

Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotechnología
y Bioingeniería A.C.

Año 2021 Volumen 25, Número 5
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería



Revista de la Sociedad Mexicana de
Biología
y Bioingeniería A.C.

MESA DIRECTIVA

2020 – 2022

Dr. Jaime Ortega López
Presidente

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Vicepresidenta

Dr. Álvaro R. Lara Rodríguez
Secretario

Dra. Angélica Meneses Acosta
Tesorero

Dra. Beatriz Ruiz Villafán
Subsecretaria

Dr. Gerardo Reséndiz Cardiel
Vocal Profesional

P. Biol. Teresa Elizabeth Martínez Oropeza
Vocal Estudiante

EDITORA

Dra. María Soledad Córdova Aguilar
UNAM

COMITÉ EDITORIAL

Dr. Ángel Alpuche Solís
Dra. Aurora Antonio Pérez
Dra. Silvia Armenta Jaime
Dr. Jorge Gracida
Dra. Isadora Martínez Arellano
Dra. Marcia Morales Ibarra
Dra. Daniela Morales Sánchez
Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta
Dra. María Eugenia de la Torre
Dra. Beatriz Ruiz Villafán

Formación y edición

Q.A. Ilse M. Mendoza Ortega

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM), en LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), los artículos se encuentran en Google Académico. Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México. o a la siguiente dirección electrónica revista_biotecnologia@smbb.mx.

Índice

Instrucciones para los autores	4
Editorial	8
Artículos	
Perspectivas sobre los sistemas de cultivo de microalgas: una revisión crítica	
Mariana Manzoni Maroneze, Carlos Alberto Montenegro Herrera y Alfredo Martínez Jiménez	11
Pigmentos en microalgas: funciones, aplicaciones y técnicas de sobreproducción	
Francisco Vera-López Portillo y Alfredo Martínez Jiménez	35
Poliglucanos de reserva en microalgas: química, biosíntesis y manipulación de condiciones de cultivo	
Carlos Montenegro-Herrera, Mariana Manzoni Maroneze, Francisco Vera-López Portillo y Alfredo Martínez	52
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>, una fuente potencial de ácido eicosapentaenoico	
Tomás García, Tania Castillo, Alfredo Martínez y Enrique Galindo	66
Ficocianina y su acumulación en la microalga roja <i>Galdieria sulphuraria</i>	
Francisco Vera-López Portillo, Carlos A. Montenegro-Herrera, Ricardo A. Alvarado-Cosío, Alfredo Martínez Jiménez y Helena Porta Ducoing	82
Efecto de microplásticos en las microalgas	
Monserrat Hernández-Maldonado y Amelia Farrés	96
El potencial del genoma del cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> para la producción de proteínas recombinantes	
Christian Carreño-Campos, María Luisa Villarreal y Anabel Ortiz Caltempa	108
Conceptos básicos y avances de la transformación genética de las microalgas	
Helena Porta	127
BioTecnología, Año 2021, Vol. 25 No.5	3

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original, así como de revisión en los campos de la biotecnología y bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas de la revista son el español y el inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, μ l), de peso (kg, g, mg, μ g), ADN, ARN y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde aspectos fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética .

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito será puesto en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.
2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor corresponsal.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente Abstract en inglés.

Instrucciones para los autores

4. Se incluirán entre 3 a 6 Palabras clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en español y en inglés (Key words).
5. En los reportes de investigación original se deberán incluir las secciones: Introducción, en donde se deberá especificar claramente el objetivo del trabajo; Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones y Referencias. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: “Gutiérrez et al. (2003), han demostrado...” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado...” Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.
9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) de acuerdo al siguiente formato:

Artículos:

García-Carreño F, Cota K & Navarrete del Toro MA (2008) Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*: conversion, characterization of catalytic properties, and role in *postmortem* melanosis. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6454-6459.

Libros:

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

Instrucciones para los autores

Capítulos de libros:

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Congresos y reuniones (Se aceptarán un máximo de dos citas de este tipo):

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus* HL. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Sitios en internet:

Van Deuren J, Wang Z & Ledbetter J (1997) Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª Ed. Technology Innovation Office, EPA. Disponible en: <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.

Revistas electrónicas:

Sun J, Lu X, Rinas U, & Zeng AP (2007) Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. Genome Biol. 8: R182.

Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de safranal. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea.

La carta de presentación del artículo debe indicar que el manuscrito no se encuentra publicado o sometido a publicación en otra revista, nacional o internacional, para no infringir ninguna ley de derechos de autor.

Instrucciones para los autores

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos se someten en línea en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección <https://smbb.mx/publicaciones/publicacion-de-articulo/>. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx y romina@biomedicas.unam.mx. Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC, <https://smbb.mx/>

Editorial

La utilización de una amplia variedad de microalgas se propone como una alternativa en el desarrollo de bioprocesos sostenibles. Esto, principalmente debido a su enorme biodiversidad, capacidad de proliferar en diversos ecosistemas, por su elevada eficiencia fotosintética, presentar una relativamente alta velocidad de crecimiento (en comparación con las plantas), una extensa flexibilidad metabólica, capacidad para sostener la biodiversidad de comunidades acuáticas y la versatilidad que ofrecen para la obtención de una vasta variedad de productos de interés biotecnológico. Entre estos productos se encuentran los biocombustibles, diversos productos para la industria alimentaria (antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados, pigmentos, proteína unicelular, nutracéuticos y ficobiliproteínas, entre otros) y cosmética, así como otros productos de valor agregado. También, por su capacidad de fijación de dióxido de carbono y la posibilidad de formar consorcios con otros microorganismos, útiles para el tratamiento de aguas residuales, permiten que las microalgas sean un grupo importante para la sostenibilidad ambiental.

En este número especial de la Revista *BioTecnología* se presentan varias contribuciones, generadas como parte del curso de *Biología Microalgal*, impartido como Tópico Selecto en el Posgrado de Ciencias Bioquímicas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los artículos de revisión pretenden introducir al lector en las variables relevantes para el cultivo de microalgas y en la obtención de algunos productos a partir de estos fascinantes microorganismos. Considerando la gran variedad de aplicaciones, los procesos y productos obtenidos a partir de microalgas, actualmente son el foco de un número importante de investigaciones, tanto en Institutos y Universidades, como en empresas de todo el mundo. Seguramente, en números futuros de la *Revista BioTecnología*, la comunidad Biotecnológica y Bioingenieril reportará avances obtenidos en investigaciones que generan conocimiento para entender la fisiología, bioquímica y biología celular y molecular de estos microorganismos y en el desarrollo de cultivos y tecnologías para la generación de biomasa microalgal y productos derivados de este grupo. Como se puede constatar con la lectura de los artículos de este número especial, existen aún muchos retos por solucionar, pero estamos convencidos de que la comunidad biotecnológica pronto tendrá la capacidad de resolverlos.

Varias de las contribuciones describen aspectos de los biorreactores utilizados para cultivar microalgas. Particularmente, en el primer capítulo se presenta una revisión crítica de los sistemas disponibles para su cultivo, tanto a nivel de investigación, en escalas de laboratorio y piloto, como los utilizados a escala de producción, incluyendo los sistemas comerciales de éxito. Se concluye que actualmente no existe un sistema de cultivo ideal y universal y que la tecnología idónea depende tanto del producto objetivo como de las especies de microalgas y las condiciones ambientales a utilizar. Entre las principales limitantes están los costos asociados a la construcción y operación de los fotobiorreactores, además de los conocimientos restringidos que existen relativos al escalamiento y los fenómenos de transporte asociados a la fisiología microalgal en cultivos mixto y fototróficos.

Editorial

En los capítulos subsecuentes se analiza y discute el tema de acumulación y producción de pigmentos en microalgas, con énfasis en funciones fisiológicas, sus aplicaciones y técnicas de producción. Para los carotenoides, ficobiliproteínas y clorofila, que se utilizan como pigmentos naturales y como agentes nutracéuticos por propiedades antioxidantes, en la mayoría de las ocasiones los valores de producción son menores al 5% (p/p) en peso seco de microalgas. En comparación con la producción de colorantes sintéticos, esto resulta en procesos económicamente no factibles. Con el fin de hacer viable, tanto técnica como económicamente su producción, se requiere mejorar las técnicas de bioprocesos, biología molecular e ingeniería metabólica, para incrementar la generación de biomasa y la concentración específica de los diferentes pigmentos. Especialmente se plantea que la ficocianina, que actualmente se extrae de la cianobacteria *Arthrospira platensis* cultivada autotróficamente, también puede ser producida a partir de la microalga extremófila *Galdieria sulphuraria*, al ser capaz de crecer en medios minerales y condiciones extremófilas tales como pH muy ácidos y temperaturas mayores a 40 °C. Además, la ficocianina extraída de esta microalga presenta mayor termoestabilidad que la obtenida de otras microalgas o cianobacterias y puede ser producida mediante cultivos autotróficos, mixotróficos o heterotróficos.

Posteriormente se muestran algunas aplicaciones específicas para la obtención de poliglucanos, ácido eicosapentaenoico (EPA) y para remover moléculas generadas de la degradación parcial del plástico PET (poli etilen tereftalato). Los poliglucanos, los cuales pueden ser utilizados como polímeros en diversas aplicaciones industriales y alimenticias, también pueden ser utilizados como fuente de carbono, alternativo a los almidones obtenidos en cultivos terrestres, para la generación de productos de interés industrial como ácidos orgánicos y biocombustibles. La producción del ácido graso omega EPA, con la microalga *Phaeodactylum tricorutum*, se puede maximizar mediante su manipulación genética y optimización de las condiciones de cultivo. Sin embargo, en comparación a los procesos tradicionales de obtención de EPA a partir del aceite de pescado, la producción a partir de microalgas todavía requiere de desarrollar bioprocesos económicamente viables. En este sentido, uno de los principales desafíos, con los cultivos de *P. tricorutum*, es incrementar la productividad de biomasa y el contenido específico de EPA. Por otro lado, se ha reportado que varias especies de algas tienen la capacidad de internalizar, almacenar e incluso degradar los poliésteres de ácido ftálico (PAEs), que se encuentran presentes en ecosistemas acuáticos y que son generados a partir de la degradación parcial del PET. Entre las especies que se han reportado están *Chlorella pyrenoidosa*, *Cylindrotheca closterium*, *Dunaliella salina*, *Chaetoceros muelleri*, *Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp., *Cyanothece* sp. y *Karenia brevis*, que pueden degradar algunos PAEs, así como *Desmodesmus* sp. WR1, que particularmente degrada el bisfenol A. Se concluye que la ficorremediación es un área que presenta alternativas para la restauración de los ambientes acuáticos. Sin embargo, es un área en la que aún falta mucho por investigar, aunque promete dar soluciones para disminuir los efectos adversos de los microplásticos.

