

## Poliglucanos de reserva en microalgas: química, biosíntesis y manipulación de condiciones de cultivo

Carlos Montenegro-Herrera\*, Mariana Manzoni Maroneze, Francisco Vera-López Portillo, Alfredo Martínez

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62200, México

carlos.montenegro@ibt.unam.mx

### Resumen

En la actualidad, las microalgas se usan como fuentes en la producción de diferentes compuestos comerciales de valor agregado, por ejemplo: pigmentos ( $\beta$ -carotenoides, clorofila, ficobiliproteínas) y lípidos (ácidos grasos poliinsaturados-PUFAs), y en algunos casos la propia biomasa microalgal. Sin embargo, se ha centrado poca atención en el estudio de los azúcares de reserva (poliglucanos) que pueden llegar a acumular las microalgas bajo condiciones específicas de cultivo. Desde el punto de vista de una biorrefinería, la biomasa microalgal presenta el potencial para el aprovechamiento de las diferentes macromoléculas que la conforman, tales como pigmentos, proteínas, lípidos y carbohidratos, siendo éstos últimos una materia prima susceptible a ser utilizada como fuente de carbono (biomasa de tercera generación), para la obtención, por vía fermentativa, de productos de interés industrial como ácidos orgánicos y biocombustibles. En este sentido, el objetivo de este trabajo es revisar los principales carbohidratos de reserva presentes en las microalgas, abordando sus características estructurales, la biosíntesis y las principales estrategias utilizadas en los cultivos para incrementar el contenido de dichos compuestos.

**Palabras clave:** Microalga, compuesto de reserva, poliglucano.

### Abstract

Currently, microalgae are used to produce different high-value commercial compounds, i.e., pigments ( $\beta$ -carotenoids, chlorophyll, phycobiliproteins), and lipids (polyunsaturated fatty acids-PUFAs), and the biomass itself. However, little attention has been focused on the study of reserve carbohydrates (polyglucans), which microalgae can accumulate under specific cultivation conditions. From a biorefinery perspective, microalgal biomass has the potential to be used as a source of several macromolecules, such as pigments, proteins, lipids, and carbohydrates. Among them, polyglucans can be used as a raw material to generate monosaccharides, that can be fermented to several products, including organic acids and biofuels, in the so called third generation biomass and biorefinery concepts. In this sense, the objective of this report is to review the main reserve carbohydrates stored in microalgae, addressing the structural characteristics, biosynthesis, and the main strategies used in the cultivation conditions to increase these storage compounds.

**Key words:** Microalgae, storage compound, polyglucan.

## Carbohidratos presentes en microalgas

En los últimos años, la investigación con microalgas para aplicaciones biotecnológicas se ha incrementado sustancialmente y ha cobrado gran importancia debido a la capacidad de utilizar la energía solar para fijar el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) atmosférico, mediante la fotosíntesis (Masojídek et al., 2007), y en consecuencia ayudar a mitigar algunas causas que han originado el cambio climático mediante la captura de CO<sub>2</sub>. Además, potencialmente la productividad de biomasa microalgal y otros compuestos como pigmentos, lípidos, proteínas y carbohidratos de reserva, son más altas que las obtenidas con plantas terrestres (Bajpai et al., 2014). Así mismo, debido a la posibilidad de llevar a cabo el cultivo de estos microorganismos sin hacer uso de suelo agrícola, se hace evidente el potencial que presentan para la producción de diferentes metabolitos y productos químicos de interés, incluyendo carbohidratos de reserva, sin competir con la producción de alimentos en suelo agrícola. Las microalgas son materias primas prometedoras en la producción sostenible de biocombustibles y productos químicos valiosos. La investigación en microalgas no solo se centra en mejorar la generación de productos, sino también en la obtención de nuevos compuestos de interés, en donde la materia prima para biorrefinar estos compuestos es la biomasa microalgal, llevando a cabo cultivos en condiciones controladas de crecimiento (Perez-García & Bashan, 2015).

Las biorrefinerías de microalgas tienen el potencial de producir compuestos químicos de interés para su uso en diferentes industrias como la alimentaria, farmacéutica, química,

cosmética y bioenergética. En los tres últimos lustros, la producción de biodiesel a partir de lípidos obtenidos de microalgas es una de las alternativas más estudiadas en lo que respecta a la producción de bioenergía (Cesário et al., 2018). Otra opción es la utilización de los carbohidratos de reserva de las microalgas como materia prima para la fermentación microbiana, mediante la cual se abre la posibilidad de producir una gama amplia de productos químicos (p. ej., aminoácidos o ácidos orgánicos) y biocombustibles (p. ej. bioetanol y biobutanol) que actualmente son producidos por vía fermentativa haciendo uso de levaduras o bacterias (Mayers et al., 2018).

## Estructura de los glucanos de reserva

En las células de microalgas los carbohidratos se pueden encontrar en la pared celular externa (pectina, agar y alginato), la pared celular interna (celulosa y hemicelulosa) y dentro de la célula como productos de almacenamiento (por ejemplo, almidón y glucógeno) (Martín-Juárez et al., 2017). Respecto a los glucanos de almacenamiento o de reserva, éstos corresponden a polímeros de glucosa y se pueden clasificar en alfa-glucanos o beta-glucanos teniendo en cuenta el tipo de enlace glicosídico (enlace entre dos grupos funcionales hidroxilo) que presenten las subunidades monoméricas del polímero (Al Abdallah et al., 2016): alfa ( $\alpha$ ) si el grupo hidroxilo se encuentra en la parte inferior del carbono anomérico; o beta ( $\beta$ ), si el grupo hidroxilo se encuentra en la parte superior del carbono anomérico (figura 1).

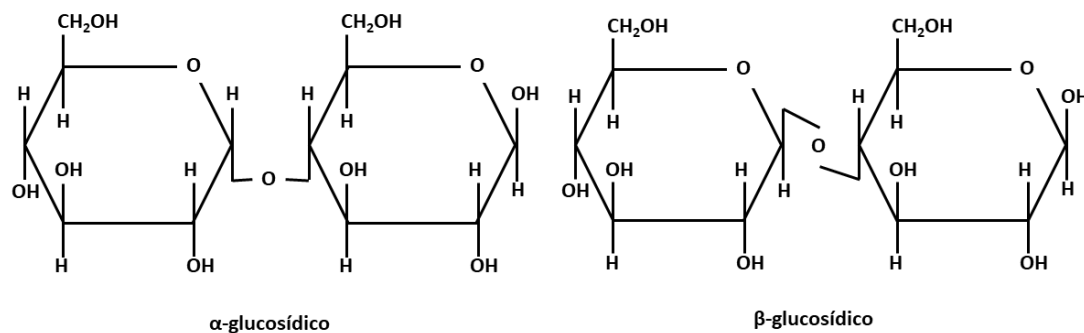


Figura 1. Representación esquemática de los enlaces  $\alpha$ -glucosídico y  $\beta$ -glucosídico presentes en los glucanos de reserva (adaptado de Blanco y Blanco 2017).

