

***Phaeodactylum tricornutum*, una fuente potencial de ácido eicosapentaenoico**

Tomás García, Tania Castillo, Alfredo Martínez, Enrique Galindo*

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México.

enrique.galindo@ibt.unam.mx

Resumen

Los ácidos grasos omega-3, dentro de los cuales destacan el ácido docosahexaenoico (DHA 22: 6 (n-3)) y el ácido eicosapentaenoico (EPA 20: 5 (n-3)), tienen diversas propiedades benéficas para la salud. Por sus propiedades, estos ácidos omega-3 y sus derivados se han empleado como nutraceuticos. La fuente tradicional de estos ácidos grasos omega-3, es el aceite de pescado de especies como el salmón y caballa. Sin embargo, la extracción a partir del aceite de pescado es poco sostenible y se ve afectada por factores ambientales, como la contaminación por metales y toxinas, y en un horizonte de mediano y largo plazo, son deseables y necesarias fuentes alternativas de ácidos grasos omega-3. Las microalgas son los principales productores naturales de estos aceites. El uso de microalgas para producir omega-3 ha crecido en los últimos años. Actualmente, la producción de DHA empleando microalgas se ha vuelto un caso de éxito de la biotecnología moderna. En contraste, la producción de EPA, a través del cultivo de microalgas aún no es económicamente competitivo con otras fuentes. Por lo anterior, en la actualidad, el enfoque para lograr una mayor producción de EPA, a través del cultivo de microalgas, se basa en la manipulación genética y en la optimización de las condiciones de cultivo. *Phaeodactylum tricornutum* es una diatomea marina que en los últimos años ha adquirido relevancia como plataforma para la producción de estos ácidos grasos omega-3, con gran énfasis en la producción de EPA. En esta revisión se abordará la producción de los ácidos grasos omega-3 en microalgas, haciendo énfasis en *P. tricornutum* como alternativa para la producción de EPA.

Palabras clave: Ácidos grasos omega-3, ácido eicosapentaenoico, cultivo de microalgas, estrategias de cultivo, *Phaeodactylum tricornutum*.

Abstract

Omega-3 fatty acids, especially docosahexaenoic acid (DHA 22:6(n-3)) and eicosapentaenoic acid (EPA 20:5(n-3)), have been related to several health benefits. Therefore, omega-3 and their derivatives are important nutraceutical and pharmaceutical targets. Most of ingredients rich in omega-3 fatty acids on the market today originate from fish oil obtained from wild fatty fish species such as salmon and mackerel. As fisheries are under increasing pressure regarding sustainability and environmental factors (such as metal contamination and the presence of toxins), in a mid and long-term horizon, alternative sources for omega-3 fatty acids are desirable and needed. Microalgae are the primary producers of omega-3 fatty acids such as EPA and DHA. Some microalgae oils are already considered a promising oil alternative to those from fish and land-based plant sources. Using microalgae to produce omega-3 is still a relatively new field and research on this area has been growing significantly in the last few years. Currently, DHA production by microalgae has become a success of modern biotechnology. Although some microalgae species have demonstrated industrial production potential for EPA, currently it is not economically competitive with other sources. Improvements in biomass and lipid yields through isolation of new species, strain selection, genetic

manipulation, and engineering, and/or optimization of culture conditions, can make algal omega-3-rich oil able to compete in the market. *Phaeodactylum tricornutum* is a marine diatom that in recent years has become important as a platform to produce these omega-3 fatty acids with emphasis on the production of EPA.

Key words: Omega-3 fatty acids, eicosapentaenoic acid, microalgae cultivation, cultivation strategies, *Phaeodactylum tricornutum*.

Introducción

El ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6) son ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés *polyunsaturated fatty acids*) pertenecientes a la familia omega-3. Son un grupo de ácidos grasos que desempeñan un papel de gran importancia en el mantenimiento y funcionamiento del sistema cardiovascular, así como de la retina y el cerebro (Sang *et al.*, 2012). La fuente tradicional de PUFAs para consumo humano, proviene de la dieta y del aceite de pescado. Sin embargo, los peces no son productores de PUFAs ya que los acumulan a partir de su dieta. Además, las reservas de pescado han disminuido debido al aumento de la sobreexplotación pesquera, y presentan problemas relacionados con la acumulación de contaminantes liposolubles como metil mercurio, PCB's y otras toxinas que han dificultado la purificación y han aumentado los costos del proceso de obtención de estos ácidos grasos (Castilla-Casadiego *et al.*, 2016).

Las microalgas son un grupo de organismos fotosintéticos que cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo la síntesis de EPA y DHA, siendo los productores primarios de estos metabolitos. Actualmente, la búsqueda de estrategias de cultivos que logren maximizar su producción se encuentra en proceso. La microalga *Phaeodactylum tricornutum* es una microalga perteneciente al grupo de las diatomeas, la cual es conocida por presentar una alta tasa de crecimiento y un elevado porcentaje de

lípidos, especialmente ácidos grasos omega-3, principalmente EPA (~ 35 %), pero solo trazas de DHA (Hamilton *et al.*, 2014).

Estas propiedades vuelven a *P. tricornutum* una especie atractiva para la producción industrial de EPA. Cabe mencionar que se cuenta con el genoma secuenciado de esta diatomea, lo que ha facilitado conocer en términos moleculares y bioquímicos los procesos involucrados en la biosíntesis de lípidos, lo cual podría emplearse como una herramienta para el diseño de estrategias de cultivo y de ingeniería metabólica para incrementar la productividad de EPA (Mühlroth *et al.*, 2013).

La presente revisión se centra en el uso potencial de cultivos de microalgas para la producción de omega-3. Asimismo, se abordará el potencial de la microalga *P. tricornutum* como productora de EPA. Por último, se hace una revisión de las estrategias de cultivo e ingeniería genética que pueden utilizarse para incrementar la productividad de EPA en *P. tricornutum*.

Ácidos grasos omega-3

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son compuestos hidrocarbonados de 18 o más carbonos, que poseen dos o más dobles enlaces. Los ácidos grasos omega-3 (ω -3) presentan su primer doble enlace entre el tercer y cuarto carbono del extremo metilo terminal. En la Tabla 1, se presentan los principales ácidos grasos omega-3 (Ward & Singh, 2005). Los ácidos grasos omega-3, tienen diversas propiedades benéficas para la salud, de estos, destacan el EPA y el DHA (Fig. 1; Ward & Singh, 2005).

Tabla 1. Ácidos grasos polinsaturados omega-3. Adaptado de Ward & Singh, (2005).

Nombre	Nomenclatura	Fuente de obtención
Ácido α -linolénico	ALA (C18:3)	Nueces, linaza, soya, canola.
Ácido eicosapentaenoico	EPA (C20:5)	Aceite de pescado, microalgas.
Ácido docosapentaenoico	DPA (C22:5)	Aceite de pescado, microalgas.
Ácido docosahexaenoico	DHA (C22:6)	Aceite de pescado, microalgas.