En los últimos capítulos se describen los sistemas utilizados en la transformación del genoma del núcleo o cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*, realizada principalmente por *Agrobacterium tumefaciens*, biobalística y otras metodologías moleculares.

Editorial

Se destaca que en los últimos años ha habido avances significativos en aplicaciones para la transformación y edición de estos genomas. Se enfatizan las estrategias moleculares, propuestas en investigación, para la ingeniería del genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii*, y aplicadas en la producción de proteínas de alto valor comercial. Se concluye que *C. reinhardtii* tiene el potencial de ser uno de los principales modelos de investigación y desarrollo tecnológico con fines de producción de proteínas recombinantes.

Se han generado diversidad en la investigación con microalgas, en diferentes épocas, fundamentalmente por su gran potencial en aplicaciones biotecnológicas, *p. ej.* en la generación de bioenergía, alimentos (para humanos y animales), cosméticos, fármacos, biofertilizantes, así como la aplicación en biorremediación ambiental y tratamiento de aguas, entre otros. No obstante, aún con las importantes mejoras tecnológicas alcanzadas hasta ahora, la implementación de diferentes procesos basados en microalgas, particularmente en las tecnologías de producción en masa a escala comercial, requieren investigaciones más extensas con el fin de generar viabilidad técnica, económica y ambiental a escala comercial. En este sentido, existen muchas oportunidades para que investigaciones en biotecnología y bioingeniería permitan generar procesos y productos a escala industrial.

*Dr. Alfredo Martínez Jiménez, M. en C. Francisco Vera López Portillo
y M. en C. Carlos Alberto Montenegro Herrera*
Instituto de Biotecnología-UNAM
alfredo.martinez@ibt.unam.mx

Perspectivas sobre los sistemas de cultivo de microalgas: una revisión crítica

Insights into microalgae culture systems: A critical review

Mariana Manzoni Maroneze*, Carlos Alberto Montenegro Herrera,
Alfredo Martínez Jiménez

Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad
Nacional Autónoma de México,
Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62210, México

mariana.manzoni@ibt.unam.mx, carlos.montenegro@ibt.unam.mx,
alfredo.martinez@ibt.unam.mx

Resumen

Debido a su amplia variedad de aplicaciones, los procesos y productos basados en microalgas son actualmente el foco de un número considerable de investigadores, tanto en institutos de investigación y universidades públicas, como en empresas privadas de todo el mundo. Sin embargo, a pesar de los avances recientes, la producción de microalgas todavía tiene varios desafíos que deben abordarse, especialmente relacionados con los sistemas de cultivo. De esta manera, expertos de todo el mundo están trabajando en enfoques de ingeniería que ayudarán a la consolidación del cultivo de microalgas a escala comercial. En este sentido, el objetivo de esta revisión es abordar críticamente los problemas relacionados con los sistemas de cultivo de microalgas. Se discuten los principales factores que afectan la eficiencia de los cultivos de microalgas, los fotobiorreactores más usados, con sus ventajas y limitaciones, así como una comparación de los sistemas de cultivo y, finalmente, se presentan algunos casos comerciales de éxito.

Palabras clave: Alga, fotobiorreactores, bioprocesos, bioproductos.

Abstract

Because the wide array of applications, microalgae-based processes and products are currently the focus of considerable number of research, both in government agencies, and private companies around the world. However, despite the recent advances, microalgae production still has several challenges that need to be addressed, especially related to the culture systems. In this way, experts all over the world are working on engineering approaches that will assist in the consolidation of commercial microalgae. In this sense, the objective of this review is to critically address the issues related to microalgae culture system. In this review, we discuss major factors affecting the efficiency of microalgae cultures, the main photobioreactors available with its advantages and limitations, a comparison of these cultivation systems and, finally some commercial cases of success will be presented.

Key words: Algae, photobioreactors, bioprocesses, bioproducts.

Introducción

La población mundial continúa aumentando y se espera que llegue a 9 mil millones de personas en 2050. Este hecho asociado a la industrialización, la urbanización y el desarrollo de la economía global, han provocado el cambio climático y un aumento en la demanda de energía, alimentos, agua, medicamentos y otros recursos esenciales en las actividades humanas (Fetanat et al., 2021). Además, la actual pandemia de COVID-19 ha exacerbado el riesgo de hambruna e inseguridad alimentaria a nivel mundial (Laborde et al., 2020). Por lo tanto, para satisfacer las crecientes demandas, será necesario el desarrollo y la implementación de innovaciones incrementales y disruptivas para avanzar hacia sistemas alimentarios y energéticos más resilientes. En este sentido, las microalgas han sido identificadas como uno de los recursos biológicos más prometedores para el suministro de la próxima generación de alimentos, piensos, nutracéuticos y biocombustibles, entre otros productos (Wibisono et al., 2019).

La biomasa de estos microorganismos presenta una amplia gama de moléculas y productos potenciales como carbohidratos, proteínas, lípidos, pigmentos, minerales, vitaminas y enzimas (Barros et al., 2019). Además, los procesos basados en microalgas también se han propuesto como una herramienta poderosa para aplicaciones ambientales, específicamente el tratamiento de aguas residuales y la mitigación de CO₂. Aproximadamente 7000 toneladas de biomasa de algas secas se producen en todo el mundo cada año y el mercado mundial de biomasa de algas se valoró en USD 717.14 millones en 2018 y se prevé que alcance los USD 1365,8 millones en 2027, a una tasa de crecimiento anual compuesta de 7.42% (Transparency Market Research, 2018). Estos datos muestran que la industria de las microalgas está ganando popularidad a nivel mundial, ya que además de la amplia variedad de aplicaciones, tiene varias ventajas potenciales frente a otros recursos fotosintéticos (Tang 2020).

A diferencia de las plantas, el crecimiento de microalgas no se limita a tierras cultivables y agua dulce. Además, estos microorganismos presentan alta

productividad, bajo impacto ambiental y no presentan estacionalidad; es decir, su cultivo se puede repetir durante todo el año y se puede cosechar diariamente (Daneshvar et al., 2021). A pesar de estas potencialidades, uno de los principales requerimientos para apoyar el desarrollo de la industria de las microalgas es el cultivo eficiente de microalgas a gran escala de forma económica. La tecnología de cultivo está relacionada tanto con el diseño del tipo y configuración de los sistemas de cultivo abiertos o cerrados, así como con las condiciones operativas que conducen al equilibrio entre el crecimiento óptimo de las microalgas y la productividad del bioproducto objetivo (Yen et al., 2019; Maroneze et al., 2020).

Con el mercado en crecimiento y la necesidad de sistemas de cultivo que permitan la producción comercial de microalgas, la investigación en el campo de los fotobiorreactores se intensificó en las últimas décadas. Se han propuesto múltiples diseños y configuraciones de fotobiorreactores con diferencias sustanciales en los costos de construcción y operación. Aun así, la mayoría de los sistemas se clasifican en una de cuatro categorías: fotobiorreactores de tanque, tubulares, planos o híbridos, que, como regla general, se dividen en abiertos y cerrados. Incluso con todas las investigaciones realizadas a nivel mundial, todavía no existe un sistema universal para el cultivo a gran escala de microalgas. Para cualquier aplicación, el fotobiorreactor que se utilizará debe seleccionarse adecuadamente en función de la cepa, los productos objetivo, los rendimientos y las condiciones ambientales (Chang et al., 2017).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de esta revisión es abordar críticamente los conocimientos relacionados con los sistemas de cultivo de microalgas. Primero, se presenta una descripción general de los procesos basados en microalgas con énfasis en el modo de cultivo y los factores que afectan la producción de biomasa de microalgas. A continuación, se presenta una descripción crítica de los desarrollos recientes y consolidados en las tecnologías de cultivo de microalgas. Finalmente, se revisan algunos casos comerciales de éxito de los sistemas de cultivo de microalgas en todo el mundo.

Procesos basados en microalgas

Los procesos basados en microalgas comprenden operaciones secuenciales de procesamiento: *upstream* (USP) y *downstream* (DSP) (Figura 1). El USP se centra en la selección de cepas, la manipulación genética, el cultivo y los requerimientos del sistema biológico. El DSP tiene como objetivo la cosecha, secado, ruptura celular, extracción y purificación de los bioproductos de la biomasa de microalgas. Los USP, especialmente el cultivo, se consideran la línea de base en los procesos de microalgas. Esta operación unitaria es un punto crítico en el proceso, tanto en términos técnicos como económicos, ya que afecta directamente la calidad y cantidad de la biomasa microalgal producida (Deneshvar et al., 2021). El proceso de producción puede diferir de muchas maneras, donde la primera variación a considerar es la elección metabólica de fuentes de carbono y energía, que pueden ser fotoautótrofas, heterótrofas y mixotróficas.

Cultivos autótrofos vs heterótrofos vs mixotróficos

Las microalgas se han producido a gran escala desde la década de 1960, dado su alto potencial como fábricas de células. Desde entonces, el proceso fotosintético es la condición de cultivo más utilizada para el crecimiento de microalgas a nivel comercial (Chew et al., 2018). El cultivo fotoautótrofo se refiere al proceso en el que las microalgas, a través de la fotosíntesis, capturan la energía luminosa y convierten directamente el carbono inorgánico en energía química (Yin et al. 2020). Los procesos basados en esta ruta metabólica se consideran más económicos y

eco-amigables que el de los otros dos, ya que pueden utilizar la luz solar, los gases residuales industriales y el CO₂ de la atmósfera para su mantenimiento y crecimiento. Por otro lado, el escalamiento de cultivos autótrofos es un proceso que requiere mucho tiempo y ocupa un área significativa de las fábricas de producción industrial. Aunque la fotosíntesis es la ruta preferida de la gran mayoría de microalgas, está bien establecido que algunas cepas han conservado la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono orgánicas para crecer heterótróficamente o mixotróficamente, incluso mostrando mejores rendimientos en la producción de biomasa.