## Alfa-glucanos

La síntesis de alfa-glucanos es única para el subgrupo Archaeplastida, el cual incluye: 1) algas verdes y plantas terrestres (Chloroplastida), las cuales sintetizan almidón, 2) las algas rojas (Rhodophyceae) que sintetizan un tipo de almidón carente de amilosa, también llamado almidón florideo (similar al glucógeno y a la amilopectina), y un grupo menor llamado 3) Glaucophytes, los cuales acumulan polímeros de glucosa en forma de glucógeno. La característica más notable es que en las plantas terrestres y algas verdes la síntesis de almidón se lleva a cabo al interior de los plástidos, mientras que en las algas rojas y en los Glaucophytes la síntesis del polímero de reserva se produce en el citosol (Ball et al., 2011; Busi et al., 2014) (tabla 1).

El almidón, el almidón florideo y el glucógeno corresponden a polímeros de glucosa con una cadena principal lineal de

unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1-4) y ramificaciones unidas en ciertos puntos a través de enlaces  $\alpha$ -(1-6) (Ball et al., 2011) (figura 2). El glucógeno y la amilopectina difieren en el porcentaje y la distribución de las ramificaciones, lo cual afecta la estructura y las propiedades de la molécula. El almidón está compuesto por dos tipos de polímeros: amilosa (30%), prácticamente sin ramificaciones, y amilopectina (70%), el cual presenta un 5-6% de ramificaciones (enlaces  $\alpha$ -(1-6)) distribuidas de forma no aleatoria. Las regiones ramificadas están dispuestas en grupos separados por regiones lineales, lo que lleva a la aparición de secciones cristalinas y la formación de gránulos de almidón. El glucógeno y el almidón florideo contienen cadenas lineales más cortas en comparación con la amilopectina y un mayor número de puntos de ramificación. El grado de ramificación del glucógeno depende de su fuente y varía del 7 al 13% (Martinez-Garcia et al. 2016).

Tabla 1. Poliglucanos de reserva sintetizados por los principales grupos taxonómicos de microalgas (adaptado de Al Abdallah et al., 2016)

Polímero	Monómero	Enlaces glucosídicos	Ubicación celular	Grupo taxonómico
Almidón				
Amilosa (30%) Amilopectina (70%)	Glucosa	$\alpha$ -(1-4) $\alpha$ -(1-4) y $\alpha$ -(1-6)	Cloroplasto	Chlorophyta
Almidón Florideo	Glucosa	$\alpha$ -(1-4) y $\alpha$ -(1-6)	Citosol	Rhodophyta
Glucógeno	Glucosa	$\alpha$ -(1-4) y $\alpha$ -(1-6)	Citosol	Cyanophyta
Laminarina	Glucosa	$\beta$ -(1-3) y $\beta$ -(1-6)	Citosol	Phaeophyceae
Crisolaminarina	Glucosa	$\beta$ -(1-3) y $\beta$ -(1-6)	Citosol	Bacillariophyceae Xanthophyceae Chrysophyceae Haptophyta Chlorarachniophyta
Paramilon	Glucosa	$\beta$ -(1-3)	Citosol	Euglenophyta

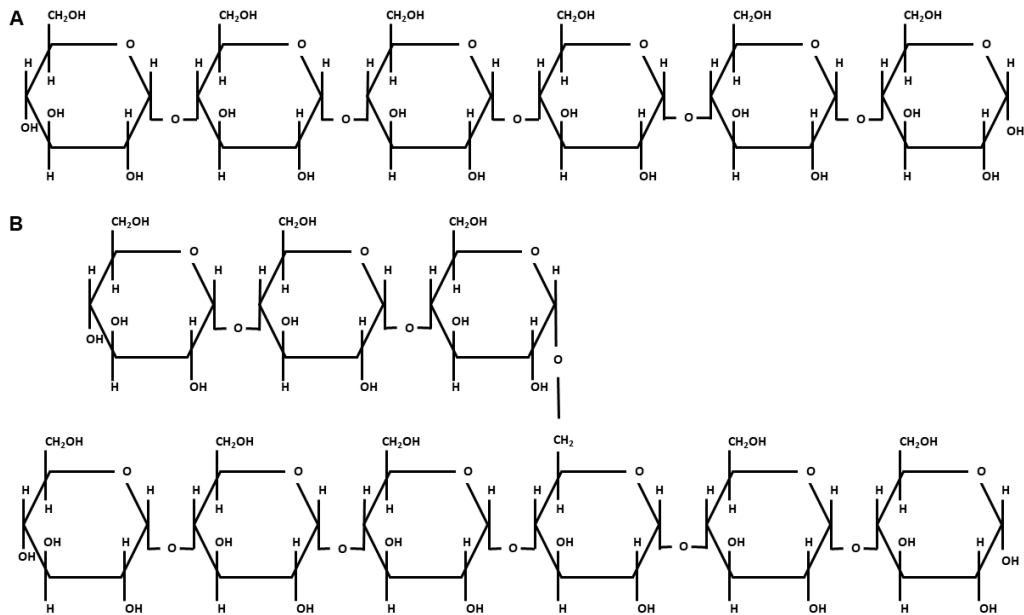


Figura 2. Representación esquemática de la estructura química de los principales alfa-glucanos de reserva de microalgas. A. Estructura lineal de la amilosa. B. Estructura lineal y ramificada de la amilopectina, almidón florideo y glucógeno (adaptado de Al Abdallah et al., 2016).

## Beta-glucanos

Respecto a la síntesis de beta-glucanos de reserva en microorganismos fotosintéticos, ésta es llevada a cabo por algas pertenecientes a los grupos Phaeophyceae (algas pardas), Bacillariophyceae (diatomeas) y Euglenophyta, los cuales acumulan en el citosol laminarina, crisolaminarina (similar a la laminarina) y paramilon (Al Abdallah et al., 2016). Los anteriores  $\beta$ -glucanos, corresponden a polímeros lineales de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -(1-3) y con ramificaciones  $\beta$ -(1-6) cada 20-25 unidades de glucosa (figura 3), con diferentes terminaciones reductoras que pueden tener residuos de manitol o glucosa (Stone, 2009; Mišurcová et al., 2012; Délérís et al., 2016). Las principales diferencias estructurales entre la laminarina y la crisolaminarina se deben a la relación de enlaces  $\beta$ -(1-3) :  $\beta$ -(1-6), la cual es de 15:1 y 11:1, respectivamente (Al Abdallah et al. 2016), y a la presencia de glucosa y manitol en el extremo reductor en los polímeros de laminarina, a diferencia de la crisolaminarina que únicamente presenta glucosa en el extremo reductor. En cuanto al paramilon, difiere estructuralmente de los otros dos  $\beta$ -glucanos al carecer de

ramificaciones y presentar únicamente una cadena lineal de monómeros de glucosa unidos mediante enlaces  $\beta$ -(1-3) (Al Abdallah et al. 2016).