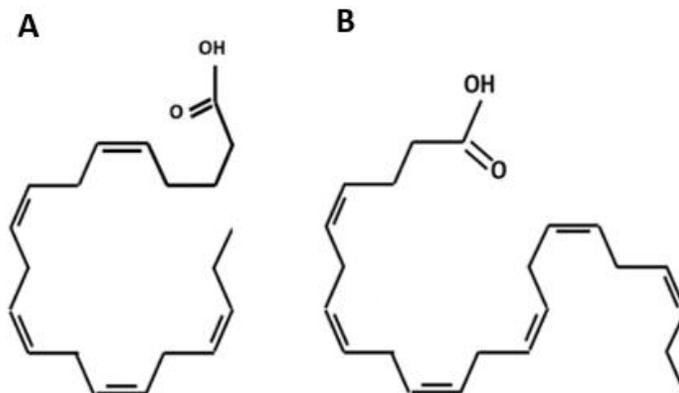


Figura 1. Estructura química omega-3 (A) EPA: Ácido eicosapentaenoico ($20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$), (B) DHA: Ácido docosahexaenoico ($22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$). Adaptado de Moreno *et al.*, 2012.

Importancia y aplicaciones de los ácidos grasos EPA y DHA

El EPA y DHA son necesarios para el mantenimiento de las membranas celulares, el funcionamiento del cerebro, además de participar en la transferencia del oxígeno del plasma sanguíneo en la síntesis de la hemoglobina y la división celular (Gogus & Smith, 2010). Dentro de las propiedades del DHA se ha reportado que ayuda a la disminución de los niveles de colesterol LDL y VLDL y triglicéridos en sangre (Bowman *et al.*, 2018). Asimismo, se ha visto que el EPA puede ser utilizado para el tratamiento de la hipertrigliceridemia y enfermedades inflamatorias, así como en la prevención de eventos cardiovasculares (Bhatt *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha reportado el efecto del consumo de estos ácidos grasos sobre la síntesis de moléculas bioactivas (eicosanoides y leucotrienos) que podrían ayudar principalmente en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Tabla 2; Funk, 2001; Simopoulos, 2002; Cottin *et al.*, 2011).

En humanos, la síntesis de EPA y DHA se inicia a partir del ácido alfa-linolénico (ALA), el cual se obtiene a través de la dieta. Sin embargo, la velocidad de desaturación y elongación es demasiado lenta y dependiente de la edad y género. Por esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera crítico el consumo de omega-3, en porcentajes del 6-11% y de EPA/DHA entre 0.5-2 % (~500 mg/día) de la ingesta diaria de alimentos (OMS, 2008).

Organismos productores de EPA y DHA

La creciente demanda de aceites de pescado a nivel mundial (~ 900,000 toneladas anuales) tiene un importante impacto en el ambiente, principalmente por el incremento en el consumo de recursos naturales y espacio (Finco *et al.*, 2017). Sin embargo, el principal problema para su producción es la baja sustentabilidad del proceso de obtención, lo cual ha generado una disminución (al punto de extinción) de algunas especies de peces, lo que podría eventualmente crear un desbalance entre las especies y tener un severo impacto en la biodiversidad (Kitessa *et al.*, 2014). Por consiguiente, se han incrementado los esfuerzos para producir estos lípidos a escala industrial empleando microorganismos oleaginosos, entre los que se encuentran algunas bacterias, hongos y principalmente, microalgas.

Las microalgas presentan diversas ventajas para lograr posicionarse como una alternativa para la producción de omega-3, ya que poseen la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo su biosíntesis (Mühlroth *et al.*, 2013). Por otro lado, también se encuentran las plantas que han sido modificadas genéticamente con el objetivo de alcanzar altos niveles de EPA y DHA (Adarme-Vega *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de que las plantas genéticamente modificadas (GM) ya son una alternativa para la producción de ácidos grasos omega-3 para consumo humano, sus niveles de DHA/EPA

Artículos

Tabla 2. Principales estudios sobre el efecto positivo de los ácidos grasos omega-3 (EPA/DHA) en el tratamiento de enfermedades relacionadas al sistema cardiovascular. Adaptado de Kris-Etherton et al., (2019).

Estudio/Años de seguimiento	País	Dosis EPA+DHA (mg/ día)	Muestra/ Condiciones	Hallazgos	Referencia
ASCEND (7. 4)	U.K.	840	15, 480/ pacientes con diabetes tipo 2	Reducción de la tasa de mortalidad en un 19 % por ataque al corazón; 25 % de reducción de eventos cardiovasculares mayores (dosis 4 g/día EPA).	Bowman et al., 2018.
VITAL (5.3)	U.S.A.	840	25, 871/ adultos mayores sin enfermedades cardiovasculares	Reducción del 28 % en el riesgo de paro cardíaco; 50 % de reducción de ataque fatal al corazón; 17 % de reducción de riesgo de ataque al corazón por enfermedad coronaria.	Manson et al., 2019.
REDUCE-IT (4.9)	11 países	3,600 (solo EPA)	8,179/ Pacientes con niveles medianos de triglicéridos 216 mg/ dL.	Demostró fuerte evidencia para sustentar la prescripción de EPA para el tratamiento médico para pacientes con hipertrigliceridemia; 26 % de reducción en eventos cardiovasculares.	Bhatt et al., 2018.

son menores en comparación con los de los microorganismos oleaginosos. Como se presenta en la Tabla 3, la producción de aceite y los porcentajes de omega-3 en el aceite proveniente de microalgas son mayores a los obtenidos del aceite de pescado y del aceite vegetal. Además, existe una barrera de aceptación hacia los cultivos transgénicos (Napier et al., 2015). Por estas razones, la producción de omega-3 mediante microorganismos, específicamente microalgas y procesos biotecnológicos, puede proveer niveles sustentables de EPA y/o DHA antes que otras tecnologías logren madurar (Finco et al., 2017).

Microalgas como fuente de EPA y/o DHA

Las microalgas, como microorganismos oleaginosos, han sido estudiadas como fuentes potenciales para la producción de EPA/DHA. Existe una amplia variedad de especies con características peculiares y con la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar EPA y/o DHA (Kelly et al., 1959; Kendrick & Ratledge, 1992).

Especies productoras de DHA

En las últimas décadas se han evaluado diversas cepas con la capacidad de producir DHA (Adarme-Vega et al., 2014). De las especies de microalgas que se han reportado como productoras de DHA,

Cryptocodinium cohnii y *Schizochytrium limacinum* ya se han empleado para la producción y comercialización de DHA (Oliver et al., 2020). En la Tabla 4 se muestran los títulos de producción de biomasa y DHA, reportados para algunas de las especies productoras de este ácido graso.

En el caso de la especie *C. cohnii*, Kyle et al. (1992), empleando cultivos heterótrofos en lote alimentado con glucosa, reportaron productividades de 1-1.5 g DHA L⁻¹ día⁻¹, estos resultados se obtuvieron en tiempos de cultivo mayores a las 400 h. Por otra parte, Bailey et al. (2003) mediante el uso de estrategias de limitación de oxígeno en cultivos de la especie *S. limacinum* (perteneciente a la familia Thraustochytriaceae) reportaron una productividad de aproximadamente 10 g L⁻¹ día⁻¹, que se logró en cultivos de 90 a 100 h.

