial *Biology*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 459. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00459>

Zhang, Y., Jiang, J., Shi, T., Sun, X., Zhao, Q., Huang, H., & Ren, L. (2019). Application of the CRISPR/Cas system for genome editing in microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(8), 3239-3248. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09726-x>

Zhu, Y. (2022). Advances in CRISPR/Cas9. *BioMed Research International*, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2022/9978571>