## Biosíntesis de los glucanos de reserva en microalgas

### Fijación del CO<sub>2</sub>

Al ser microorganismos fotosintéticos, el primer paso es la fijación de CO<sub>2</sub> (carbono inorgánico) y su conversión en esqueletos carbonados (carbono orgánico). Durante la fotosíntesis, las microalgas producen monosacáridos, los cuales se usan como fuente de carbono y energía para la producción de otras macromoléculas (Masojídek et al. 2007). La fotosíntesis se divide en dos fases: la fase luminosa, en la cual se genera energía ATP, NADPH y oxígeno a partir de luz y agua, y la fase de oscuridad, en la cual se emplea la energía generada en la fase anterior para fijar CO<sub>2</sub> a través del ciclo de Calvin-Benson mediante la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) en el cloroplasto (Maia et al., 2020). El producto

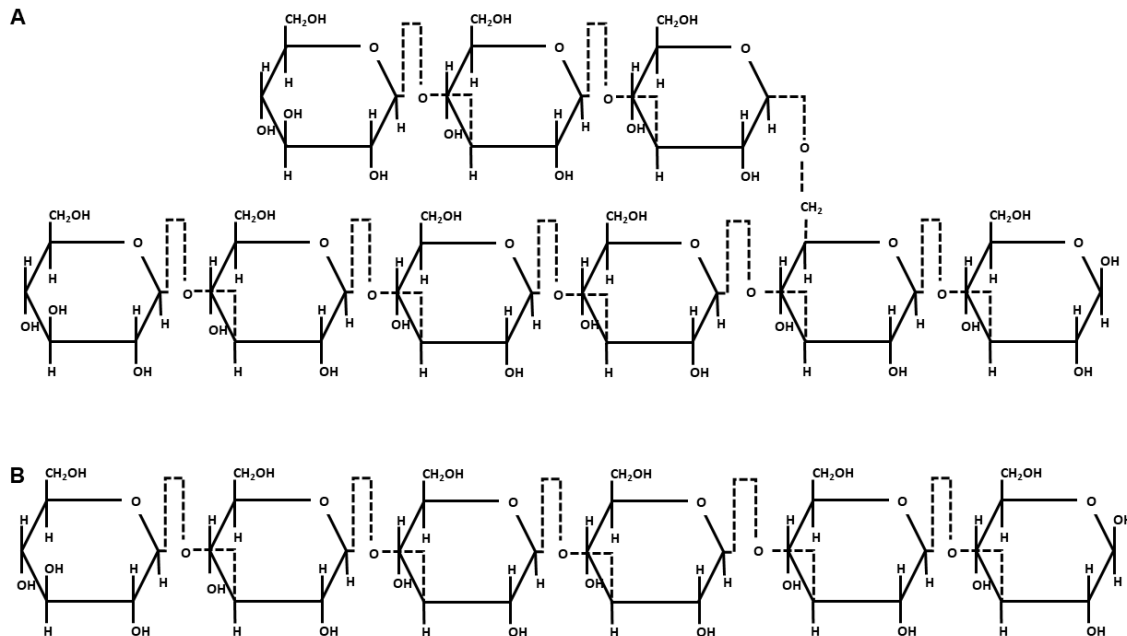


Figura 3. Representación esquemática de la estructura química de los principales beta-glucanos de reserva de microalgas. A. Estructura lineal y ramificada de la laminarina y crisolaminarina. B. Estructura lineal del paramillon (adaptado de Al Abdallah et al., 2016).

final de la fotosíntesis es un metabolito de 3 carbonos (gliceraldehído-3-fosfato; GAP), que posteriormente es exportado al citosol. El GAP se sitúa en el centro del metabolismo de azúcares, el cual se divide en gluconeogénesis y glucólisis. La gluconeogénesis genera glucosa 6-fosfato (G6P), que luego se invierte en la síntesis de carbohidratos o en la ruta de las pentosas fosfato para la generación de poder reductor (NADPH). La glucólisis genera fosfoenolpiruvato (PEP), que luego se utiliza en la síntesis de lípidos o en el ciclo del ácido cítrico, en el cual se producen metabolitos intermedios necesarios para la síntesis de biomasa. Los cofactores (FADH, NADH) generados por el ciclo del ácido cítrico se transforman en energía (ATP) gracias a la fosforilación oxidativa (Baroukh et al. 2014).

Cuando la intensidad de luz es demasiado alta o cuando el suministro de nutrientes inorgánicos es limitado (por ejemplo, estrés de nitrógeno), la tasa de producción de glucosa durante la fotosíntesis puede exceder la tasa de consumo de glucosa por la célula. Este exceso no se puede almacenar como glucosa debido a la alteración del equilibrio osmótico de la célula.

Por lo tanto, la glucosa sobreproducida se convierte en polisacáridos o en lípidos, que actuarán como reservorio de carbono y energía para su futuro uso. Debido a que la conversión de glucosa en polisacáridos es mucho más rápida que en lípidos, las microalgas a menudo primero acumulan carbohidratos y posteriormente lípidos (Martín-Juárez et al., 2017).

### Síntesis de alfa-glucanos en microalgas

La síntesis de poliglucanos de reserva en algas rojas procede a través de una UDP-glucosa-selectiva  $\alpha$ -glucano sintasa, en analogía con la ruta citosólica de la síntesis de glucógeno en otros eucariotas (Viola et al., 2001; Ball et al., 2011), mientras que la biosíntesis de almidón en el caso de las algas verdes procede a través de una ADP-glucosa selectiva  $\alpha$ -glucano sintasa, al igual que las plantas terrestres (Busi et al., 2014).

De forma general la síntesis de carbohidratos de reserva (glucógeno y almidón) está mediada por tres pasos: activación del sustrato, elongación de la cadena principal y ramificación de la cadena (Busi et al., 2014). La activación del sustrato se lleva a cabo mediante la enzima UDP/ADP-

glucosa-pirofosforilasa, la cual se encarga de catalizar la conversión de glucosa-1-fosfato en UDP-glucosa o ADP-glucosa. Posteriormente, la elongación de la cadena principal y formación del maltooligosacárido (MOS) (Ran et al., 2019) se encuentra mediada por una enzima glucosiltransferasa o  $\alpha$ -glucano sintasa selectiva (glucógeno-sintasa o almidón-sintasa), que transfiere una unidad de azúcar activada a un grupo hidroxilo de azúcar no reductor, generándose un enlace glucosídico  $\alpha$ -(1-4) entre el carbono 1 del grupo glucosilo que entra y el carbono 4 del residuo de glucosa del extremo no reductor de la cadena polimérica existente o del cebador. En este punto, la síntesis de alfa-glucanos se divide en dos caminos, en donde, por un lado, continua la elongación y obtención de cadenas lineales, para la formación de

amilosa, mediante la enzima almidón-sintasa ligada al gránulo, y por el otro, se lleva a cabo la formación de glucanos ramificados (amilopectina, almidón florideo y glucógeno). La ramificación de la cadena procede a través de la enzima ramificante o amilo-(1,4-1,6)-transglucosilasa, la cual transfiere un fragmento terminal de unidades de glucosa unidas por un enlace  $\alpha$ -(1-4) a un grupo hidroxilo situado en la posición 6 de un residuo de glucosa del interior del polímero, generándose dos extremos no reductores para que continúe la elongación de la cadena (Mathews et al., 2005; Ball et al., 2011; Busi et al., 2014). La actividad catalítica conjunta de las enzimas almidón/glucógeno sintasa y ramificante conllevan a la aparición de polisacáridos solubles en agua (WSP), los cuales aumentan de tamaño conforme se