Especies productoras de EPA

En contraste con la producción y comercialización del DHA, no se ha logrado la producción de EPA a nivel industrial empleando microalgas (Winwood, 2013). En este sentido, en el año 2011, la empresa Aurora Algae, dedicada a la producción de biodiesel, emprendió la comercialización de A2 EPA Pure™ con un porcentaje de EPA mayor al 65 %; sin embargo, reportes del 2013 indican que esta empresa entró en crisis económica (Lane, 2015).

Tabla 3. Producción de omega-3 mediante diversas fuentes. Tabla adaptada de Finco et al., (2017).

Parámetro	Aceite de pescado <i>Peruvian anchovy</i>	Aceite vegetal <i>Camelina sativa GM</i>	Aceite microbiano <i>Schizochytrium sp.</i>
Biomasa (kg)	1000	1000	1000
Aceite (kg)	100	350	600
Omega-3 (kg)	30	49	300
n-3 PUFA (% TFA)	30	14	50

Entre las especies productoras de EPA se encuentran las diatomeas pertenecientes a la clase Bacillariophyceae, ampliamente distribuidas tanto en hábitats marinos como de agua dulce, y que contienen entre un 15-30 % de ácidos grasos como EPA.

Dentro de las especies de microalgas productoras de EPA, se encuentran las diatomeas marinas *Nitzschia alba* y *Nitzschia laevis*, estas especies además tienen la capacidad de crecer bajo condiciones de cultivo heterótrofas y producir grandes cantidades de EPA (Wen & Chen, 2000). En la Tabla 4 se presenta un resumen de los parámetros estequiométricos de la producción de EPA reportados en estas cepas. Boswell et al. en 1992, evaluaron la producción de EPA en cultivos lote alimentado de *N. alba* con glucosa como fuente de carbono, en ausencia de luz (heterotrofia). En estos cultivos se obtuvo una concentración de biomasa de 40-50 g L⁻¹ (~40 % lípidos) en 100 h de cultivo y una producción de 1.25 g L⁻¹ de EPA. Sin embargo, la fracción de EPA en la mezcla de lipídica fue solo del 4 %, por lo que, a pesar de ser una buena cepa en términos de obtención de biomasa, no lo es con respecto al contenido de EPA. Wen y Chen (2003), en cultivos lote alimentado de *N. laevis* en condiciones de heterotrofia (sin luz) y con glucosa como fuente de carbono, reportaron una alta densidad celular con una productividad de 73 mg L⁻¹ día⁻¹ de EPA en 14 días de cultivo. En estos cultivos, el porcentaje de EPA en la mezcla de ácidos grasos fue de 14 %. Sin embargo, cuando se ha buscado maximizar la concentración de EPA en *N. laevis*, a través de la limitación nutricional con la fuente de nitrógeno, se ha observado una mayor producción de metabolitos que causan

un efecto nocivo a las células, reduciendo la productividad de EPA a sólo 30 mg L⁻¹ día⁻¹, menor a lo alcanzado por *N. alba* (Ward & Singh, 2005).

Por último, en la Tabla 4 se muestran los parámetros de producción de EPA en cultivos de *P. tricornutum*, la cual puede alcanzar un porcentaje de EPA en peso seco entre 2.6 y 3.1 % y un título de producción de 235± 68 mg L⁻¹, correspondiente a un 30 % en el porcentaje total de ácidos grasos (Yongmanitchai & Ward, 1991). Por ello, el porcentaje de EPA en *P. tricornutum* puede ser entre 40 y 90 % mayor con respecto a lo reportado en *N. laevis* y *N. alba*, respectivamente, siendo así la principal cepa de estudio para la obtención de EPA en la última década (Steinrücken et al., 2018). No obstante, la productividad de EPA de la cepa de *P. tricornutum* en cultivos continuos autótrofos ha sido limitada (<100 mg L⁻¹ día⁻¹) por lo que en términos comerciales aún no es una opción viable para su comercialización industrial. Es por ello por lo que la manipulación de las condiciones de cultivo y la modificación genética de las cepas se han vuelto herramientas indispensables para maximizar la producción de EPA.

Phaeodactylum tricornutum

P. tricornutum (Figura 2) es una diatomea que, a diferencia de otras diatomeas, posee una frústula atípica ya que su estructura y composición carece de silicato (Martino et al., 2007). Esta variación, en comparación con otras diatomeas, hace que esta especie no necesite silicio en el medio para crecer, disminuyendo los costos en la formulación del medio (Zhao et al., 2014). Se han descrito múltiples morfologías: fusiforme,

Artículos

Tabla 4. Resumen de las principales investigaciones para la producción industrial de DHA y EPA.
Tabla adaptada de Ward & Singh, (2005).

Microorganismo	Biomasa (g/L)	DHA				Referencia
		mg L ⁻¹	%/Biomasa	%/Lípidos	Productividad (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	
<i>T. aureum</i>	4.9	510	10.4	57	90	Bajpai <i>et al.</i> , 1991
<i>C. cohnii</i>	20-40	2000	20-30	35	500	Kyle, 1992
<i>Schizochytrium</i>	20	4000	20-22	40	1000	Bailey <i>et al.</i> , 2003

Microorganismo	Biomasa (g/L)	EPA				Referencia
		mg L ⁻¹	%/Biomasa	%/Lípidos	Productividad (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	
<i>N. alba</i>	40-50	500	3.00	4.00	100	Boswell <i>et al.</i> , 1992
<i>N. laevis</i>	22.1	700	1.4	19.4	30	Wen & Chen, 2003
<i>P. tricornutum</i>	4-6	700	3.3	28-35	25	Yongmanitchai & Ward, 1991



Figura 2. Micrografía confocal de *P. tricornutum* UTEX 646. Adaptado con permiso del autor Kramer, 2019.

triadas y ovals. Sin embargo, las únicas formas aisladas y que han logrado crecer en cultivo celular son las primeras dos (Tesson *et al.*, 2009). Cabe mencionar que la secuenciación de su genoma en 2008 por Bowler *et al.*, ha permitido la generación de cepas mutantes transformadas por biobalística y más recientemente la edición de su genoma a través de CRISPR/Cas9 (Stukenberg *et al.*, 2018), incrementando la versatilidad de este organismo para la producción de ácidos grasos omega-3. Gracias al desarrollo de herramientas moleculares CRISPR/Cas9 y TALEN (Serif *et*

al., 2017), ahora es posible modificar rutas específicas y de forma eficiente para la producción de metabolitos de alto valor agregado, por ejemplo, triacilglicerolos (TAGs) y ácidos grasos poliinsaturados (omega-3).

En la Tabla 5 se presenta un resumen de las principales investigaciones publicadas en las últimas décadas enfocadas en la producción de EPA, empleando a *P. tricornutum* como modelo de estudio. Como se observa en la Tabla 5, en *P. tricornutum*, la abundancia relativa de EPA con respecto al

Tabla 5. Principales investigaciones enfocadas en la producción de EPA, empleando cepas de *P. tricornutum* como modelo de estudio.