La producción de microalgas en fermentadores (cultivos cerrados), bajo condiciones de crecimiento heterótrofo, ha demostrado ser una ruta de comercialización muy exitosa. En este modo de crecimiento, el carbono exógeno se descompone de la misma manera que en otros microorganismos, donde las moléculas complejas se metabolizan a través de la vía Embden-Mayerhoff-Parnas (vía EMP o glucólisis) o vía de las pentosas fosfato (PPP) (Jareonsin & Pumas, 2021). Según Pérez-García et al. (2011), cuando es posible el crecimiento heterótrofo se puede superar la mayor deficiencia de los cultivos autótrofos, es decir, la dependencia de la luz que complica significativamente el proceso. Además, el fácil escalamiento y la relativa simplicidad de las operaciones y el mantenimiento diario son los principales atractivos del crecimiento heterótrofo. Sin embargo, el cultivo heterótrofo de microalgas puede incrementar los costos de producción, debido a la necesidad de una

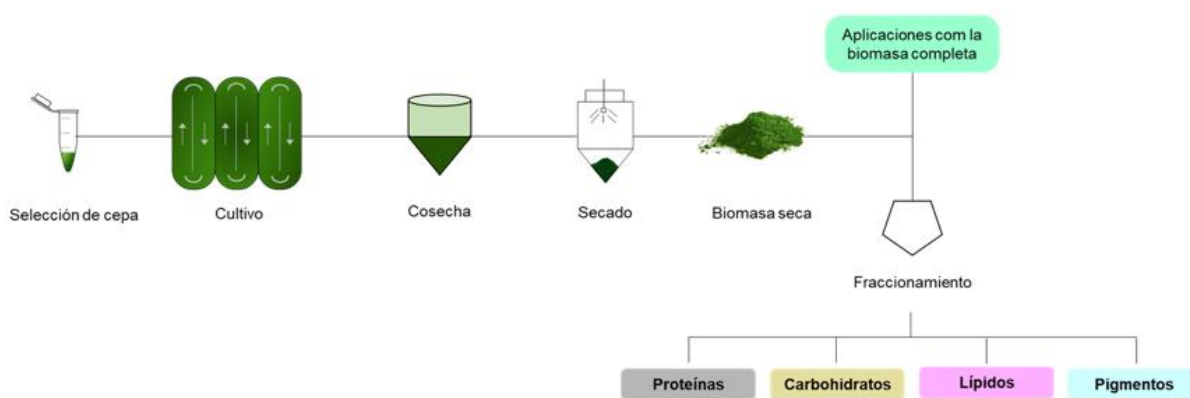


Figura 1. Proceso fundamental basado en microalgas.

fuentes de carbono orgánico exógena, y también son susceptibles a la contaminación microbiana y se limitan a producir metabolitos no inducidos por la luz. Para mejorar la viabilidad económica en la comercialización de productos a base de microalgas, se pueden emplear azúcares (p. ej. glucosa) o residuos de bajo costo, como es el caso del glicerol (Katiyar et al., 2017), desechos de alimentos (Pleissner et al., 2013) y aguas residuales agroindustriales (Maroneze et al., 2014; Queiroz et al., 2018), que son sustratos ampliamente utilizados para este propósito. Además de incrementar la viabilidad económica, el uso de residuos y desechos contribuye a la gestión de residuos (Neves et al., 2016).

Otra estrategia de cultivo para el crecimiento de microalgas es el modo mixotrófico, donde estos microorganismos pueden metabolizar simultáneamente carbono orgánico e inorgánico, mediante la respiración celular y la fotosíntesis, respectivamente (Zhan et al., 2017). Teniendo en cuenta que la mixotrofia comprende modos heterótrofos y autótrofos, las microalgas que tienen esta capacidad metabólica pueden crecer constantemente aún bajo la limitación de cualquiera de las fuentes (luz, carbono orgánico e inorgánico), incrementando de esta manera la factibilidad económica para la producción a gran escala. Otra ventaja importante de estos procesos está relacionada con la biorremediación, ya que se pueden aplicar para tratar tanto gases de combustión como aguas residuales orgánicas (Patel et al., 2020). Además de los beneficios, el cultivo mixotrófico también comparte varias

desventajas del régimen heterotrófico: riesgos de contaminación, costo de la fuente de carbono exógeno y número limitado de especies capaces de crecer en este modo; y del autótrofo: sistemas de cultivo tecnológico no completamente desarrollados.

Parámetros de la producción de microalgas

Para que los procesos basados en microalgas sean sostenibles, factibles y económicamente viables, es necesario desarrollar tecnologías de cultivo con alta productividad de biomasa y/o bioproductos objetivo al menor costo de producción. Con frecuencia, como el producto objetivo está relacionado con la formación de masa celular o el producto es la propia biomasa, la productividad de la biomasa es el parámetro clave a maximizar. El cultivo de microalgas depende de la especie y se ve afectado por factores biológicos como la intensidad de la luz, la temperatura, el pH, el CO₂, el oxígeno y la disponibilidad de nutrientes. La productividad también está directamente relacionada con el diseño del fotobiorreactor, y esto depende de factores como la geometría, la dinámica de fluidos y la capacidad de transferencia de masa. Una vez definidas las condiciones biológicas y el diseño del fotobiorreactor, el siguiente paso es seleccionar la ubicación geográfica de la instalación de microalgas, con base a la radiación solar, el fotoperiodo, la temperatura y las variaciones estacionales, como se muestra en la Figura 2 (García-Mañas et al., 2019; Acien et al., 2020; Kirnev et al., 2020).

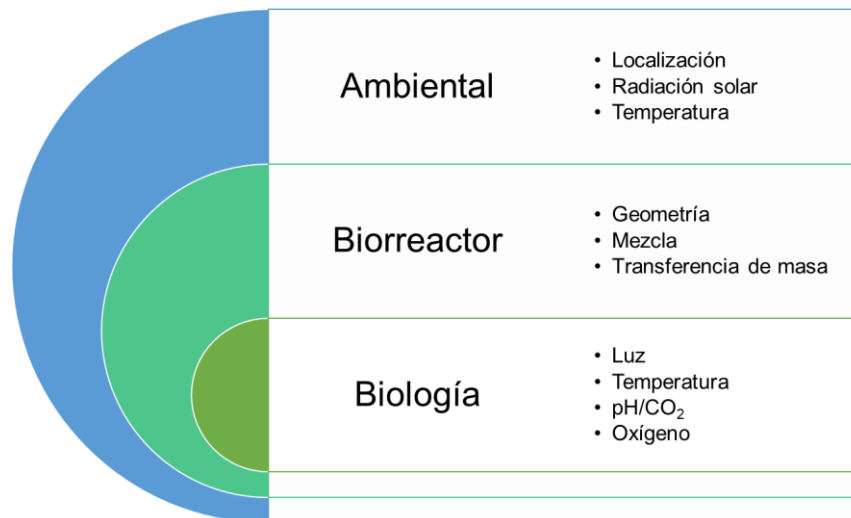


Figura 2. Principales parámetros que determinan la productividad de los sistemas relacionados con las microalgas.

Medio ambiente: factores operativos que afectan los parámetros biológicos

Como se describió anteriormente, el crecimiento de microalgas se ve afectado por la combinación de varios parámetros operativos, tales como la intensidad de la luz, el fotoperíodo, la temperatura, el pH, el CO₂, el oxígeno disuelto y la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo (Kitaya et al., 2008). Entre ellos, la calidad y cantidad de luz es el motor de la reacción de la fotosíntesis y afecta no solo la fotosíntesis de microalgas, la composición celular y las vías metabólicas, sino también la eficiencia económica del proceso de cultivo de estos microorganismos (Blanken et al., 2013; Maroneze et al., 2016).

De todo el espectro de luz solar, la radiación fotosintéticamente activa (PAR) para las microalgas solo varía entre 400 y 700 nm aproximadamente, lo que representa el 43% de la radiación solar (Kwan et al., 2020). La capacidad de las microalgas y cianobacterias para absorber una longitud de onda de luz específica depende de los pigmentos que sintetiza, los cuales funcionan como complejos antena captadores de fotones. La mayoría de los pigmentos fotosintéticos son clorofilas "a" y "b", que exhiben dos picos de absorción máxima, en azul (420 nm para Chla y 435 nm para Chlb) y rojo (660 nm para Chla y 643 nm para Chlb). Otros pigmentos implicados en la absorción de luz son los carotenoides (420-550 nm) y las ficobilinas (500-650 nm) (Martín-Girela et al., 2017).

Ya está bien definido que la luz es necesaria para la fotosíntesis de microalgas, pero para el desarrollo de fotobiorreactores y procesos de base fotosintética, es necesario comprender los fenómenos asociados con diferentes intensidades de luz, que son la limitación, saturación e inhibición por la luz (Carvalho et al., 2011). Existe un mínimo de luz requerido para realizar la fotosíntesis, conocido como irradiancia de compensación, por debajo de este valor, las microalgas están bajo fotolimitación, lo cual ocurre cuando no hay luz suficiente y se produce la respiración. Por encima de este valor de compensación, la tasa de asimilación fotosintética aumenta con la irradiancia hasta alcanzar el punto de saturación de la luz. A irradiaciones superiores al punto de saturación, se produce la fotoinhibición, lo que provoca un daño reversible al aparato fotosintético,

posteriormente con el aumento de la intensidad de luz, se induce un daño oxidativo celular (fotooxidación), el cual es irreversible. Los valores de estos parámetros característicos de la luz son diferentes para las diferentes microalgas; por tanto, son factores cruciales para considerar a la hora de elegir la especie y diseñar el fotobiorreactor (Chang et al., 2017; Martín-girela et al., 2017; Acién et al., 2020).