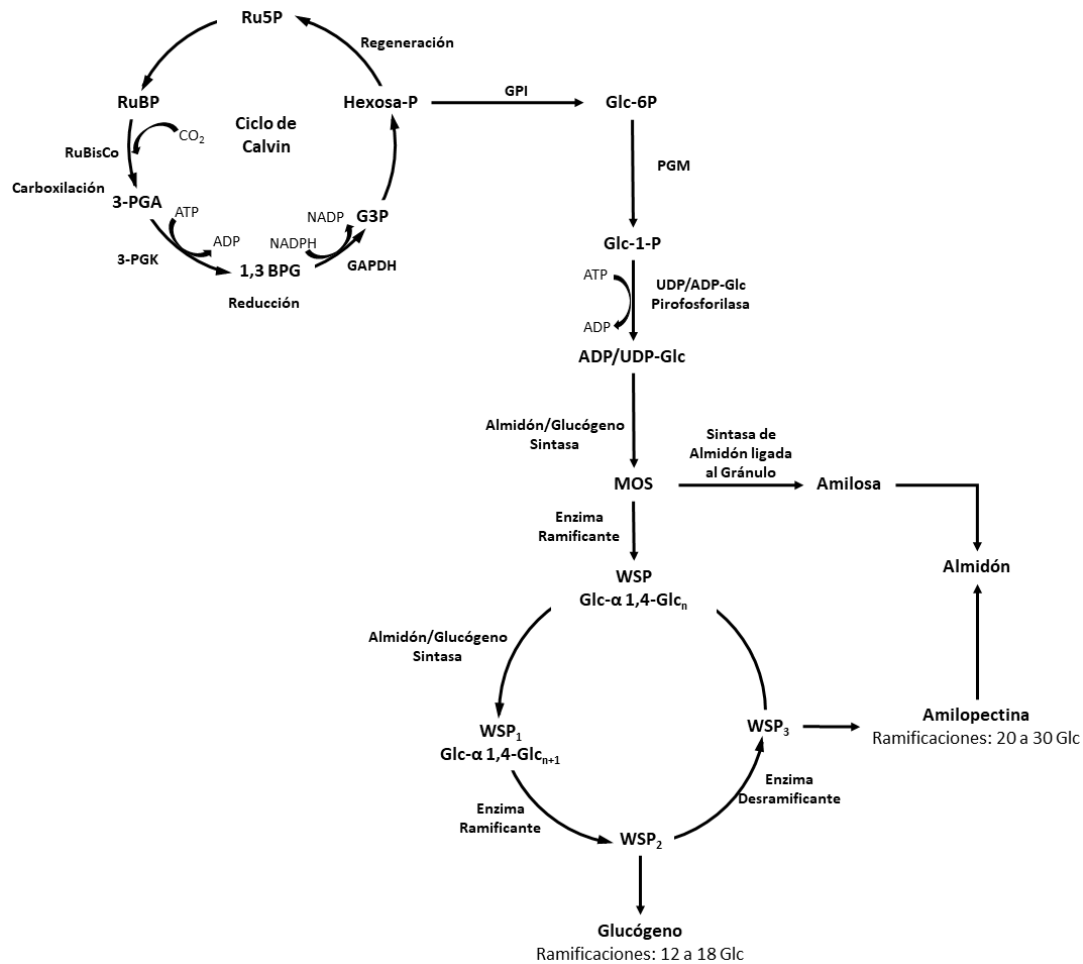


Figura 4. Vía de síntesis de los principales alfa-glucanos de reserva (glucógeno y almidón) acumulados en microalgas (adaptado de Ran et al., 2019). Las abreviaturas corresponden a RuBP: ribulosa-1,5-bifosfato, RuBisCo: ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa, 3-PGA: ácido-3-fosfoglicérico, 3-PGK: 3-fosfoglicerato quinasa, 1,3 BPG: 1,3-bifosfoglicerato, GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, G3P: gliceraldehido-3-fosfato, Ru5P: ribulosa-5-fosfato, GPI: Fosfoglucoosa isomerasa, Glc6P: glucosa-6-fosfato, PGM: fosfoglucomutasa, Glc1P: glucosa-1-fosfato, UDP: uridina difosfato, ADP: adenosín difosfato, MOS: maltooligosacárido, WSP: polisacáridos solubles en agua.

siguen agregando monosacáridos de glucosa a los extremos reductores y se siguen ramificando hasta obtener finalmente un  $\alpha$ -poliglucano como el glucógeno o el almidón florideo (Ran et al., 2019). En plantas superiores y algas verdes, una enzima desramificante (isoamilasa) interviene en la formación del polímero ramificado (amilopectina), la cual se encarga de controlar el espaciado entre las ramificaciones y por ende favorecer la estructura cristalina característica de los gránulos de almidón (Busi et al. 2014; Powell et al. 2015). La posición de las ramificaciones corresponde a una de las principales diferencias entre el glucógeno y la amilopectina, ya que en el caso del glucógeno las ramificaciones se dan cada 12 ó 18 unidades de glucosa y en la amilopectina se dan cada 20 ó 30 unidades de glucosa (Mathews et al., 2005).

## Síntesis de beta-glucanos en microalgas

Respecto a la síntesis y acumulación de beta-poliglucanos en microalgas, la ruta anabólica implicada en dicho proceso aún no se encuentra bien descrita. Sin embargo, para especies como *Euglena gracilis* se conoce que la ruta citosólica de la síntesis de paramilon, análoga a la ruta biosintética de glucógeno, inicia con la activación del sustrato Glc-1-P, el cual es convertido en UDP-Glc por la enzima UDP-Glc pirofosforilasa. Una vez obtenido el sustrato activador (UDP-Glc), la enzima glucosiltransferasa, conocida como paramilon sintasa, se encarga de llevar a cabo la elongación de las cadenas poliméricas mediante la formación de enlaces  $\beta$ -(1-3) glucosídicos entre las subunidades monoméricas, obteniendo de forma inicial un polímero  $\beta$ -(1-3)-glucano insoluble, que da lugar a formación del gránulo citoplasmático (Merwe, 2007; O'Neill et al., 2015; Muchut et al., 2021).