Cepa	%EPA*	Condiciones de cultivo	Referencia
<i>P. tricornutum</i> UTEX 640	30.5	Medio Yongmanitchai & Ward, (1991); 4000 luxes; Autotrofia; 20 °C; 5 % CO ₂	Yongmanitchai & Ward, 1991
<i>P. tricornutum</i> (SCUN/SCUEC)	14.0	Medio f/2; 165 µE; Autotrofia; 20 °C.	Wang <i>et al.</i> , 2012
<i>P. tricornutum</i> UTEX 640	32.0	Medio Cerón <i>et al.</i> , 2013; 280µE; Mixotrofia; 50 % CO ₂ ; glicerol 0.1 M; 20 °C.	Cerón <i>et al.</i> , 2013
<i>P. tricornutum</i> UTEX 646	23.0	Medio ESAW; 60 µE; Disminución de la temperatura de 20 a 16 °C.	Hamilton <i>et al.</i> , 2014
<i>P. tricornutum</i> ECS	21.0	Medio f/2; 100 µE; Autotrofia; 20 °C; 0.15 % CO ₂	Wu <i>et al.</i> , 2015
<i>P. tricornutum</i> M28	28.9	Medio Walne's; 100 µE; 15 °C; 1 % CO ₂	Steinrücken <i>et al.</i> , 2018
<i>P. tricornutum</i> cepa (Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences)	26.0	Medio f/2; 100 µE; Autotrofia; 20 °C; 0.15 % CO ₂	Wu <i>et al.</i> , 2019

total de ácidos grasos oscila entre el 14 y el 32 %. Es importante resaltar que una de las principales ventajas del uso de *P. tricornutum* es que, mediante la manipulación de las condiciones de cultivo, es posible incrementar la producción de EPA.

Metabolismo de lípidos en las microalgas

Las vías de biosíntesis de ácidos grasos y lípidos en microalgas son similares a las rutas presentes en plantas, las cuales incluyen vías reportadas en eucariotas y procariotas (Hu *et al.*, 2008). Estas rutas están distribuidas en los diversos orgánulos de las microalgas: cloroplasto, citosol y retículo endoplásmico. Hasta el momento se desconoce cómo estas células regulan el flujo de la fuente de carbono para la producción de lípidos; sin embargo, se ha observado que bajo condiciones de limitación nutricional y en autotrofia, el crecimiento se ve comprometido e inicia la acumulación de lípidos (Cheng & He, 2014).

Ruta de biosíntesis de omega-3

El primer paso para la biosíntesis de ácidos grasos omega-3 en microalgas, es la conversión del acetil-CoA a malonil-CoA. Este

paso es realizado por la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) en el cloroplasto (Huerlimann y Heimann, 2013). Posteriormente, las cadenas de ácidos grasos son elongadas (hasta un total de 18 átomos de carbono) por la enzima sintasa de ácidos grasos (FAS, por sus siglas en inglés *fatty acid synthase*), como se muestra en la Figura 3. Luego de estos pasos, los ácidos grasos se extienden para formar ácidos grasos de 20 a 24 carbonos (C20-C24) de forma saturada o monoinsaturada por elongasas de ácidos grasos citoplasmáticas. Por último, la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga (C > 18) omega-3 es completada por una serie de desaturasas (ubicadas entre el retículo endoplásmico y el citosol), las cuales introducen varios dobles enlaces en el ácido graso (Pérez-García *et al.*, 2011).

El aislamiento de las desaturasas y elongasas ha sido utilizado para la caracterización metabólica de la síntesis de ácidos grasos. Se ha estudiado a la enzima desaturasa PtFAD6 proveniente de *P. tricornutum*, que ha sido caracterizada y participa en la síntesis del ácido γ -linoleico a partir del ácido hexadecadienoico (Domergue *et al.*, 2003). Las desaturasas

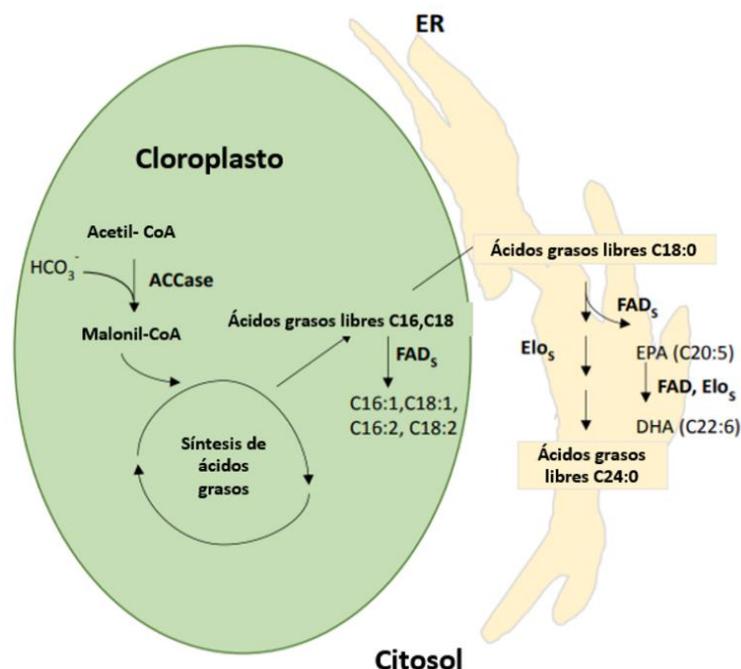


Figura 3. Vías de biosíntesis de ácidos grasos y omega-3.

solubles están involucradas en la conversión del ácido esteárico (C18:0) al ácido oleico (C18:1 n 9), mediante la liberación de dos átomos de hidrógeno, formando así un doble enlace en la cadena carbonada. En la primera etapa, se forma un primer doble enlace en la posición 12-13 de la cadena del ácido oleico (C18:1 n 9). Una segunda desaturación en los carbonos 15-16 de la cadena, da origen al ácido α -linolénico (C18:3 n 3). Posteriormente, se presenta una elongación de la cadena y dos desaturaciones adicionales, que dan origen al ácido eicosapentaenoico (C20:5 n 3). Por la adición de dos carbonos se origina el ácido docosapentaenoico (C22:5 n 3) que es desaturado y da lugar al ácido docosahexaenoico (C22:6 n 3).

Los genes que codifican para las enzimas Δ 4, Δ 5 y Δ 6 desaturasas, implicadas en la síntesis de DHA, ya han sido caracterizadas en *T. pseudonana* (Tonon *et al.*, 2005). Asimismo, los genes para las enzimas acil-CoA Δ 6 y *pta5* elongasa y desaturasa, respectivamente, involucradas en la síntesis de EPA e identificadas en las cepas *O. tauri* (Domergue *et al.*, 2005) y

P. tricornutum (Domergue *et al.*, 2003), respectivamente, mismas que se han logrado sobreexpresar en *P. tricornutum* aumentando considerablemente el contenido de ácidos grasos omega-3 y EPA (Zhu *et al.*, 2017).