La energía luminosa puede ser proporcionada por la luz solar, que es la fuente de energía más rentable para la producción de microalgas. Sin embargo, también tiene ciertas desventajas, incluidos los ciclos día/noche, la influencia de las condiciones climáticas y los cambios estacionales. Por otro lado, la iluminación artificial puede dar como resultado una tasa fotosintética mejorada y, por lo tanto, una productividad mayor de la biomasa y la acumulación de productos específicos. Al mismo tiempo, el uso continuo de luz artificial da como resultado aumentos en los costos por consumo de energía eléctrica, lo que incrementa los costos del producto final (Blanken et al., 2013; Abu-Ghosh et al., 2015; Kwan et al., 2020). Alternativamente, se ha propuesto el uso de diferentes fotoperíodos para reducir la demanda de energía en cultivos de microalgas y por ende desarrollar procesos más económicos y eficientes, ya que el uso de regímenes de luz adecuados puede reducir la demanda de energía lumínica con una productividad similar o incluso superior a la obtenida con iluminación continua (Maroneze et al., 2016; Maroneze et al., 2019). Otro factor importante para considerar es la radiación ultravioleta (UV). La radiación UV puede afectar la fisiología normal, la bioquímica de las células de microalgas y afectar negativamente la fotosíntesis, el crecimiento, la motilidad y otros procesos celulares (Rastogi et al., 2019). El continuo agotamiento de la capa de ozono estratosférico indica que este factor será cada vez más relevante en la transición de cultivos del interior al exterior. Este efecto, fue evidenciado en la práctica por Schipper et al. (2021), quienes concluyeron que la radiación UV puede haber sido uno de los principales factores del fracaso en la transición de cultivos de cianobacterias de interior a exterior en Qatar, una región con altos niveles de radiación UV.

Además de la calidad y cantidad de luz, el crecimiento de las microalgas está muy influenciado por la temperatura. En general, cada especie de microalgas se caracteriza por una temperatura de crecimiento óptima. Por debajo de este valor, la tasa de crecimiento de los cultivos se reduce, aproximadamente, a la mitad cada 10 grados. Por otro lado, por encima del valor óptimo de temperatura el cultivo puede morir por sobrecalentamiento, generalmente a 10 °C por encima del valor óptimo (Queiroz et al., 2018; Ación et al., 2020). El metabolismo de las microalgas es un conjunto de procesos fotoquímicos y bioquímicos. Por lo tanto, las fluctuaciones de la temperatura ambiental tienen un impacto directo en las tasas de crecimiento a través de sus efectos en los procesos bioquímicos y fisiológicos térmicamente sensibles. Las temperaturas bajas generalmente reducen la actividad carboxilasa de la enzima RuBisCo, y esto puede conducir a una sobreproducción de energía en las membranas de los tilacoides, lo que puede generar un desequilibrio entre el suministro de energía fotosintética y el consumo de energía dentro del ciclo de Calvin-Benson-Bassham en la célula (Falk et al., 1996; Ras et al., 2013; Siqueira et al., 2020).

La mayoría de las microalgas son mesófilas, las tasas de crecimiento máximas comienzan en temperaturas entre 20 y 25 °C. Sin embargo, algunas especies pueden crecer en condiciones extremas de temperatura, como cepas termófilas y psicrófilas, p. Ej. *Galdieria sulphuraria* y *Asterionella formosa*, que tienen temperaturas óptimas de crecimiento alrededor de 42 °C y 17 °C, respectivamente (Ras et al., 2013). Las microalgas cultivadas en fotobiorreactores al aire libre están expuestas a variaciones estacionales y diurnas de temperatura. Por lo tanto, un equipo de control de temperatura puede ser crucial dependiendo del clima local. Por otro lado, se debe considerar que los sistemas de enfriamiento/calefacción ocasionan incrementos en el costo del bioproceso debido al uso intensivo de energía o en casos particulares el costo puede reducir por un aumento en la eficiencia del bioproceso (Uyar y Kapucu, 2015).

Por otra parte, el pH es una de las condiciones ambientales más críticas en el cultivo de microalgas, ya que determina la solubilidad y disponibilidad de CO₂ en el

cultivo e influye en el estado fisiológico de las células. Cada especie de microalgas tiene un rango de pH óptimo. En general, la mayoría de las especies de microalgas crecen en un pH neutro, excepto las marinas, que prefieren valores de pH de 8.0 a 8.4, y especies extremófilas, como *Spirulina platensis*, que puede tolerar hasta pH 9, y *Galdieria sulphuraria*, que puede tolerar pH por debajo a 2 (Khan et al., 2018). En cultivos de microalgas autótrofas, es común usar gas enriquecido con CO₂ para controlar el pH y proporcionar el carbono inorgánico requerido por las células, que comúnmente se suministra en la suspensión de microalgas en forma de burbujas a través de un difusor de gas (Fu et al., 2019; Ación et al., 2020). La concentración de CO₂ en el cultivo está determinada por la concentración de carbono inorgánico total en el medio de cultivo y el pH, según el sistema tampón bicarbonato-carbonato (CO₂ - HCO₃⁻ - CO₃²⁻). Es importante mencionar que, durante el cultivo, el pH aumenta gradualmente debido a la absorción de carbono inorgánico por las microalgas, lo que puede limitar la disponibilidad de CO₂ y luego inhibir el crecimiento celular. Por el contrario, en cultivos heterótrofos se consume oxígeno y se produce CO₂, la transferencia de masa líquido-gas también es un factor clave en estos procesos (Pérez García et al., 2011).

La reacción de fotosíntesis produce estequiométricamente 1.9 toneladas de oxígeno cuando se genera 1 tonelada de biomasa de microalgas. Si no se dispone de los mecanismos adecuados para eliminarlo, el oxígeno puede acumularse en el medio de cultivo (Maroneze y Queiroz, 2018). Los niveles altos de oxígeno pueden inducir la fotorrespiración en las microalgas, donde el exceso de O₂ compite con el CO₂ por los sitios de unión de RuBisCO. Este fenómeno conduce a un cambio de la fotosíntesis a la fotorrespiración, reduciendo así la eficiencia fotosintética y el rendimiento de biomasa. Además, la combinación de oxígeno y exceso de luz puede crear especies reactivas de oxígeno (ROS) y luego conducir a una fotooxidación severa (Richmond, 1991; Kazbar et al., 2019). En un estudio con condiciones de luz sub-saturadas y oxígeno disuelto saturado de aire, Raso et al. (2012) demostraron una reducción en la tasa de crecimiento específico de *Nannochloropsis* sp. de 63% cuando

umentan la concentración de saturación de aire de 75% para 250%. De la misma forma, Sousa et al. (2013), investigaron el efecto de la presión parcial de oxígeno sobre el crecimiento de *Neochloris oleoabundans* a bajas intensidades de luz. En dicho estudio concluyeron que la pérdida en la productividad de la biomasa era resultado de la actividad fotorrespiratoria de RuBisCO, ya que la luz se encontraba en valores de subsaturación. Por lo tanto, un aspecto crítico del diseño y escalado de fotobiorreactores tubulares es establecer geometrías que no permitan la acumulación de oxígeno a niveles inhibitorios (Camacho-Rubio et al., 1999).

Parámetros del fotobiorreactor

Los sistemas de cultivo deben diseñarse para proporcionar las condiciones óptimas requeridas por las cepas seleccionadas con una demanda y un costo mínimo de energía. Por lo tanto, se deben proporcionar las condiciones de cultivo específicas ya discutidas. Para satisfacer estas demandas impuestas por el sistema biológico, los sistemas de cultivo deben diseñarse de manera que garanticen mezclado y transferencia de masa eficientes. Los biorreactores de microalgas se clasifican según su diseño en dos tipos principales: sistemas abiertos (como estanques extensos sin mezclar, estanques con canales) y sistemas cerrados (como fotobiorreactores tubulares -PBR-, PBR verticales, fermentadores heterótrofos). Normalmente, estas estructuras constan de sistemas de cuatro fases: células como fase sólida, medio de crecimiento como fase líquida, fase gaseosa y colector de radiación luminosa (en el caso de cultivos fotoautótrofos) (Chang et al., 2017).

El primer aspecto de la geometría a considerar en los fotobiorreactores es la relación superficie-volumen (relación S/V), ya que la distribución de luz en el PBR está relacionada con el área total de superficie transparente disponible. Como regla general, las productividades máximas de cultivo se logran con una relación S/V más alta, ya que esto asegura una mejor uniformidad de la energía luminosa, mejorando la eficiencia fotosintética. Por lo tanto, se prefieren los diseños de PBR de trayectoria de luz corta, incluidos los PBR tubulares, de placa plana, de biopelícula o de columna vertical. Además,

la distribución de la luz es el mayor cuello de botella en la ampliación de los PBR, ya que limita su volumen o la reducción excesiva de diámetro puede provocar un colapso estructural.

En cualquier sistema de cultivo de microalgas es imperativo generar condiciones hidrodinámicas que promuevan un buen mezclado para: (i) minimizar la existencia de gradientes y distribuir eficientemente nutrientes y gases entre las células y el medio de cultivo; (ii) evitar el estancamiento de las células en zonas no iluminadas; (iii) mantener las células en suspensión; (iv) facilitar la transferencia de calor y el intercambio de gases; y (v) evitar los fenómenos de fotolimitación, fotoinhibición y fotooxidación. En sistemas abiertos como "raceways", el mezclado se realiza mecánicamente mediante sistemas de agitación con ruedas de paletas. En fotobiorreactores cerrados, la mezcla se realiza mediante bombas y/o aspersores de CO₂/aire (p. Ej., columna de burbujas o airlift). Los fermentadores heterótrofos convencionales se agitan mediante impulsores y deflectores y/o mediante aireación con sistemas de elevación de aire o columna de burbujas (Pérez-García et al., 2015). También se puede aplicar una combinación de métodos mecánicos y no mecánicos en fotobiorreactores y fermentadores. Sin embargo, los niveles de turbulencia que superan la resistencia al cizallamiento celular pueden conducir a una condición de estrés y, en consecuencia, inhibición de la actividad metabólica, daño celular o incluso disrupción celular (Assunção et al., 2020).