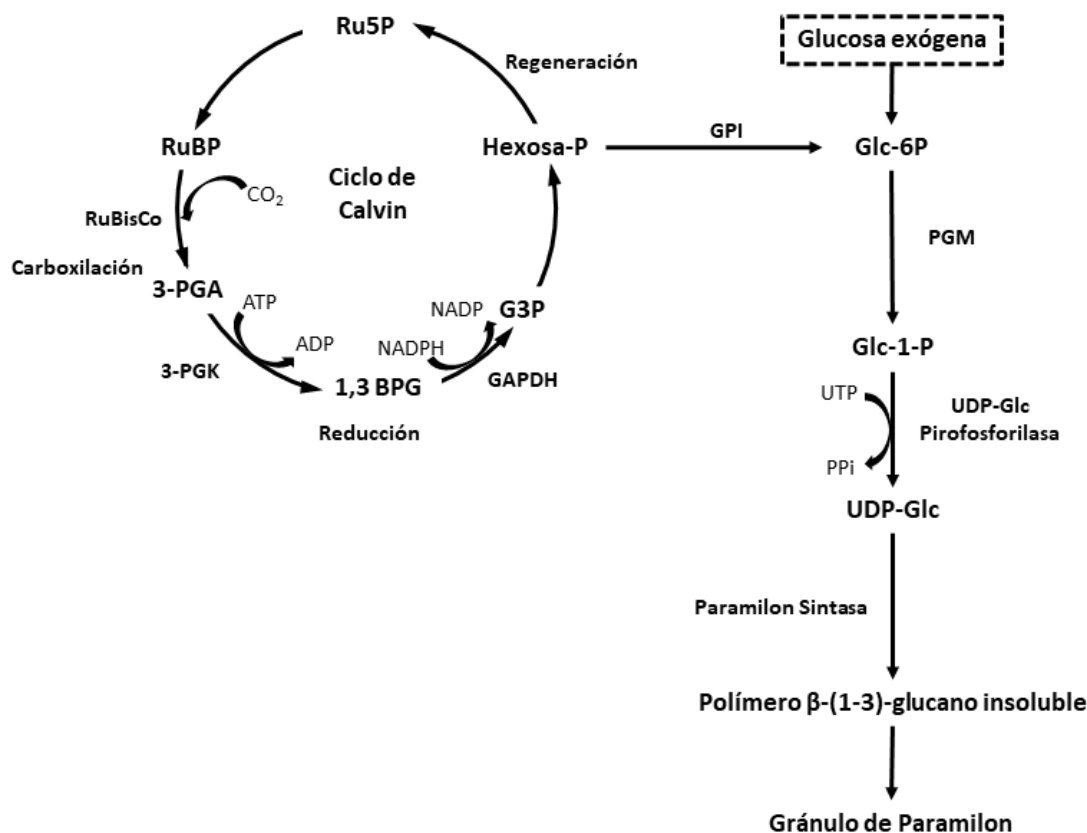


Figura 5. Vía de síntesis de beta-glucanos de reserva (Paramilon) acumulados en microalgas. (Merwe, 2007; O'Neill et al., 2015; Muchut et al., 2021). Las abreviaturas corresponden a RuBP: ribulosa-1,5-bisfosfato, RuBisCo: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, 3-PGA: ácido-3-fosfoglicérico, 3-PGK: 3-foglicerato quinasa, 1,3 BPG: 1,3-bisfosfoglicerato, GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, G3P: gliceraldehido-3-fosfato, Ru5P: ribulosa-5-fosfato, GPI: Fosfoglicosa isomerasa, Glc6P: glucosa-6-fosfato, PGM: fosfoglucomutasa, Glc1P: glucosa-1-fosfato, UDP: uridina difosfato, ADP: adenosín difosfato.

## **Manipulación de nutrientes y condiciones de cultivo para favorecer la acumulación de carbohidratos de reserva**

Con el fin de aumentar el contenido de carbohidratos de reserva en la biomasa microalgal, la manipulación tanto de los nutrientes (macro y micronutrientes) como de las condiciones de cultivo ha resultado una de las principales estrategias a implementar, con el fin de favorecer la actividad enzimática de algunas proteínas clave involucradas en la biosíntesis de carbohidratos de reserva (González-Fernández & Ballesteros, 2012).

Respecto a los macro y micronutrientes, así como moléculas esenciales para el crecimiento celular, la limitación de algunos de ellos como nitrógeno (N), fósforo (P), calcio (Ca) y magnesio (Mg), ha demostrado ser efectiva en la alteración del contenido de macromoléculas de la biomasa (carbohidratos, lípidos y proteínas), generando un aumento de los glucanos de reserva (Shahid et al., 2020). Bajo condiciones limitantes de nitrógeno, elemento esencial en la síntesis de pigmentos, proteínas y ácidos nucleicos, las células metabolizan el nitrógeno contenido en las proteínas, se detiene la división celular y se redirige el flujo de carbono fijado a través de la fotosíntesis hacia la síntesis de polímeros de reserva, aumentando la actividad enzimática de algunas enzimas clave como la anhidrasa carbónica (CA), la RuBisCo y la glucosiltransferasa (glucógeno/almidón sintasa) (González-Fernández & Ballesteros, 2012; Zachleder & Brányiková, 2014; Ran et al., 2019). En cuanto al fósforo, es un componente importante de los ácidos nucleicos, de algunas moléculas proveedoras de energía celular (ATP / ADP / AMP) y de las membranas celulares (fosfolípidos) (Ran et al., 2019). Se ha observado que la limitación de fósforo también puede ejercer estrés sobre las microalgas, lo que lleva a la acumulación de compuestos de reserva de energía, aumentando la actividad de la enzima anhidrasa carbónica y por ende generando un incremento la disponibilidad de carbono inorgánico en forma de CO<sub>2</sub> susceptible de ser fijado más adelante en el ciclo de Calvin por la enzima RuBisCo (Kozłowska-Szerenos et al., 2004; González-Fernández & Ballesteros, 2012). Así mismo, en condiciones de cultivo

óptimas y sin limitación de nutrientes, el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) generado en la fotosíntesis, se transporta fuera del cloroplasto a cambio de ortofosfato citoplasmático (Pi) que fluye hacia el interior del cloroplasto. Cuando el Pi es limitado el transporte de G3P puede reducirse, con lo cual se aumenta la concentración del precursor para la síntesis de almidón en algas verdes (Geigenberger, 2011; Ran et al., 2019).

Por otra parte, en cuanto a la manipulación de nutrientes, teniendo en cuenta que la limitación de nitrógeno y fósforo trae consigo efectos negativos sobre la generación de moléculas y compuestos involucrados en el crecimiento celular y por ende en la generación de biomasa, el cultivo de microalgas suplementando el aire con CO<sub>2</sub> (2-5%) ha demostrado ser una buena estrategia para incrementar el contenido de compuestos de reserva, sin afectar el crecimiento celular (Markou et al., 2014; Ran et al., 2019). De igual forma, se ha reportado que el incremento de la concentración de carbono inorgánico en los cultivos microalgales, puede conllevar incrementos del contenido de amilosa en los gránulos de almidón, teniendo en cuenta que la actividad catalítica de la enzima almidón sintasa aumenta (Izumo et al., 2007; González-Fernández & Ballesteros, 2012).

Finalmente, en lo que respecta a la manipulación de condiciones de cultivo, la intensidad de luz (irradiancia) y la temperatura juegan un papel importante en el incremento de los compuestos de reserva. Al ser microorganismos fotosintéticos, la luz es fundamental para que se lleve a cabo la fotosíntesis y por ende la obtención de energía. El incremento de la irradiancia, sin llegar a la fotoinhibición, conlleva a un aumento de la actividad carboxilasa de la enzima RuBisCo, con lo cual se incrementa la actividad fotosintética y la concentración de carbono orgánico (precursores de la síntesis de poliglucanos) (González-Fernández & Ballesteros, 2012; Shahid et al., 2020). Por otra parte, en cuanto a la temperatura, el aumento o la disminución de este parámetro puede afectar la estructura del polímero, puesto que la actividad catalítica de la enzima almidón sintasa disminuye cuando decrece la temperatura, con lo cual se favorece la síntesis de amilopectina (glucano ramificado), sobre la de amilosa (glucano lineal) (González-Fernández & Ballesteros, 2012).



## Estudios enfocados a la producción de poliglucanos de reserva

En los últimos años, se han llevado a cabo diferentes investigaciones enfocadas a la producción de  $\alpha$ -poliglucanos, en forma de almidón o de glucógeno, utilizando cianobacterias o microalgas bajo condiciones limitantes de nutrientes o de estrés (tabla 2). Behrens et al. (1989) evaluaron el crecimiento de *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11B en cultivo discontinuo bajo condiciones limitantes de nitrógeno. El contenido de almidón de las células se cuantificó como la cantidad de glucosa liberada por hidrólisis enzimática de almidón parcialmente purificado. Los autores encontraron que las algas cultivadas sin limitaciones de nitrógeno lograban acumular aproximadamente 20% de su peso seco como almidón, mientras que en las células limitadas de nitrógeno el contenido de almidón llegó hasta 55% del peso seco celular. La producción de almidón fue dependiente del pH, encontrando una producción óptima de almidón de 1.3 g l<sup>-1</sup> en el rango de pH de 7.5 a 8.0.