Sistemas de cultivo de las microalgas

Las microalgas están adaptadas para acceder a los nutrientes que les permitan su crecimiento y supervivencia, así como para incrementar la eficiencia de utilización de esos nutrientes, en condiciones extremas o de limitación nutricional. En general, en el caso del crecimiento autótrofo, las microalgas dependen de un suministro de dióxido de carbono y luz para llevar a cabo la fotosíntesis. No obstante, las microalgas son capaces de crecer en heterotrofia y mixotrofia (Figura 4), en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo (Wen & Chen, 2003; Chen & Chen, 2006; Morales-Sánchez *et al.*, 2015).

En el caso particular de las diatomeas, son reconocidas por exhibir una gran flexibilidad en su modo de cultivo (Wen & Chen, 2003). La mayor parte de estas son autótrofas (caracterizadas por la fijación de

Figura 4. Cultivos *P. tricornutum* en biorreactor de 1 L en condiciones de mixotrofia.



CO₂, mediante la fotosíntesis). Sin embargo, algunas de estas microalgas son capaces de utilizar fuentes orgánicas de carbono (ej. azúcares, fructosa, glicerol, glucosa, acetato) en condiciones heterótrofas o en presencia de luz (mixotrofia o fotoheterotrofia) (Vazhappilly & Chen, 1998; Chen & Chen, 2006).

Autotrofia

En la actualidad la forma más común de cultivo de microalgas es a través de la autotrofia, debido a su eficiencia para utilizar la luz (solar o artificial) y el uso de CO₂ como fuente de carbono, agua y sales inorgánicas para su crecimiento. Varias tecnologías de cultivo han sido desarrolladas por investigadores y productores comerciales. Las microalgas autótrofas son comúnmente cultivadas en estanques abiertos al ambiente y en fotobiorreactores cerrados. Dentro de las ventajas de los cultivos en estanques abiertos se incluye su sencillez y bajos costos de inversión (Wen & Chen, 2003). Sin embargo, los costos de producción se incrementan al considerar el uso de terrenos, disponibilidad de agua y, debido a que son abiertos al ambiente, son dependientes de las condiciones climatológicas y son susceptibles de contaminación por hongos o bacterias (Morales-Sánchez *et al.*, 2015). Además, estos sistemas presentan problemas como pérdidas de agua por evaporación,

transferencia limitada de CO₂ al cultivo por su baja concentración en el aire (300-700 ppm) y en sistemas con burbujeo de CO₂ su baja solubilidad por la ausencia del control de temperatura (Pérez-García *et al.*, 2011).

En contraste, los fotobiorreactores ofrecen un ambiente cerrado que protegen al cultivo de las condiciones ambientales e invasión de microorganismos no deseados. Las condiciones de cultivo son controladas, hay un aumento en la fijación de CO₂, el cual es burbujeado a través del medio de cultivo y se pueden obtener productividades considerablemente mayores en comparación con los cultivos en estanques abiertos (de 5 a 13 veces; Wen & Chen, 2003). Este sistema de cultivo es más costoso comparado con los estanques abiertos, debido al costo relativamente mayor de la infraestructura.

En el caso particular de *P. tricornutum* bajo condiciones de autotrofia, Wu *et al.* en 2015 reportaron el efecto de la concentración de CO₂, encontrando una mayor productividad de biomasa, en comparación a los cultivos en donde se usó una menor concentración de CO₂. Asimismo, Gardner *et al.* en el 2012, reportaron efectos similares en la productividad de biomasa mediante la adición de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), además de una mayor acumulación de triacilgliceroles (TAGs).

Heterotrofia

Algunas especies de diatomeas pueden crecer de forma heterótrofa utilizando fuentes orgánicas de carbono como sustrato y en la oscuridad. Este grupo de microalgas heterótrofas pueden ser clasificadas en dos categorías: i) heterótrofas obligadas, es decir en ausencia luz son capaces de realizar un cambio metabólico y asumir el metabolismo heterótrofo en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Lee, 2001) y ii) heterótrofos facultativos, los que pueden llevar a cabo de forma separada el proceso de fotosíntesis y la oxidación de compuestos orgánicos de carbono como fuente de energía, en presencia de luz (Pérez-García *et al.*, 2011).

Los equipos utilizados en este sistema de cultivo son biorreactores de tanque agitado, similares a los fermentadores utilizados para otros microorganismos que no requieren luz. Entre las ventajas de la heterotrofia se cuentan: escalamiento sencillo, incluyendo consideraciones como el tamaño del reactor, el mezclado, la transferencia de masa y la productividad (Eriksen, 2008). Además, ofrecen la posibilidad de incrementar en forma importante la producción de biomasa y una alta productividad de lípidos con bajos costos a través de cultivos alimentados, continuos o cultivos de perfusión (Wen & Chen, 2003).

Algunas especies de microalgas heterótrofas han sido utilizadas para la producción de DHA (*S. limacinum*, *C. cohnii*) y EPA (*N. laevis*, *N. alba*) utilizando diversas fuentes de carbono (acetato, glicerol, glucosa, fructosa y almidón), como se describió previamente. Sin embargo, sólo los cultivos para la producción de DHA han logrado la comercialización industrial. Una de las limitantes para la producción heterótrofa de EPA reside en el número de cepas que pueden crecer bajo esas condiciones, el costo de la adición de la fuente orgánica de carbono, la contaminación y competencia con otros microorganismos, la inhibición por el exceso de la fuente de carbono y, principalmente, en la incapacidad de producir intermediarios y metabolitos involucrados en la síntesis de ácidos grasos que sólo pueden ser sintetizados en presencia de luz (Chen, 1996; Wen & Chen, 2003; Pérez-García *et al.*, 2011).

En este sentido, la ingeniería metabólica ha surgido como una herramienta potencial para el uso biotecnológico de estos organismos. Logrando satisfactoriamente el consumo de fuentes orgánicas de carbono en cepas que carecen de los transportadores transmembranales específicos para ciertas fuentes de carbono que no pueden difundir al medio intracelular, o que carecen de las enzimas necesarias para metabolizar fuentes de carbono específicas. Un ejemplo es la cepa *P. tricornutum* Bohlin, a la cual se le incorporó el gen *Glut 1*, proveniente de eritrocito humano, que codifica para el transportador de glucosa (*Glut 1*). De esta forma se obtuvieron clonas de *P. tricornutum* capaces de metabolizar la glucosa en condiciones heterótrofas, incrementando la densidad celular, con respecto a los cultivos de la cepa silvestre (Zaslavskaja *et al.*, 2001).

Mixotrofia

El cultivo mixotrófico surge como una variante del cultivo heterótrofico, donde el CO₂ y la fuente orgánica de carbono son asimilados simultáneamente por el microorganismo a través del proceso de respiración y fotosíntesis (Lee, 2001). Esta estrategia de cultivo se ha utilizado con la finalidad incrementar la concentración de biomasa y de reducir la contaminación por bacterias por el exceso de la fuente orgánica de carbono (Lee, 2001). Dentro de las ventajas en el sistema de cultivo en mixotrofia se han reportado incrementos en la producción de biomasa y un aumento en la velocidad específica de crecimiento (equivalente, en algunos casos, a la suma de la velocidad específica de crecimiento en autotrofia y heterotrofia), además de mantener activas las principales rutas metabólicas para la síntesis de ácidos grasos omega-3, activas en el cloroplasto en condiciones de autotrofia (Pérez-García *et al.*, 2011; Morales-Sánchez *et al.*, 2015).