Los fenómenos de transferencia de masa afectan todos los aspectos de los bioprocesos. La capacidad de transferencia de masa del sistema de cultivo biológico es su capacidad para transportar cualquier componente a las células (Acién et al., 2020). Los compuestos disueltos en la fase líquida están disponibles fácilmente para las células ya que están suspendidos en el mismo líquido. Por otro lado, los problemas de transferencia de masa entre las fases gaseosa y líquida surgen durante el suministro de oxígeno y dióxido de carbono, en cultivos heterótrofos y fotoautótrofos, respectivamente (Chisti, 2009). Como ya se ha comentado, en los cultivos de microalgas los componentes que deben intercambiarse entre las fases líquida y

gaseosa son el CO₂ y el O₂. El desafío es proporcionar y eliminar estos gases a una velocidad lo suficientemente rápida para satisfacer los requisitos de las células de microalgas con un aporte mínimo de energía. La transferencia de masa se evalúa con frecuencia mediante el coeficiente de transferencia de masa volumétrica, el cual está dado en función de tres parámetros: (i) el coeficiente de transferencia de masa (k_{LA}); (ii) la fuerza impulsora, es decir la diferencia entre la concentración del componente en la fase líquida y la que está en equilibrio con la fase gaseosa; y (iii) el volumen del sistema (Reyna-Velarde 2010; Acién et al., 2020).

Parámetros ambientales/climáticos

Según Holdman et al. (2019), los procesos autótrofos de microalgas a gran escala solo pueden ser baratos si se utiliza la luz solar. Se debe considerar que los cultivos al aire libre están expuestos a cambios en el clima y cambios estacionales, que afectan la intensidad de la luz, la temperatura y el fotoperíodo, y por tanto, las productividades y los rendimientos del bioproceso dependen de las condiciones climáticas predominantes en una localidad en particular. Por lo anterior, para lograr un proceso rentable, es de vital importancia la selección de cepas de algas y ubicaciones adecuadas con alta irradiación solar anual y un intervalo de temperatura óptimo, que permita el crecimiento de las microalgas durante todo el año con niveles altos de productividad (Brusca et al., 2017).

Harmelen y Oonk (2006) establecieron que las condiciones climáticas adecuadas para las microalgas se encuentran aproximadamente en el área entre 37° N y 37° S de latitud, lo que corresponde a temperaturas medias anuales superiores a 15 °C. Siqueira et al. (2020) evaluaron el crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* en simulaciones climáticas de diferentes regiones de Brasil y concluyeron que los mejores resultados se encontraron en climas tropicales y bajas latitudes. Con la misma cepa de microalgas, Dias et al. (2020) evaluaron las condiciones simuladas de catorce tipos de climas distribuidos en 33 localizaciones geográficas de las zonas ecuatoriales y tropicales del mundo. Estos investigadores encontraron que los climas tropicales y secos, caracterizados por temperaturas más altas, favorecieron la

productividad de biomasa microalgal y la acumulación de lípidos. México, debido a su baja latitud promedio, tiene una alta irradiación solar anual, lo que resulta en temperaturas medias altas. De hecho, las civilizaciones nativas del Valle de México utilizaron como alimento la Spirulina, cianobacteria que crece naturalmente en el lago Texcoco a valores de pH elevados (Soni et al., 2017). Lozano-García et al. (2019) construyeron un modelo de sistema de información geográfica para identificar áreas en México con alto potencial de producción de microalgas e identificaron que hasta el 26.8% del país cuenta con áreas aptas para la producción de microalgas, equivalentes a 526,672 km². Esta información corrobora lo planteado por Speranza et al. (2015), quien concluye que los climas ideales para el cultivo de microalgas serían tropicales y secos con baja variación de temperatura durante el año. A nivel mundial, el grupo climático dominante por área de la superficie continental es el seco (30.2%), seguido de tropical (19%) y subtropical (13.4%) (Dias et al., 2020). Además, es importante mencionar que es poco probable que las regiones muy alejadas de la línea del Ecuador (latitud 0°) puedan soportar cultivos heterótrofos de microalgas, ya que los rayos solares están más inclinados y, en consecuencia, las regiones reciben una irradiación solar menor, lo que resulta en una menor temperatura (Speranza et al., 2015). Una vez definidos los aspectos relacionados con la posición geográfica y climática, se deben considerar factores relacionados con el uso del suelo, como la topografía, el nivel y la accesibilidad de las parcelas, así como la disponibilidad de insumos (agua y nutrientes) y el acceso a la infraestructura de transporte.

Sistemas de cultivo de microalgas

Sistemas abiertos

Raceways

Actualmente, los estanques de “*raceways*” son el sistema más utilizado para la producción comercial de microalgas, se utilizan en aproximadamente el 95% de la producción mundial; debido principalmente a su simplicidad, flexibilidad, fácil ampliación, y bajos costos de construcción y operación (Mendoza et al. 2013). Un *raceway* es un canal de recirculación de circuito cerrado, generalmente hecho de paredes de concreto

y divisores revestidos con una membrana de plástico o fibra de vidrio para evitar filtraciones o simplemente se construyen en suelo compactado con un revestimiento para evitar que el suelo absorba el líquido (Singh & Sharma, 2012). En estos estanques se utiliza mezclado con ruedas de paletas con el fin de mantener un sistema homogéneo de microalgas, agua y nutrientes, los cuales circulan alrededor de un “*raceway*”. Para la producción de biomasa de microalgas, las instalaciones basadas en canales suelen tener muchos estanques, ya que un solo estanque no suele superar las 0.5 ha (Chisti, 2016).

Los reactores de canales generalmente operan en modo continuo donde los nutrientes, cuando se requiere, se agregan en la parte frontal de la rueda de paletas, y las microalgas, después de que ha circulado a través del circuito, se recolectan detrás de la rueda de paletas (Singh & Sharma, 2012). Para evitar la limitación de la luz dentro del cultivo los canales se mantienen invariablemente poco profundos y, dado que la luz solar puede penetrar el agua del estanque solo a una profundidad limitada, generalmente tienen entre 25 y 30 cm de profundidad (Chang et al. 2017), lo cual incrementa el espacio requerido en la instalación y limita la productividad volumétrica del sistema. Además, debe tenerse en cuenta que la profundidad del reactor influye directamente en la transferencia de masa y calor. La menor profundidad de los canales reduce el tiempo de contacto entre la fase gaseosa y líquida y en consecuencia se pierde hasta un 80-90% del CO₂ burbujeado a la atmósfera, lo cual puede llevar a una limitación de carbono (Kumar et al., 2015).

Por otro lado, estos sistemas presentan algunos inconvenientes importantes, que incluyen alto riesgo de contaminación del cultivo, falta de control de temperatura, bajo crecimiento celular, lo que resulta en altos costos de recolección, y, el considerado más grave, mala transferencia de masa gas/líquido (Mendoza et al., 2013). No obstante, sigue siendo el sistema económicamente más viable a nivel comercial. Slade y Bauen (2013) estimaron el costo de producción de biomasa de microalgas en *raceway* y en fotobiorreactor tubular, y concluyeron que la producción en el

sistema abierto puede ser aproximadamente un 80% menor. Según Chisti (2016), el costo estimado para producir un estanque revestido de plástico de 100 ha de tierra compacta fue de aproximadamente USD 144,830 por ha en 2014. Aunque se han reportado altas productividades de biomasa, p. ej. 37 g m⁻² d⁻¹ (Moheimani & Borowitzka, 2006), por lo general se describen productividades mucho menores, como 1.6-3.5 g m⁻² d⁻¹ (García-González et al., 2003), y 4-10 g m⁻² d⁻¹ (Delrue et al., 2017). Esta variación también se reflejará en el costo de producción de biomasa, que, según Acién et al. (2019), generalmente es mayor a 4.5 €/kg. Delrue et al. (2017) estimaron que el costo de producción de *Spirulina* en estanques de canales oscila entre 3.8 y 9.5 €/kg dependiendo de la productividad del sistema. Fernández et al. (2019) estimaron que el costo de producir microalgas en un sistema de canales es 50% más bajo que en fotobiorreactores de capa delgada en cascada.

A pesar de ser una tecnología rudimentaria, los estanques de *raceways* siguen siendo una pieza clave para la expansión de los productos y procesos basados en el mercado de las microalgas, ya que son el sistema más económico y sencillo. Aun así, para que esto sea económicamente viable es necesario invertir en mejoras en los sistemas y procesos. En este sentido, varios investigadores y empresas han buscado soluciones a estos cuellos de botella tecnológicos. Ryu et al. (2019) acoplaron un intercambiador de calor a un biorreactor de laguna utilizando el flujo de residuos industriales como fuente de calor y como estrategia para mantener una alta productividad durante todo el año. Estos autores registraron un aumento de hasta un 44% en la productividad de los cultivos y un 95% en la viabilidad económica. Inostroza et al. (2021), optimizaron el diseño y la hidrodinámica de un “*raceway*” de 500 m², utilizando Dinámica de Fluidos Computacional (CFD). Eustance et al. (2020) mejoraron la eficiencia de utilización de CO₂ en tres veces mediante la carbonatación de membranas. Sirikulrat et al. (2021) utilizaron una columna de dispersión de luz transparente para mejorar la iluminación en el nivel más profundo de un estanque de canales profundos, lo que resultó en un incremento del 48.3% para la

productividad y decrementos de 41.7% en la energía consumida y de aproximadamente 14% en la evaporación del agua.