Por otra parte, Yao et al. (2012) investigaron los efectos de las concentraciones de KNO<sub>3</sub> y MgSO<sub>4</sub> y de intensidad de la luz sobre la producción de biomasa y almidón en la microalga marina *Tetraselmis subcordiformis*. Bajo una intensidad de luz de 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y condiciones limitantes de azufre, los autores obtuvieron una productividad de almidón de 0.33 g l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, una producción máxima de 2.7 g l<sup>-1</sup> y un contenido de almidón de 62.1% (p/p).

Aikawa et al. (2012) evaluaron la producción de glucógeno de la cianobacteria halófila *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39 identificando las condiciones de cultivo más apropiadas para optimizar la producción del compuesto de interés. La producción de glucógeno se maximizó mediante la reducción de la fuente de nitrato y una alta intensidad de luz (700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), obteniéndose una producción de 1.03 g l<sup>-1</sup> y una productividad de 0.29 g l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

De igual forma, Aikawa et al. (2014) llevaron a cabo el estudio de los efectos de la intensidad de la luz, la concentración de CO<sub>2</sub> y la salinidad sobre el crecimiento celular y el

Tabla 2. Estudios de producción de  $\alpha$ -poliglucano por cianobacterias y microalgas bajo diferentes condiciones de cultivo.

Microorganismo	Poliglucano (g l <sup>-1</sup> )	Observaciones	Referencia
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	3.5	Cultivo bajo condiciones fotoautótrofas, 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ medio agua salobre, 4% CO <sub>2</sub> .	Aikawa et al., 2014
<i>Galdieria sulphuraria</i> SAG 108.81	9.4	Cultivo en condiciones heterótrofas, oscuridad, pH 2, Biorreactor de 7 l, glicerol 50 g l <sup>-1</sup> y (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5.0 N	Martinez-Garcia, 2017
<i>Tetraselmis subcordiformis</i>	2.7	Cultivo bajo condiciones fotoautótrofas, 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia, medio agua de mar, 3% CO <sub>2</sub> , KNO <sub>3</sub> 11 mM	Yao et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11B	1.3	Cultivo en condiciones fotoautótrofas, 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia, medio agua dulce, 2% CO <sub>2</sub> , KNO <sub>3</sub> 6 mM	Behrens et al., 1989
<i>Synechococcus</i> sp. NKBG 15041c	0.39	Cultivo bajo condiciones fotoautótrofas, medio agua de mar, 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia, 0.04% CO <sub>2</sub>	Badary et al., 2018
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39	1.3	Cultivo bajo condiciones fotoautótrofas, 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia, HCO <sub>3</sub> . 200 mM	Aikawa et al., 2012
<i>Galdieria sulphuraria</i> O74 W	0.45	Cultivo en condiciones mixotróficas, oscuridad, pH 2, CO <sub>2</sub> atmosférico.	Sakurai et al., 2016

contenido de glucógeno en *Synechococcus* sp. PCC 7002 con el fin de incrementar la producción de poliglucano. La producción máxima de glucógeno de  $3.5 \text{ g l}^{-1}$ , con una productividad de glucógeno de  $0.5 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , se obtuvo bajo una intensidad de luz alta ( $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), 4% de  $\text{CO}_2$  y una condición de nitrógeno limitante, utilizando como medio de cultivo agua salobre suplementado con otros nutrientes.

Sakurai et al. (2016) investigaron la producción de biomasa, glucógeno y lípidos en la cepa de *Galdieria sulphuraria* O74W en condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas (iluminación constante  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , pH 2.5 y  $\text{CO}_2$  atmosférico y glucosa 25 mM). La producción máxima de biomasa se obtuvo en el cultivo mixotrófico con un valor de  $3.8 \text{ g l}^{-1}$ . Así mismo, obtuvieron altas cantidades de glucógeno en los cultivos mixotróficos ( $0.45 \text{ g l}^{-1}$ ) mientras que las cantidades de lípidos neutros fueron similares entre cultivos mixotróficos y heterotróficos.

Martinez-Garcia (2017) evaluó el efecto del suministro de nitrógeno, el tipo de fuente de carbono, las condiciones de crecimiento y los métodos de extracción sobre el rendimiento de glucógeno y floridoside generados por *G. sulphuraria* SAG 108.81 con el fin de optimizar su producción. Los resultados muestran que *G. sulphuraria* acumuló altas cantidades de glucógeno (50% p/p) independientemente del nivel de suministro de nitrógeno. Adicionalmente, la cepa fue capaz de crecer en glicerol crudo como fuente de carbono, obteniéndose valores de biomasa, glucógeno y floridoside de 19.4, 9.4 y  $0.12 \text{ g l}^{-1}$ , respectivamente.

Por otra parte, Badary et al. (2018) estudiaron la producción de glucógeno por la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. NKBG15041c bajo diferentes condiciones de cultivo. La producción máxima utilizando la cepa NKBG15041c fue de  $0.399 \text{ g l}^{-1}$  cuando el microorganismo se cultivó en medio con nitrógeno reducido (BG11 $\Delta$ N marino), en un tiempo de 168 h, bajo condiciones fotoautótrofas,  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de irradiancia y una concentración de  $\text{CO}_2$  de 0.04%.

Finalmente, Mozaffari et al. (2019) llevaron a cabo un estudio de alteraciones en la fotosíntesis y las reservas de energía en *G. sulphuraria* CCME.5587.1, usando

hidrolizados de rastrojo de maíz para los cultivos. Los autores inicialmente realizaron un estudio preliminar comparando el crecimiento celular y la acumulación de  $\alpha$ -glucanos bajo condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas de cultivo, en matraces de 1 l, a un pH de 2.5, una intensidad de luz de  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , con un ciclo de iluminación de 12 h luz/12 h oscuridad. y una concentración de  $\text{CO}_2$  del 2%. La temperatura se mantuvo a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  durante el periodo de oscuridad y a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  en el periodo de iluminación. Bajo las condiciones heterotróficas y mixotróficas de cultivo, las células aumentaron rápidamente de  $0.5 \text{ DO}_{750 \text{ nm}}$  a  $1.23 \pm 0.06$  y  $1.29 \pm 0.05 \text{ DO}_{750 \text{ nm}}$  en 4 días, respectivamente. Mientras que en condiciones fotoautotróficas se alcanzó un crecimiento de  $0.81 \pm 0.07 \text{ DO}_{750 \text{ nm}}$  al día 7. En cuanto al almidón de reserva, se evidenció el efecto positivo de la adición de una fuente de carbono orgánica sobre la acumulación del glucano, encontrándose una acumulación máxima del polímero en mixotrofia (38%), seguido de heterotrofia (30%) y fotoautotrofia (15%).

## Carbohidratos microalgales y algunos ejemplos de aplicaciones biotecnológicas

Desde un enfoque de biorrefinería, todos los carbohidratos presentes en las microalgas, estructurales y de reserva, son aprovechables y presentan el potencial de ser usados a nivel industrial; sin embargo, en esta revisión se describirán brevemente algunas aplicaciones biotecnológicas de los poliglucanos de almacenamiento.