Algunas especies de microalgas pueden activar el metabolismo mixotrófico, dependiendo de las condiciones de cultivo. Wood *et al.* en 1999 reportaron el uso preferencial del glicerol como fuente orgánica de carbono en condiciones de mixotrofia en las cepas *Nannochloropsis* sp., *Rhodomonas reticulate* y *Cyclotella cryptica*.

En el caso de *P. tricornutum*, se han reportado diversos trabajos que muestran su capacidad de crecer en condiciones de mixotrofia. Cerón-García *et al.*, (2000) analizaron la capacidad de *P. tricornutum* UTEX 640, para crecer en presencia de diversas fuentes de carbono como glicerol, glucosa, acetato y almidón. En estos cultivos, con la adición de 0.1 M de glicerol al medio de cultivo y con una intensidad luminosa de 165 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, se alcanzó la mayor productividad de biomasa: 74 % mayor con respecto a los cultivos en autotrofia. Con respecto al uso de glucosa como sustrato, se observó, a una concentración de 5 g L⁻¹ un efecto positivo en la ganancia de biomasa (mayor al 30 %), respecto a los cultivos control sin glucosa. Sin embargo, el empleo de almidón (0-5 g L⁻¹) y acetato (0-0.1 M) en el caso de la cepa UTEX 640, no evidenció un cambio en la producción de biomasa, respecto a lo observado en los cultivos en condiciones de autotrofia (Cerón-García *et al.*, 2013).

La mayor parte de las vías de biosíntesis de PUFAs se lleva a cabo en el cloroplasto, mismas que se mantienen activas en autotrofia, por lo que a través de cultivos en mixotrofia (modalidad de cultivo que mantiene activas las rutas autótrofas y heterótrofas), se ha logrado incrementar la concentración de biomasa y la síntesis de precursores de lípidos, así como una mayor acumulación de PUFAs (Cerón-García *et al.*, 2005).

Parámetros de cultivo que afectan la producción de Omega-3 en microalgas

Limitación nutricional

Una de las principales estrategias utilizadas para incrementar la producción de lípidos es la limitación nutricional. Se ha reportado que, en especies del género *Schizochytrium*, la limitación de nitrógeno activa a la enzima AMP deaminasa, que reduce la concentración intracelular de AMP en *Schizochytrium*. Cuando hay niveles bajos de AMP en la mitocondria, se inicia una cascada de reacciones que causan la acumulación de citrato. Cuando el citrato se transloca al citosol, éste sirve como precursor del acetil-CoA, que a su vez funciona como un precursor para la síntesis de lípidos (Jakobsen *et al.*, 2008). En *P. tricornutum* se ha reportado que, en cultivos suplementados con urea

(0.1 M), se obtuvo un incremento en la productividad de EPA (11.5 mg L⁻¹día⁻¹) del 25 %, con respecto a los cultivos limitados por la fuente de nitrógeno (8.5 mg L⁻¹día⁻¹). Las diferencias en la producción de EPA se ven afectadas por la baja concentración de biomasa que induce la limitación de nitrógeno en el medio (Cerón-García *et al.*, 2005).

Luz

La luz es una de las variables más importantes en el metabolismo autótrofo y mixotrófico en las microalgas, básicamente por el papel que juega esta variable en el proceso de fotosíntesis (Pérez-García *et al.*, 2011). Se ha reportado que este factor es importante en el metabolismo de lípidos, así como en la composición de los ácidos grasos presentes en las microalgas (Adarme-Vega *et al.*, 2014). Nogueira *et al.*, (2015) evaluaron el impacto de la intensidad luminosa en la producción de triacilglicerol (TAGs) en cultivos de *P. tricornutum* y de ello se puede resumir un incremento en la productividad de 15.58 a 31.39 mg L⁻¹día⁻¹, a una intensidad luminosa de 50 a 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente, favoreciendo así la fracción lipídica.

Temperatura

La temperatura en los cultivos de microalgas es un factor que afecta el crecimiento celular, la composición de lípidos y la formación de ácidos grasos omega-3 de microalgas. El estrés a baja temperatura favorece un incremento en el contenido relativamente alto de omega-3, debido a que las microalgas intentan mantener la fluidez de sus membranas celulares produciendo más ácidos grasos poliinsaturados (Pérez-García *et al.*, 2011). Esta estrategia, se ha empleado utilizando cambios de temperatura para mejorar la producción de los omega-3, incluyendo del EPA, porque la temperatura óptima para el crecimiento de microalgas es a menudo más alta en comparación a la temperatura de formación de los ácidos grasos omega-3 (Adarme-Vega *et al.*, 2014). Dodson *et al.*, (2014) analizaron el efecto de la temperatura en cultivos de *P. tricornutum* y encontraron un alto contenido de EPA y ácido palmítico a 20 °C. Sin embargo, ninguna fracción de EPA o ácidos grasos mayor a 20 carbonos en la mezcla lipídica logró ser detectada al aumentar la temperatura a 30 °C.

Cabe señalar que, cuando la temperatura en los cultivos se redujo de 20 °C a 10 °C, se obtuvo un aumento de aproximado del 85% de EPA. En conclusión, la disminución de la temperatura en cultivos de microalgas se refleja en un incremento en el contenido de los ácidos grasos omega-3 y del EPA. No obstante, a pesar de aumentar el contenido de EPA por unidad de biomasa a bajas temperaturas, el costo de esta estrategia es la disminución de la tasa de crecimiento y la acumulación de biomasa. Por ende, esto se refleja con bajas productividades de EPA (Cui *et al.*, 2019).

Estrategias de ingeniería genética

Otra de las alternativas para incrementar el contenido de lípidos en *P. tricornutum*, es a través de la sobreexpresión de enzimas como la G6PD, involucrada en la ruta de las pentosas fosfato y principal generadora de NADPH, el cual es utilizado para la síntesis de ácidos grasos, ya que es una ruta altamente reductora. Empleando esta cepa transformada de *P. tricornutum*, en cultivos enriquecidos con CO₂ y con una menor concentración de O₂, se logró incrementar la producción de lípidos, así como los ácidos grasos de cadena corta, larga e insaturados, incluyendo el EPA. Estos resultados se obtuvieron por la inhibición de las rutas involucradas en la degradación de ácidos grasos, al disminuir el flujo de electrones hacia la cadena respiratoria al no estar presente el oxígeno como último aceptor de electrones (Wu *et al.*, 2019).

A través de las nuevas herramientas moleculares y el conocimiento del genoma de *P. tricornutum*. Zou *et al.*, (2019) identificaron y realizaron la sobreexpresión de dos genes (*ptme* y *ptd5b*) involucradas en el metabolismo de lípidos y observaron un incremento (2 veces más) en la producción de lípidos neutros, respecto a lo observado en la cepa silvestre. Asimismo, el porcentaje de EPA (35 %) en estas mutantes fue significativamente mayor (1.4 veces más) con respecto a lo obtenido en la cepa silvestre.