Estanques extensos sin mezclar y estanques naturales

Las microalgas cuando encuentran condiciones ambientales favorables y con suficientes nutrientes, pueden crecer abundantemente de forma natural. Esto ocurre invariablemente con especies extremófilas, que crecen en condiciones que limitan el crecimiento de microorganismos contaminantes, como pH ácido o alcalino, temperatura extrema y alta concentración de sal. El principal ejemplo de esto son los cultivos de *Arthrospira*, también conocida comercialmente como Spirulina, que se utilizan comúnmente como alimento, suplemento dietético y suplemento alimenticio. Este microorganismo crece naturalmente en lagos alcalinos tropicales y subtropicales, con un pH de crecimiento óptimo en el rango de 8 a 10. El primer registro de producción y consumo de biomasa de Spirulina es de los aztecas que solían cosechar *Arthrospira maxima* (conocido como Tecuitlatl por pre-Hispanos) del lago de Texcoco en el Estado de México, muy cerca del actual aeropuerto internacional de la Ciudad de México (Figura 3). La Spirulina, después de ser secada, se vendía para consumo humano en un mercado de

Tenochtitlán. La primera producción comercial de Spirulina, iniciada en la década de 1970, fue en el "Caracol", una extensa laguna sin sistemas de mezclado artificial de la compañía Sosa Texoco (Belay, 2008, Hamed, 2016). Antes del cierre a mediados de la década de 1990 debido al aumento de la contaminación, resultante del desarrollo urbano e industrial de la Ciudad de México, el 'Caracol' era un evaporador solar gigante en forma de espiral de 3200 m de diámetro con una superficie de 900 ha dentro del lago de Texcoco, que producía alrededor de 300 toneladas de biomasa por año. La productividad de la biomasa informada en este sistema fue de 10 g m⁻² d⁻¹ (Borowitzka, 1999; Tredici, 2004).

Las lagunas extensas no mezcladas o lagunas poco profundas se denominan así porque generalmente tienen menos de 0.5 m de profundidad, hasta 250 ha de área y no tienen un sistema de mezclado (artificial), excepto el viento y la convección. Aunque requieren una cierta cantidad de trabajo para su construcción y mantenimiento, a menudo se les conoce como lagunas naturales (Tredici, 2004; Kumar, 2015). Los estanques sin mezclado pueden representar el método de cultivo comercial más económico y menos técnico cuando las condiciones climáticas adecuadas permiten el cultivo durante casi todo el año, como es el caso de Australia. El país alberga a los 3 mayores productores de



Figura 3. Azteca cosechando espirulina en México. Drawing in *Human Nature*, marzo de 1978, por Peter T. Furst (Hamed, 2016).

β -caroteno de *Dunaliella salina* en el mundo. Esta especie contiene hasta un 14% de β -caroteno en las células y también se considera un microorganismo extremófilo, ya que crece en medios de cultivo de alta salinidad, con un rango óptimo entre 18 y 22% de NaCl (Borowitzka et al. 1984; Maroneze et al., 2020).

El proceso de cultivo en estos estanques abiertos consiste en bombear agua de mar desde el océano adyacente al estanque y luego se agregan nutrientes a esta agua salina. Cuando el sistema ha alcanzado la densidad celular y el contenido de β -caroteno apropiados, el cultivo se dirige a una planta de recolección. Después de la cosecha, el medio residual se recicla al estanque, donde se ajusta la salinidad y el contenido de nutrientes (Borowitzka, 1990). Las principales ventajas de los estanques extensivos no mezclados están relacionadas con los aspectos económicos, ya que operan sin adición de CO₂, sin mezclado artificial, lo cual evita cierto consumo de energía eléctrica, y con un control mínimo del sistema, operando bajo condiciones de temperatura, humedad y ciclos luz/obscuridad que se presentan en el lugar (del Campo, 2007). Las principales desventajas están asociadas con las limitaciones de especies de microalgas que se pueden cultivar y las condiciones climáticas, además de la baja productividad, que apenas supera el valor de 1 g m² d⁻¹, lo que dificulta y encarece la recolección de biomasa (Trediti, 2004; Kotzen et al., 2019).

Estos sistemas, a pesar de sus problemas, son realmente rentables para el crecimiento de microalgas extremófilas, especialmente de *D. salina* para la producción de β -caroteno, el cual es un producto de alto valor. Sin embargo, estos sistemas están extremadamente limitados a regiones con una irradiancia anual muy alta, clima cálido, escasas precipitaciones y principalmente alta disponibilidad de agua salina.

Sistemas cerrados

Fotobiorreactores tubulares

Entre los sistemas cerrados, los fotobiorreactores tubulares se consideran el diseño más prometedor y factible para la producción comercial de microalgas, particularmente para la obtención de productos de alto valor como productos

químicos finos o farmacéuticos (Torzillo & Zittelli, 2015; Zittelli et al., 2013). El éxito de estos fotobiorreactores se debe a la gran superficie, las condiciones de cultivo estables y controlables, la reproducibilidad y la alta productividad de la biomasa. Esto permite utilizar estos reactores para generar biomasa a partir de cepas sensibles como *H. pluvialis*, que fácilmente son presa de microorganismos contaminantes y son sensibles a condiciones ambientales extremas (Berstenhorst et al., 2009). Como ocurre con cualquier reactor biológico, la productividad depende de variables diversas, como la configuración geométrica, las especies de microalgas y las condiciones de funcionamiento y cultivo.

Los fotobiorreactores tubulares se describieron por primera vez en 1953 (Tamiya et al., 1953), pero no se consolidaron hasta la década de 1990, después de ser mejorados progresivamente (Gudin & Chaumont, 1983; Pirt et al., 1983; Chaumont et al., 1988; Richmond et al., 1993). Consisten en una serie de tubos de plástico o vidrio transparentes rectos, que se pueden organizar en diferentes patrones (p. ej., rectos, en zigzag o en espiral) y ángulos (p. ej., horizontales, inclinados, verticales o helicoidales) (Maroneze & Queiroz, 2018). El intercambio de gases y la adición de nutrientes generalmente ocurren en una columna de burbujas o tanque adicional. El cultivo de microalgas se recircula mediante una bomba o por *airlift* en un flujo muy turbulento, con una velocidad del líquido en el rango de 0.4 a 1.0 m s⁻¹ (Trediti, 2004; Abomohra et al., 2016; Chang et al., 2017).

Aunque los PBR tubulares son una tecnología consolidada, todavía tienen varias desventajas que superar, incluida la fotolimitación o fotoinhibición, problemas de transferencia de masa y alto costo (Huang et al., 2017). En cultivos de exterior, los problemas con la iluminación son habituales, en donde para mitigarlos, además de la elección de la ubicación, el diámetro y disposición de los tubos son determinantes. En general, se acepta que, a menor diámetro, menor fotolimitación, por lo tanto, mayor eficiencia fotosintética, pero hay un límite mínimo para evitar el límite de saturación lumínica. Los valores de diámetro recomendados oscilan entre 0.03 y 0.12 m. Como ya se ha comentado, el exceso de O₂ en cultivos autótrofos es tóxico para las

células y debe eliminarse de forma eficaz, en este sentido el PBR tubular tiene tasas de transferencia de masa relativamente bajas. El principal factor que afecta la acumulación de oxígeno disuelto es la longitud del colector solar, por tal motivo se sugieren longitudes máximas de 100 y 400 m para configuraciones de colector y serpentín, respectivamente (Acién et al., 2020). Recientemente, con el incremento del uso de PBR tubulares en plantas piloto, se han reportado problemas de contaminación, que hasta entonces era una de las grandes ventajas aparentes de tales sistemas.

Aunque tienen varios desafíos tecnológicos, la principal limitación a escala comercial de los reactores tubulares es el costo de inversión, que puede exceder el doble del monto reportado para los sistemas a base de canales. Según Nosker et al. (2011), este valor varía alrededor de 0.51 M €/ha a escala de 100 ha. En cuanto al costo de producción de biomasa, se han reportado valores de 4.15 €/kg (Nosker et al., 2011), 25 €/kg (Delrue et al., 2017), y 74 €/kg (Molina Grima, 2009). Uno de los factores que más incide en los costos de producción es la productividad de la biomasa y, en este sentido, se han alcanzado valores elevados en estos sistemas. Se han reportado productividades de biomasa de 10-40 g m² d⁻¹ para *Spirulina* (Delrue et al., 2017), 13 g m² d⁻¹ para *Haematococcus pluvialis* (Olaizola, 2000), y de 20 a 50 g m² d⁻¹ para *Scenedesmus* (Acién et al., 2012).

De hecho, estos sistemas de cultivo marcaron un gran avance para los procesos basados en microalgas, debido a que ha sido posible cultivar cepas sensibles a gran escala. Sin embargo, hasta el día de hoy solo son económicamente viables para la producción de compuestos de alto valor agregado, como la astaxantina, debido a la alta inversión requerida y los elevados costos de operación. Aun así, las ventajas de los fotobiorreactores tubulares, especialmente con relación a los altos rendimientos, sugieren que se debe investigar más para tratar de reducir costos y superar los cuellos de botella tecnológicos que limitan su uso generalizado.

Biorreactores para cultivos heterótrofos

La mayor ventaja del crecimiento heterótrofo es la posibilidad de utilizar casi cualquier fermentador como biorreactor. A

diferencia del crecimiento autótrofo, en heterótrofos el oxígeno puede ser un sustrato limitante y su suministro es uno de los mayores desafíos para la ingeniería de reactores debido a su baja solubilidad en agua (Pérez-García et al., 2011). Según Griffiths et al. (1960), independientemente del sustrato orgánico o de las especies de microalgas, la productividad de la biomasa aumenta con mayores niveles de aireación. Además de la transferencia de oxígeno, el crecimiento de microalgas en condiciones heterótrofas también presenta requerimientos relacionados con el mezclado, suministro de nutrientes y un ambiente estéril.

Para cumplir con estos requisitos, los reactores de tanque agitado (STR) son los más utilizados gracias a su eficiencia de mezclado, buena transferencia de calor y masa y fácil operación. En estos equipos la agitación se proporciona mecánicamente con la ayuda de impulsores, a veces deflectores, y aspersores de gas (Jossen et al., 2017). Sin embargo, este tipo de biorreactor también tiene varias limitaciones, especialmente para las células sensibles al cizallamiento, que pueden dañarse al aumentar la velocidad de agitación o a altas velocidades de suministro de gases (p. ej. aire), además de un alto consumo de energía, que incrementa significativamente los costos del proceso. Otro grupo de biorreactores de gran importancia para la industria biotecnológica son los denominados biorreactores neumáticos, en los que la agitación del medio se realiza mediante el burbujeo de aire. Estos reactores son generalmente de forma cilíndrica, donde el aire se inyecta en la base del recipiente a través de un aspersor, para proporcionar de manera simultánea aireación, mezclado y circulación de fluidos. Hay dos tipos principales de biorreactores agitados neumáticamente: biorreactores de columna de burbujeos y tipo "air lift", que generalmente generan bajo esfuerzo cortante, diseño y construcción simple y bajos costos de operación. Sin embargo, no se recomiendan para fluidos viscosos no newtonianos, ya que la viscosidad elevada disminuye la retención de gas y reduce la transferencia de masa (Jesus et al., 2017). Para superar los inconvenientes de los biorreactores de tanque neumáticos y agitados, se propusieron biorreactores *airlift* con agitación mecánica (Chisti & Jauregui-Haza, 2002).