Respecto a los alfa-poliglucanos de reserva, el almidón es la principal fuente de energía de carbohidratos utilizada por una amplia variedad de organismos, incluidos los seres humanos (Zhang et al., 2020), y corresponde al polímero que presenta mayor número aplicaciones alimentarias y no alimentarias (Suarez et al., 2020). Por un lado, en la industria alimentaria, este polímero ha sido ampliamente utilizado como espesante, aglutinante, estabilizador de aromas y sabores, gelificante, entre otros, siendo útil en la conservación de alimentos enlatados y congelados, así como en la formulación de jarabes (Burrell et al., 2003; Copeland et al., 2008; Gifuni et al., 2017; Martínez-García, 2017). Por otra parte, respecto a las aplicaciones no alimentarias, debido a la

facilidad para hidrolizar estos glucanos mediante tratamientos termoquímicos o enzimáticos, es posible utilizar los monómeros de glucosa como fuente de carbono y energía en el cultivo de otros microorganismos, p. ej. para la producción de otros compuestos de interés como el bioetanol (John et al., 2011; Al Abdallah et al., 2016; Maia et al., 2020) y el biogás (hidrógeno, metano) (Khan et al., 2018). De igual forma, respecto a los glucanos como la amilopectina, el almidón florideo y el glucógeno, debido su estructura altamente ramificada, tienen aplicación en la industria farmacéutica y médica, en la producción de soluciones para diálisis peritoneal y en la formulación de bebidas deportivas (Martinez-Garcia et al., 2017).

En cuanto a las aplicaciones biotecnológicas de los beta-glucanos, si bien la glucosa como monómero estructural hace que sea una fuente de carbono potencial para la industria de fermentaciones (Al Abdallah et al., 2016), actualmente la principal aplicación de estos polímeros se encuentra en la industria farmacéutica como estimuladores de la respuesta inmune (Yu et al., 2015), y en la alimentaria, p. ej. como prebióticos o fibra dietaria (Mitmesser & Combs, 2017; Mugdil, 2017).

Por otra parte, actualmente la producción de estos poliglucanos microalgales aún no se lleva a cabo a nivel industrial, en donde el mayor desafío se centra en la obtención de procesos económicamente viables, sostenibles y que puedan competir con los cultivos tradicionales de plantas superiores productoras de glucanos (p. ej. maíz, trigo, entre otras). Dentro de los retos principales asociados a la producción industrial de procesos basados en microalgas se encuentra la generación de cultivos con alta productividad de biomasa, la optimización de los parámetros de escalamiento (inoculación, crecimiento y cosecha) y el desarrollo de procesos con un enfoque de biorrefinería. Si bien la producción industrial de biomasa microalgal para la obtención exclusiva de poliglucanos se sitúa en un escenario poco factible, el aprovechamiento integral de todos los compuestos presentes en dicha biomasa puede darle la viabilidad económica al proceso global, partiendo de la obtención de moléculas de costo económico alto como pigmentos (p. ej. carotenoides y ficobiliproteínas) y lípidos (ácidos grasos poliinsaturados-PUFAs).

## Conclusiones

Los poliglucanos de reserva, son metabolitos de almacenamiento de energía en microalgas con el potencial de ser utilizados como materia prima sostenible en la producción de diferentes compuestos de interés como biocombustibles, o de ser usados directamente en la industria farmacéutica y alimentaria. De igual forma, debido a las aplicaciones biotecnológicas de estos polímeros de glucosa, diversas metodologías de cultivo se han implementado con el fin de incrementar el contenido en peso seco de estas moléculas respecto a la biomasa total, en donde la limitación por nutrientes (nitrógeno y fósforo), el enriquecimiento del aire con CO<sub>2</sub>, la disminución de la temperatura y el incremento de la intensidad de luz, sin alcanzar la irradiancia de saturación, han demostrado ser excelentes estrategias para aumentar la actividad catalítica de algunas enzimas clave en la fijación de carbono y síntesis de carbohidratos. Finalmente, muchas de las investigaciones se han enfocado en el estudio de la acumulación de almidón en algas verdes, sin embargo, poca atención se ha centrado en los polímeros de reserva de algas rojas (almidón florideo), cianobacterias (glucógeno) y algas acumuladoras de beta-glucanos (principalmente algas pardas), las cuales también presentan gran potencial para la producción de estos biopolímeros.

## Agradecimientos

Se agradece el financiamiento otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM: IT201119. CMH y FVLP recibieron una beca de doctorado de CONACyT. Mariana Manzoni Maroneze recibió una beca de posdoctorado de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico - UNAM.

## Referencias

- Aikawa S, Izumi Y, Matsuda F, et al (2012) Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrospira platensis* by optimization of light intensity and nitrate supply. *Bioresource Technology* 108: 211–215.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.01.004>

- Aikawa S, Nishida A, Ho S-H, et al (2014) Glycogen production for biofuels by the euryhaline cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 from an oceanic environment. *Biotechnology for Biofuels* 7:88. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-88>
- Al Abdallah Q, Nixon BT, Fortwendel JR (2016) The Enzymatic Conversion of major algal and cyanobacterial carbohydrates to bioethanol. *Frontiers in Energy Research* 4:36. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2016.00036>
- Badary A, Takamatsu S, Nakajima M, et al (2018) Glycogen production in marine cyanobacterial strain *Synechococcus* sp. NKBG 15041c. *Marine Biotechnology* 20(2): 109–117. <https://doi.org/10.1007/s10126-017-9792-2>
- Bajpai R, Zappi M, Dufreche S, Subramaniam R, Prokop A (2014) Status of Algae as Vehicles for Commercial Production of Fuels and Chemicals. In: *Algal Biorefineries*. Bajpai R, Prokop A, Zappi M (eds). Springer, Dordrecht. pp. 3-24. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7494-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7494-0_1)
- Ball S, Colleoni C, Cenci U, et al (2011) The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *Journal of Experimental Botany* 62(6): 1775–1801. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq411>
- Baroukh C, Muñoz-Tamayo R, Steyer J-P, Bernard O (2014) DRUM: A New framework for metabolic modeling under non-balanced growth. application to the carbon metabolism of unicellular microalgae. *PLoS ONE* 9:e104499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104499>
- Behrens PW, Bingham SE, Hoeksema SD, et al (1989) Studies on the incorporation of CO<sub>2</sub> into starch by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology* 1(2): 123–130. <https://doi.org/10.1007/BF00003874>
- Blanco A, Blanco G (2017) Chapter 4 – Carbohydrates. In: *Medical Biochemistry*. Blanco A, Blanco G (Eds). Academic Press. Elsevier Inc. pp. 73-97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00004-5>
- Burrell MM (2003) Starch: the need for improved quality or quantity- an overview. *Journal of Experimental Botany*. 54 (382): 451-456. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg049>
- Busi MV, Barchiesi J, Martín M, Gomez-Casati DF (2014) Starch metabolism in green algae. *Starch - Stärke* 66: 28–40. <https://doi.org/10.1002/star.201200211>
- Cesário MT, da Fonseca MMR, Marques MM, de Almeida MCMD (2018) Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials. *Biotechnology Advances* 36(3): 798–817. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.006>
- Copeland L, Blazek J, Salmen H, Tang MC (2008) Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*. 23(6): 1527-1534. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>
- Déléris P, Nazih H, Bard J-M (2016) Chapter 10 - Seaweeds in Human Health. In: *Flurence J, Levine I (eds) Seaweed in Health and Disease Prevention*. Academic Press, San Diego. pp 319–367.
- Geigenberger P (2011) Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiology* 155(4): 1566–1577. <https://doi.org/10.1104/pp.110.170399>
- Gifuni I, Olivieri G, Russo-Krauss I, D'Errico G, Pollio A, Marzocchella A (2017) Microalgae as New Sources of Starch: Isolation and Characterization of Microalgal Starch Granules. *Chemical Engineering Transactions* 57:1423-1428. <https://doi.org/10.3303/CET1757238>
- González-Fernández C, Ballesteros M (2012) Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnology Advances* 30(6): 1655–1661. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.07.003>
- Izumo A, Fujiwara S, Oyama Y, et al (2007) Physicochemical properties of starch in *Chlorella* change depending on the CO<sub>2</sub> concentration during growth: Comparison of structure and properties of pyrenoid and stroma starch. *Plant Science* 172(6): 1138–1147. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.03.001>