Conclusiones

El cultivo de microalgas ha surgido como una alternativa para cubrir la demanda actual de ácidos grasos omega-3 de la población humana. Esto se ha llevado a cabo mediante el desarrollo de estrategias,

principalmente de cultivo, aprovechando la versatilidad metabólica y la capacidad de las microalgas para crecer en sistemas de cultivo autótrofos, heterótrofos y mixotrofos. Ello ha evidenciado el potencial de este grupo de organismos para contribuir al desarrollo de procesos con alta productividad de omegas-3 (DHA y EPA).

La microalga *P. tricornutum* representa una fuente potencial para la producción de omega-3 a escala comercial, la cual acumula de forma natural altos porcentajes de EPA. Sin embargo, cabe resaltar que, si bien se han desarrollado diversas estrategias de bioingeniería e ingeniería genética para lograr mejorar la productividad de EPA en *P. tricornutum*, es todavía necesario desarrollar procesos viables económicamente. En este sentido, uno de los principales desafíos en los cultivos de *P. tricornutum* es maximizar sustancialmente la productividad de biomasa y de EPA, aprovechando las herramientas y los conocimientos reportados hasta la fecha, con el fin de desarrollar procesos que sean rentables y competitivos, en comparación a los procesos tradicionales de obtención a partir del aceite de pescado.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento de este trabajo a la empresa Fresenius Kabi GmbH (proyecto P-9687) y el apoyo de CONACYT por la beca para los estudios de maestría de Tomás García Beltrán.

Referencias

- Adarme-Vega TC, Thomas-Hall SR, y Schenk PM (2014) Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. *Current Opinion in Biotechnology* 26(1): 14–18.
- Bailey RB, Dimasi D, Hansen JM, Mirrasoul PJ, Ruecker CM, y Veeder GT (2003) Enhanced production of lipids containing polyenoic fatty acid by very high density cultures of eukaryotic microbes in fermentors. US Patent No. 6607900.
- Bajpai P, Bajpai PK, y Ward OP (1991) Production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35: 706–710.

- Bhatt DL, Steg PG, Miller M, Brinton EA, Jacobson TA, Ketchum SB, y Ballantyne CM (2018) Cardiovascular risk reduction with icosapent ethyl for hypertriglyceridemia. *New England Journal of Medicine* 380(1):11-22.
- Boswell KDB, Gladue R, Prima B, y Kyle DJ (1992) SCO production by fermentative microalgae. *American Oil Chemists' Society* 35: 274–286.
- Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Otiillar RP (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456(7219): 239–244.
- Bowman L, Mafham M, y Wallendszus K (2018) ASCEND Study collaborative group. Effects of n-3 fatty acid supplements in diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 16:1540-1550.
- Castilla-Casadiago DA, Albis-Arrieta AR, Angulo-Mercado ER, Cervera-Cahuana SJ, Baquero-Noriega KS, Suárez-Escobar AF, y Morales-Avendaño ED (2016) Evaluation of culture conditions to obtain fatty acids from saline microalgae species: *Dunaliella salina*, *Sinecosyfis* sp., and *Chroomonas* sp. *BioMed Research International* 16:1–7.
- Cerón-García MC, Fernández-Sevilla JM, Acién-Fernández FG, Molina-Grima E, y García-Camacho F (2000) Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology* 12(3/5): 239–248.
- Cerón-García MC, Sánchez-Mirón A, Fernández-Sevilla JM, Molina-Grima E, y García-Camacho F (2005) Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Process Biochemistry* 40(1): 297–305.
- Cerón-García MC, Fernández-Sevilla JM, Sánchez-Mirón A, García-Camacho F, Contreras-Gómez A, y Molina-Grima E (2013) Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semi-continuous modes. *Bioresource Technology* 147: 569–576.
- Chen F (1996) High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol* 14: 412-426.
- Chen GQ, y Chen F (2006) Growing phototrophic cells without light. *Biotechnology Letters* 28(9): 607–616.
- Cheng D y He Q (2014) Assessment of environmental stresses for enhanced microalgal biofuel production-an overview. *Frontiers in Energy Research* 2:1-26.
- Cottin SC, Sanders TA, y Hall WL (2011) The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proceedings of the Nutrition Society* 70(02): 215–231.
- Cui Y, Thomas-Hall SR, y Schenk PM (2019) *Phaeodactylum tricornutum* microalgae as a rich source of omega-3 rich oil: Progress in lipid induction techniques towards industry adoption. *Food Chemistry* 297: 1-9.
- Dodson VJ, Mouget JL, Dahmen JL, y Leblond JD (2014) The long and short of it: Temperature-dependent modifications of fatty acid chain length and unsaturation in the galactolipid profiles of the diatoms *Haslea ostrearia* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Hydrobiologia* 727(1): 95–107.
- Domergue F, Spiekermann P, Lerchl J, Beckmann C, Kilian O, Kroth PG, y Heinz E (2003) New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal delta12-fatty acid desaturases. *Plant Physiology* 131(4): 1648-1660.
- Domergue F, Abbadi A, Zähringer U, Moreau H, y Heinz E (2005) In vivo characterization of the first acyl-CoA Delta6-desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*. *The Biochemical Journal* 389(2): 483–490.
- Eriksen N (2008) The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters* 30(9): 1525-1536.
- Finco AM de O, Mamani LDG, Carvalho JC, Melo-Pereira GV, Thomaz-Soccol V, y Soccol CR (2017) Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3. *Critical Reviews in Biotechnology* 37(5): 656–671.

- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294(5548): 1871–1875.
- Gardner RD, Cooksey KE, Mus F, Macur R, Moll K, Eustance E, Peyton BM (2012) Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte *Scenedesmus* sp. and the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology* 24(5): 1311–1320.
- Gogus U, y Smith C (2010) n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *International Journal of Food Science & Technology* 45(3): 417–436.
- Hamilton ML, Haslam RP, Napier JA, y Sayanova O (2014) Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering* 22: 3–9.
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, y Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54(4): 621–639.
- Huerlimann R, y Heimann K (2013) Comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae. *Critical Reviews in Biotechnology* 33(1): 49–65.
- Jakobsen AN, Aasen IM, Josefsen KD, y Strøm AR (2008) Accumulation of docosahexaenoic acid-rich lipid in thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain T66: effects of N and P starvation and O₂ limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80(2): 297–306.
- Kelly PB, Reiser R, y Hood DW (1959) The origin of the marine polyunsaturated fatty acids - composition of some marine plankton. *Journal of the American Oil Chemists Society* 36(3): 104–106.
- Kendrick A, y Rattledge C (1992) Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 27(1): 15–20.
- Kitessa S, Abeywardena M, Wijesundera C, y Nichols P (2014) DHA-Containing oilseed: a timely solution for the sustainability issues surrounding fish oil sources of the health-benefitting long-chain omega-3 oils. *Nutrients* 6(5): 2035–2058.
- Kramer LC (2019) Genetical conversion of a photoautotrophic *Phaeodactylum tricornutum* strain to grow mixotrophic and its impact on the lipid content. PhD Thesis (in progress). Institute for Molecular Bioscience Plant Cell Physiology-Goethe University Frankfurt.
- Kris-Etherton PM, Richter CK, Bowen KJ, Skulas-Ray AC, Jackson KH, Petersen KS, y Harris WS (2019) Recent clinical trials shed new light on the cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Methodist DeBakey cardiovascular journal* 15(3): 171–178.
- Kyle DJ (1992) Production and use of lipids from microalgae. *Lipid Technol* 4: 59–64.
- Lane J (2015) RIP, Aurora algae: algae and the never-never. *Biofuels Digest*. Retrieved from <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2015/07/22/rip-aurora-algae-algae-and-the-never-never/>
- Lee YK (2001) Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology* 13(4): 307–315.
- Manson JE, Cook NR, Lee IM, Christen W, Bassuk SS, Mora S, Gibson H, Gordon D, Copeland T, D'Agostino D, Friedenberg G, Ridge C, Bubes V, Giovannucci EL, Willett WC, Buring JE, y VITAL Research Group (2019) Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine* 380(1): 33–44.
- Martino AD, Meichenin A, Shi J, Pan K, y Bowler C (2007) Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 43(5): 992–1009

- Morales-Sánchez D, Martínez-Rodríguez OA, Kyndt J, y Martínez A (2015) Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 31(1): 1–9.
- Moreno C, Macías Á, Prieto Á, De La Cruz A, González T, y Valenzuela C (2012) Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on cardiac ion channels. *Frontiers in Physiology* 245(3):1-8.
- Mühlroth A, Li K, Røkke G, Winge P, Olsen Y, Hohmann-Marriott MF, Bones AM (2013) Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of chromista. *Marine Drugs* 11(11): 4662–4697.
- Napier JA, Usher S, Haslam RP, Ruiz-Lopez N, y Sayanova O (2015) Transgenic plants as a sustainable, terrestrial source of fish oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 117(9): 1317–1324.
- Nogueira DPK, Silva AF, Araújo OQF, y Chaloub RM (2015) Impact of temperature and light intensity on triacylglycerol accumulation in marine microalgae. *Biomass and Bioenergy* 72: 280–287.
- Oliver L, Dietrich T, Marañón I, Villarán MC, y Barrio RJ (2020) Producing omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of sustainable sources and future trends for the EPA and DHA market. *Resources* 9(12): 148-163.
- OMS (2008) Interim summary of conclusions and dietary recommendations on total fat and fatty acids. *Jt. FAO/WHO Expert Consult Fats Fatty Acids Hum Nutr* 11: 10–14.
- Pérez-García O, Escalante FME, de-Bashan LE, y Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* 45(1): 11–36.
- Ren L, Ji X, Huang H, y Qu L (2010) Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. *Microbial Biotechnology* 87: 49–56.
- Sang M, Wang M, y Liu J (2012) Effects of temperature, salinity, light intensity, and pH on the eicosapentaenoic acid production of *Pinguicoccus pyrenoidosus*. *Journal of Ocean University of China* 11(2): 181–186.
- Serif M, Lepetit B, Weißert K, Kroth PG, y Rio Bartulos C (2017) A fast and reliable strategy to generate TALEN-mediated gene knockouts in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research* 23:186–195.
- Simopoulos AP (2002) Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: The epidemiological evidence. *Environmental Health and Preventive Medicine* 6(4): 203–209.
- Singh A, y Ward O P (1997) Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6). *Advances in Applied Microbiology* 45: 271–312.
- Steinrücken P, Prestegard SK, de Vree JH, Storesund JE, Pree B, Mjøs SA, y Erga SR (2018) Comparing EPA production and fatty acid profiles of three *Phaeodactylum tricornutum* strains under western norwegian climate conditions. *Algal Research* 30: 11–22.
- Stukenberg D, Zauner S, Dell'Aquila G, y Maier UG (2018) Optimizing CRISPR/Cas9 for the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Frontiers in Plant Science* 9: 740-751.
- Tesson B, Gaillard C, y Martin-Jézéquel V (2009) Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Botanica Marina* 52(2): 104-116.
- Tonon T, Sayanova O, Michaelson LV, Qing R, Harvey D, Larson TR, y Graham IA (2005) Fatty acid desaturases from the microalga *Thalassiosira pseudonana*. *FEBS Journal* 272: 3401–3412.
- Vazhappilly R, y Chen F (1998) Heterotrophic production potential of omega-3 polyunsaturated fatty acids by microalgae and algae-like microorganisms. *Botanica Marina* 41: 553–558.
- Wang HA, Ru Fu, y Guofeng Pei (2012) A study on lipid production of the mixotrophic microalgae *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *African Journal of Microbiology Research* 6: 1041-1047.

Artículos

- Ward OP, y Singh A (2005) Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry* 40(12): 3627–3652.
- Wen ZY, y Chen F (2000) Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Biotechnology Letters* 22(9): 727–733.
- Wen ZY, y Chen F (2003) Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances* 21(4): 273–294.
- Wood BJB, Grimson PHK, German JB, Turner M (1999) Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. *Journal of Biotechnology* 70: 175-183.
- Winwood RJ (2013) Recent developments in the commercial production of DHA and EPA rich oils from micro-algae. *Oilseeds & fats Crops and Lipids* 20(6): 1-5.
- Wu S, Huang A, Zhang B, Huan L, Zhao P, Lin A, y Wang G. (2015). Enzyme activity highlights the importance of the oxidative pentose phosphate pathway in lipid accumulation and growth of *Phaeodactylum tricorutum* under CO₂ concentration. *Biotechnology for Biofuels* 8(1): 1-11.
- Wu S, Gu W, Huang A, Li Y, Kumar M, Lim PE, y Wang G (2019) Elevated CO₂ improves both lipid accumulation and growth rate in the glucose-6-phosphate dehydrogenase engineered *Phaeodactylum tricorutum*. *Microbial Cell Factories* 18(1):1-16.
- Yongmanitchai W, y Ward OP (1991) Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricorutum* under different culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 57(2): 419–425.
- Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Shih C, Ehrhardt D, Grossman AR, y Apt KE (2001) Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science* 292(5524): 2073-2075.
- Zhao P, Gu W, Wu S, Huang A, He L, Xie X, Wang G (2014) Silicon enhances the growth of *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin under green light and low temperature. *Scientific Reports* 4(1):1-10.
- Zhu BH, Tu CC, Shi HP, Yang GP, Pan KH (2017) Overexpression of endogenous delta-6 fatty acid desaturase gene enhances eicosapentaenoic acid accumulation in *Phaeodactylum tricorutum*. *Process Biochemistry* 57: 43–49.
- Zou L, Balamurugan S, Zhou T, Chen J, Li D, Yang W, Li H (2019) Potentiation of concurrent expression of lipogenic genes by novel strong promoters in the oleaginous microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Biotechnology and Bioengineering* 116 (11): 3006-3015.