Al igual que con otros sistemas ya discutidos, los costos de producción en biorreactores para cultivos heterótrofos varían en función de la especie de microalga usada, la productividad y el tipo de reactor. Sin embargo, en estos sistemas, la fuente de carbono orgánico es un factor importante por considerar, ya que representa alrededor del 80% del costo del medio de cultivo (Francisco et al., 2015). Según Enzing et al. (2014), los costos actuales de producción de *Chlorella* en biorreactores heterótrofos se estiman alrededor de USD 2-2.6/kg. Ende & Noke (2019) estimaron que este valor se puede reducir a USD 1-1.25/kg utilizando residuos como materia prima.

En términos de producción de biomasa, cuando se comparan con otros sistemas de cultivo, los biorreactores aplicados a cultivos heterótrofos suelen presentar los valores más altos de productividad. Xiong et al. (2008), encontraron una productividad de *Chlorella prototecoides* de 7.40 g l⁻¹ d⁻¹ en un STR de 5 l, utilizando glucosa como fuente de carbono. Francisco et al. (2015) reportaron 6.68 g l⁻¹ d⁻¹ en un biorreactor de columna de burbujeo de 2 l con aguas residuales de yuca. Queiroz et al. (2018) encontraron una productividad de biomasa de 4 g l⁻¹ d⁻¹ en un biorreactor de columna de burbujeo de 2 l y usando aguas residuales de procesamiento de lácteos como materia prima.

La principal ventaja de los biorreactores heterótrofos radica en el escalado, factor crucial en los procesos consolidados basados en microalgas a escala industrial. Sin embargo, sigue siendo un método de cultivo caro, pero con potencial de expansión, especialmente si se asocia al concepto de biorrefinería, ya que las aguas residuales pueden utilizarse como medio de cultivo, con tratamiento secundario y terciario paralelo de los efluentes. Independientemente del tipo de biorreactor o medio de cultivo, los cultivos heterótrofos de microalgas presentan baja susceptibilidad a la contaminación, y por supuesto en menor grado que los estanques abiertos y biorreactores tubulares. Para reducir los riesgos de contaminación y mantener las condiciones axénicas en biorreactores, el uso de microalgas extremófilas puede ser una alternativa viable.

Sistemas de cultivo de microalgas en desarrollo

Con el objetivo de resolver los problemas de los sistemas consolidados, se han propuesto otros tipos de fotobiorreactores, p. ej. fotobiorreactores tubulares verticales, de placa plana e híbridos. Sin embargo, hasta donde sabemos, ninguno de ellos se utiliza actualmente a escala industrial, principalmente debido a la dificultad en escalar su construcción y operación, su costo alto, problemas de ingeniería para resolver a escala de producción, los requisitos de un área amplia para instalar estos sistemas de cultivo o porque aún son tecnologías emergentes (Acien et al., 2020).

Los fotobiorreactores de columna vertical estuvieron entre los primeros sistemas de cultivo de microalgas descritos en la literatura (Cook, 1950). Consiste en tubos transparentes verticales que permiten la penetración de la luz, cuentan con un aspersor de gas en la parte inferior del reactor, que además promueve el mezclado del medio de cultivo la transferencia de CO₂ y eliminación de O₂ (Kumar et al., 2011). Según su modo de flujo de líquido, los PBR tubulares verticales se pueden clasificar en columna de burbujas y airlift (Singh & Sharma, 2012). Estos sistemas son compactos con una alta relación área superficial/volumen, bajo riesgo de contaminación y alto crecimiento celular. Sin embargo, hasta ahora los PBRs de columna vertical no se utilizan en propuestas industriales debido a limitaciones en el escalado, que se atribuye a la fragilidad del material, la transferencia de gas en las regiones superiores del PBR, el control de temperatura y una superficie limitada para iluminación (Mirón et al., 1999; Koller, 2015; Maroneze & Queiroz, 2018). Un caso real de los problemas en el escalamiento es el caso de GreenFuel Technologies Corporation, en Arizona en 2007 con fotobiorreactores cerrados inclinados verticales. La compañía tuvo mucho éxito con una planta piloto para utilizar CO₂ residual para producir biomasa de microalgas en estos reactores, pero cuando realizaron un escalamiento 100 veces mayor, el sistema colapsó debido a fallas de diseño de tipo ingenieril. Desafortunadamente, el proyecto de millones de dólares fracasó (Waltz, 2009; Maroneze & Queiroz, 2018).

Los fotobiorreactores de placa plana se describieron por primera vez en la década de 1950 como una gran promesa para los cultivos de microalgas debido a su alta relación de superficie a volumen. En este tipo de fotobiorreactor, se pasa una fina capa de cultivo (en el orden de milímetros) a través de un panel plano hecho de un material transparente, donde la mezcla generalmente se proporciona burbujeando gases desde un lado o al fondo del PBR a través de un tubo perforado (rociador) (Chang et al., 2017; Faried et al., 2017). Se ha reportado que se pueden lograr altas eficiencias fotosintéticas en PBRs de placa plana y, además, el oxígeno disuelto es relativamente menor en comparación con los fotobiorreactores tubulares horizontales (Ugwu et al., 2008). Los paneles planos son una tecnología prometedora para generar altas concentraciones de biomas microalgal, sin embargo, existen problemas sin resolver para ser usados a escala comercial y por esto hasta ahora solo se utilizan a escala piloto. El “ensuciamiento” o “crecimiento en pared” se considera el principal defecto, el cual ocurre cuando las células se adhieren a las paredes de plástico o vidrio, provocando una disminución en la penetración de la luz y un mayor riesgo de contaminación (Chang, 2017). Estos sistemas también pueden experimentar problemas con el control de temperatura, dificultades en la limpieza y baja eficiencia en términos de producción en masa por unidad de espacio. Las dimensiones de los paneles planos son diversas, pero se recomiendan alturas inferiores a 1.5 m, con una anchura inferior a 0.10 m para evitar el uso de materiales de alta resistencia mecánica, por lo que el escalado se convierte en una limitación crítica, ya que se requieren de muchos módulos para una instalación comercial y por tanto se requiere una amplia área para su instalación (área para instalar los PBR). adicionalmente, el costo de operación es elevado porque, en comparación con otros tipos de PBRs a escala de producción, los sistemas de placas requieren una cantidad considerablemente mayor de trabajo de mantenimiento (Fernandez et al., 2013).

También existen sistemas híbridos, que combinan dos o más configuraciones de varios sistemas. En estos, la desventaja de un diseño se complementa con las ventajas del otro, permitiendo mayores productividades y

relación superficie / volumen además de menor demanda y costos de energía (Estrada-Graf et al., 2020). Soman & Shastri (2015) combinaron PBR de placa plana y tubulares, que tienen una relación superficie/volumen un 7% mayor, un mejor régimen de flujo y menores costos operativos y de materiales. Deprá et al. (2019) desarrollaron un reactor de columna de burbujas acoplado a una plataforma de iluminación con una reducción de costos de capital, potencializando el escalamiento del sistema, ya que el PBR requirió un área superficial menor. Un fotobiorreactor híbrido estanque-tubular fue desarrollado por Xu et al. (2020). En este se logró mejorar el rendimiento de biomasa de microalgas en un 31.2% en comparación con los estanques tradicionales. Recapitulando, estas tecnologías tienen potencial para generar mayores productividades de biomasa microalgal que los sistemas ya usados a escala mayor, pero aún se requiere más investigación y desarrollo para estar disponibles en cultivos a gran escala.

La elección del sistema de cultivo: Criterios y comparación de características básicas

Es notorio que aún numerosas barreras intervienen en la producción de microalgas y hasta el día de hoy no existe un sistema que se adapte a todos los procesos sin que se presenten algunas limitaciones. Teniendo esto en cuenta, se deben considerar algunos parámetros al elegir el biorreactor adecuado. Los principales criterios por considerar incluyen (i) tipo y calidad del producto objetivo; (ii) tolerancia de las cepas de microalgas a variaciones ambientales; (iii) escala de los sistemas de cultivo y productividad versus costo de las instalaciones y de operación; (iv) condiciones climáticas en las zonas a instalar los cultivos; y (v) impactos ambientales (Chang, 2017). Para apoyar en los criterios de elección, la Tabla 1 compara algunas de las características de las tecnologías discutidas en este artículo.

El primer factor por considerar es el tipo de producto, por ejemplo, para producir biocombustibles, es necesario un sistema que sea económico, hasta el punto de ser competitivo con los combustibles fósiles, como los estanques de canales. Para obtener productos con alto valor agregado, se pueden

considerar sistemas más robustos para obtener procesos más controlados, como es el caso de fotobiorreactores cerrados o cultivos en fermentadores si la cepa puede metabolizar fuentes de carbono orgánico. La especie de microalga debe estudiarse en cuanto a su resistencia al estrés hidrodinámico y los potenciales contaminantes. Como puede verse en la Tabla 1, los sistemas como los fermentadores heterótrofos, PBR vertical y PBR de placa plana son más susceptibles al estrés hidrodinámico, mientras que los sistemas abiertos tienen un bajo control de contaminación. En cuanto a la escala y el costo, es bien sabido que los sistemas abiertos y los fotobiorreactores tubulares tienen ventajas sobre los demás. La posición geográfica y el clima local son factores importantes, por ejemplo, los lugares con condiciones favorables son plausibles para albergar cultivos al aire libre, mientras que las regiones con climas menos favorables deben investigar la posibilidad de utilizar sistemas cerrados.