- John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A (2011) Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology* 102(1):186-93.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>
- Khan MI, Shin JH, Kim JD (2018) The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories* 17(36): 1-21.  
<https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kozłowska-Szerenos B, Bialuk I, Maleszewski S (2004) Enhancement of photosynthetic O<sub>2</sub> evolution in *Chlorella vulgaris* under high light and increased CO<sub>2</sub> concentration as a sign of acclimation to phosphate deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(5): 403–409.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.02.010>
- Maia JLD, Cardoso JS, Mastrantonio DJDS, Bierhals CK, Moreira JB, Costa JAV, Morais MG (2020) Microalgae starch: A promising raw material for the bioethanol production. *International Journal of Biological Macromolecules* 165:2739–2749.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.159>
- Markou G, Vandamme D, Muylaert K (2014) Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research* 65:186–202.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.025>
- Martín-Juárez J, Markou G, Muylaert K, et al (2017) Breakthroughs in bioalcohol production from microalgae: Solving the hurdles. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-products*. Gonzalez-Fernandez C, Muñoz R (Eds). Woodhead Publishing Series in Energy. Elsevier Inc. pp. 183–207.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00008-X>
- Martinez-Garcia M, Stuart MCA, Van der Maarel MJE (2016) Characterization of the highly branched glycogen from the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* and comparison with other glycogens. *International Journal of Biological Macromolecules* 89: 12–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.IJBIOMAC.2016.04.051>
- Martínez-García M (2017) Functional carbohydrates from the red microalga *Galdieria sulphuraria*. Tesis de Doctorado. Universidad de Groninga. Holanda. pp. 1-149.
- Martinez-Garcia M, Korpma A, Van der Maarel MJE (2017) The glycogen of *Galdieria sulphuraria* as alternative to starch for the production of slowly digestible and resistant glucose polymers. *Carbohydrate Polymers* 169:75-82.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.004>
- Masojídek J, Koblížek M, Torzillo G (2007) Photosynthesis in Microalgae. In: *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Richmond A, Hu Q (Eds). John Wiley & Sons, Ltd. pp. 20–39.
- Mayers JJ, Vaiciulyte S, Malmhäll-Bah E, et al (2018) Identifying a marine microalgae with high carbohydrate productivities under stress and potential for efficient flocculation. *Algal Research* 31: 430–442.  
<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.02.034>
- Merwe LVD (2007) UDP-glucose: β-(1-3)-glucan (paramylon) synthase from *Euglena gracilis*. Tesis Maestría en Biotecnología de Plantas. Universidad en Stellenbosch. Sudáfrica. pp. 1-70.
- Mišurcová L, Škrovánková S, Samek D, et al (2012) Chapter 3 - Health Benefits of Algal Polysaccharides in Human Nutrition. In: *Advances In Food and Nutrition Research*. Henry J (ed). Academic Press. Elsevier Inc. pp. 75–145.
- Mitmesser S, Combs M (2017) Chapter 23 - Prebiotics: Inulin and other oligosaccharides. In: *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*. Floch MH, Ringel Y, Walker WA (Eds). Academic Press. Elsevier Inc. pp. 201–208.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00023-9>
- Mozaffari K, Seger M, Dungan B, et al (2019) Alterations in photosynthesis and energy reserves in *Galdieria sulphuraria* during corn stover hydrolysate supplementation. *Bioresource Technology Reports* 7: 100269.  
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100269>

- Muchut RJ, Calloni RD, Arias DG, et al (2021) Elucidating carbohydrate metabolism in *Euglena gracilis*: Reverse genetics-based evaluation of genes coding for enzymes linked to paramylon accumulation. *Biochimie* 184: 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.02.016>
- Mudgil D (2017) Chapter 3-The interaction between insoluble and soluble fiber. In: *Dietary Fiber for the Prevention of Cardiovascular Disease*. Samaan RA (Ed). Pittsburgh: Academic Press. Elsevier Inc. pp. 35–59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805130-6.00003-3>
- O'Neill EC, Trick M, Hill L, et al (2015) The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry. *Molecular BioSystems* 11(10): 2808–2820. <https://doi.org/10.1039/C5MB00319A>
- Perez-Garcia O, Bashan Y (2015) Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. In: *Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design*. Prokop A, Bajpai R, Zappi M (Eds). Springer International Publishing, Cham. pp. 61–131.
- Powell PO, Sullivan MA, Sheehy JJ, Schulz BL, Warren FJ, Gilbert RG (2015) Acid hydrolysis and molecular density of phytoglycogen and liver glycogen helps understand the bonding in glycogen  $\alpha$  (composite) particles. *PLoS ONE* 10(3): e0121337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121337>
- Ran W, Wang H, Liu Y, et al (2019) Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. *Bioresource Technology* 291: 121894. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121894>
- Suarez CA, Zarate S, Van den Broek LAM, Van den Berg C, Wijffels RH, Eppink MHM (2020) Selective fractionation of free glucose and starch from microalgae using aqueous two-phase systems. *Algal Research*. 46: 101801. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101801>
- Sakurai T, Aoki M, Ju X, et al (2016) Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Bioresource Technology* 200: 861–866. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.11.014>
- Shahid A, Khan F, Ahmad N, et al (2020) Microalgal Carbohydrates and Proteins: Synthesis, Extraction, Applications, and Challenges. In: *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. Alam MA, Xu JL, Wang Z (Eds). Springer Singapore. Singapore. pp. 433–468.
- Stone BA (2009) Chapter 2.1 - Chemistry of  $\beta$ -Glucans. In: *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*. Bacic A, Fincher GB, Stone BA (Eds). Academic Press, San Diego. Elsevier Inc. pp. 5–46.
- Viola R, Nyvall P, Pedersén M (2001) The unique features of starch metabolism in red algae. *Proceedings. Biological Sciences* 268(1474): 1417–1422. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1644>
- Yao C, Ai J, Cao X, et al (2012) Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. *Bioresource Technology* 118:438–444. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.05.030>
- Yu X, Guo C, Fisher PB, Subjeck JR (2015) Chapter Nine – Scavenger receptors: Emerging role in cancer biology and immunology. *Advances in Cancer Research* 128: 309–364. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.04.004>
- Zachleder V, Brányiková I (2014) Starch Overproduction by Means of Algae. In: *Algal Biorefineries: Volume 1: Cultivation of Cells and Products*. Bajpai R, Prokop A, Zappi M (Eds). Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 217–240.
- Zhang X, Leemhuis H, Van der Maarel MJEC (2020) Digestion kinetics of low, intermediate and highly branched maltodextrins produced from gelatinized starches with various microbial glycogen branching enzymes. *Carbohydrate Polymers* 247: 116729. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116729>