También se debe comparar el impacto ambiental de las tecnologías de cultivo de microalgas, debido a que la selección del reactor influye fuertemente en esos aspectos. Deprá et al. (2021) evaluó métricas e indicadores de sostenibilidad para sistemas comerciales de cultivo, es decir, estanque de canales, PBR tubular, PBR de placa plana y fermentador heterotrófico. A través de un análisis del ciclo de vida, estos autores demostraron que el sistema con mayor impacto ambiental fue el fotobiorreactor tubular, mientras que el estanque de *raceway* presentó el menor impacto ambiental entre las configuraciones evaluadas. Esto está relacionado directamente con la demanda energética de cada sistema, corroborando lo que se muestra en la Tabla 1.

Casos comerciales de éxito

Se espera que el mercado de productos a base de microalgas supere valores de USD 4.2 billones para 2031. Las empresas del mercado de productos a base de microalgas están fortaleciendo sus

capacidades de producción para satisfacer la creciente demanda de estos productos. La Tabla 2 resume algunas de las empresas involucradas en la producción de productos a base de microalgas en todo el mundo con sus respectivos sistemas de producción, principales productos y especies utilizadas.

Los primeros casos de éxito comercial en el área de microalgas fueron con la producción de *Spirulina* y hasta el momento, los mayores productores de esta microalga utilizan estanques de *raceway*, como Zhejiang Binmei Biotechnology, Earthrise Farms y Parry Nutraceuticals, ubicados en China, Estados Unidos e India, respectivamente. Los dos mayores productores de β -caroteno a partir de *D. salina* en el mundo son Western Biotechnology Ltd. y Betatene Ltd. en Australia y utilizan estanques extensos sin mezclar para el crecimiento de microalgas. Aunque son utilizados solo por una parte de las empresas basadas en microalgas, los biorreactores para cultivos heterótrofos y mixotróficos también han ganado importancia (Borowitzka, 2018). Solazyme en Brasil ha logrado una producción industrial exitosa de biomasa heterotrófica de microalgas para la producción de aceites, combustibles, productos de cuidado personal en fermentadores (Barros et al., 2019).

Un caso exitoso destacado fue el de Algatechnologies Ltd. (Ketura, Israel), que estableció un proceso de dos etapas para la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* en PBR tubulares (Ayalon, 2014). Cabe mencionar que el desarrollo de cultivos en reactores tubulares cerrados fue un mito en la producción de astaxantina, ya que *H. pluvialis*, el mayor productor de este pigmento, presenta un bajo rendimiento en sistemas abiertos, por ser una especie sensible (Olaizola, 2000). Los cultivos en dos o más etapas están ganando terreno en los procesos industriales, como es el caso de AllMicroalgae en Portugal, que utiliza un proceso de tres etapas, con fermentadores, PBR de placa plana y PBR tubulares, como se muestra en la Tabla 2.

Artículos

Tabla 1. Comparación de diferentes sistemas de cultivo.

Sistema de cultivo	Eficiencia de mezcla	Eficiencia de iluminación	Control de temperatura	Transferencia de gas	Control de contaminación	Estrés hidrodinámico	Evaporación	Consumo de energía	Escalamiento	Status
Raceways	Justo	Baja	Sin	Baja	Bajo	Muy bajo	Alta	Bajo	Fácil	Comercial
Estanques extensos sin mezclar	Muy pobre	Baja	Sin	Baja	Bajo	Bajo	Alta	Bajo	Fácil	Comercial
PBR tubular	Uniforme	Excelente	Buen	Baja	Alto	Alto	Baja	Alto	Fácil	Comercial
Fermentador heterótrofo	Uniforme	-	Buen	Alta	Alto	Alto	Baja	Alto	Fácil	Comercial
PBR vertical	Uniforme	Buena	Buen	Alta	Alto	Alto	Baja	Alto	Difícil	Escala piloto
PBR de placa plana	Uniforme	Excelente	Sin	Alta	Alto	Alto	Baja	Justo	Difícil	Escala piloto
Híbridos	Uniforme	Excelente	Regular	Alta	Regular	Alto	Justo	Justo	Fácil	Escala piloto

Tabla 2. Algunos de los productores comerciales de productos a base de microalgas en todo el mundo.

Microalgae	Product	Company	Location	Culture system
<i>H. pluvialis</i> , <i>A. platensis</i>	Astaxantina, Ficocianina	Cyanotech	Hawaii	Tubular, Raceways
<i>H. pluvialis</i>	Astaxantina	Mera Pharmaceuticals	Hawaii	Tubular, Raceways
<i>H. pluvialis</i>	Astaxantina	AstaReal	Suecia	Vertical
<i>H. pluvialis</i>	Astaxantina	Algatechnologies	Israel	Tubular
<i>H. pluvialis</i>	Astaxantina	Beijing Ginkgo Group	China	Tubular
<i>D. salina</i>	β -caroteno	Betatene (BASF)	Australia	Estanques extensos sin mezclar
<i>D. salina</i>	β -caroteno	Western Biotechnology	Australia	Estanques extensos sin mezclar
<i>D. salina</i>	β -caroteno	AquaCaroteno	Australia	Estanques extensos sin mezclar
<i>D. salina</i>	β -caroteno	Cyanotech	Hawaii	Raceways
<i>D. salina</i>	B-caroteno	Nature Beta Technologies	Israel	Raceways
<i>D. salina</i> , <i>Chlorella</i> , <i>A. platensis</i>	β -caroteno, tabletas. aceite de astaxantina, ficocianina	Tianjin Lantai Biotechnologies	China	Raceways
<i>A. platensis</i>	Ficocianina	Zhejiang Binmei Biotechnology	China	Raceways
<i>A. platensis</i>	Ficocianina	Earthrise Farms	Estados Unidos	Raceways
<i>A. platensis</i>	Ficocianina	Parry Nutraceuticals	India	Raceways
-	Ingredientes, biocombustibles, compuestos bioactivos	Algenol	Estados Unidos	Tubular
-	Grasas, biocombustibles, cosméticos y otros	Solazyme	Brszil	Fermentador
-	Grasas, biocombustibles	Cellana	Estados Unidos	Raceways, Tubular
<i>Tetraselmis chui</i> , <i>Spirulina</i> , <i>C. vulgaris</i> .	Fertilizantes, alimentos, piensos	All microalgae	Portugal	Fermentador + Placa plana + Tubular
-	Biodiesel, alimentos, piensos	AlgaEnergy	España	Raceways, Placa plana, Tubular

Conclusiones

Las microalgas han suscitado un gran interés en todo el mundo debido a su enorme aplicación biotecnológica en los diversos campos de los biocombustibles, alimentos y piensos, cosmética, farmacia y remediación medioambiental. Incluso con las importantes mejoras tecnológicas alcanzadas hasta ahora, el establecimiento de procesos basados en microalgas tiene una miríada de cuellos de botella, particularmente en las tecnologías de producción en masa. Los principales inconvenientes están asociados al costo de construcción y operación, el escalamiento, la transferencia de masa y un conocimiento limitado sobre los nuevos sistemas de cultivo. No existe un sistema de cultivo ideal universalmente, y la tecnología ideal aún depende del producto objetivo, las especies de microalgas y las condiciones ambientales.

A menudo se ha informado que los sistemas de cultivo abiertos no se recomiendan para la producción de productos de alto valor agregado. Sin embargo, podemos ver que en términos de la realidad industrial esto no se aplica, ya que los problemas de costos de inversión y mantenimiento son más significativos. Con base en lo discutido, es posible concluir que, en la actualidad, los estanques de *raceways* y los fotobiorreactores tubulares son los únicos sistemas capaces de producir biomasa a escala comercial con posibilidad de aplicación en las regiones del mundo más diversas. Además, es importante enfatizar que los avances recientes en esta área son cruciales para consolidar el mercado de productos a base de microalgas en un futuro próximo.

Referencias

- Abomohra A, Jin W, Tu R, Han S, Eid M, Eladel H (2016) Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: current status and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 64: 596-606. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.056>
- Abu-Ghosh S, Fixler D, Dubinsky Z, Iluz, D (2016) Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresource technology* 203: 357-363. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.057>
- Acíen Fernandes FG, Molina E, Reis A, Torzillo G, Zittelli GC, Sepúlveda C, Masojídek J (2017) Photobioreactors for the production of microalgae. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Gonzalez-Fernandez C, Muñoz E (Eds). Woodhead Publishing, Sawston, UK. pp.1-44.
- Acíen Fernández FG, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E (2019) Costs analysis of microalgae production. In: *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, 2nd Edition. Lee DJ, Pandey A, Chang JS, Chisti Y, Soccol C (Eds). Elsevier, New York, NY. pp.551-566.
- Acíen Fernández FG, Fernández-Sevilla JM, Moya BL, Grima EM (2020) Microalgae production systems. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*. Jacob-Lopes E, Maroneze MM, Zepka LQ, Queiroz MI (Eds). Academic Press. pp. 127-163.
- Assunção J, Malcata FX (2020) Enclosed “non-conventional” photobioreactors for microalga production: A review. *Algal Research* 52: 102107. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102107>
- Ayalon O (Algatechnologies Ltd.) (2014) Astaxanthin derivatives for heat stress prevention and treatment. WO2014057493 A1.
- Barros A, Pereira H, Campos J, Varela J, Silva J (2019) Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae. *Nature Scientific Reports* 9: 13935. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50206-z>
- Belay A (2008) Spirulina (Arthrospira): production and quality assurance. In: *Spirulina in human nutrition and health*. Gershwin ME, Amha EB (Eds) CRC Press, London, UK. pp. 2-23.
- Berstenhorst SM, Hohmann H-P, Stahmann K-P (2009) Vitamins and vitamin-like compounds: microbial production. In: *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd ed. Schaechter M (Ed). Elsevier, New York, NY. pp.549-561.

- Blanken W, Cuaresma M, Wijffels RH, Janssen M (2013) Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Research* 2:333–340. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.004>
- Borowitzka LJ, Borowitzka MA, Moulton T (1984) The mass culture of *Dunaliella* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant. Eleventh International Seaweed Symposium. *Developments in Hydrobiology*, vol 22. Bird C.J., Ragan M.A. (Eds). Springer, Dordrecht. pp.115-121.
- Borowitzka M (2018) Commercial-Scale Production of Microalgae for Bioproducts. In: *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules*. La Barre S, Bates SS (Eds) Wiley, Hoboken, NJ. pp. 33-65.
- Borowitzka MA (1990) The mass culture of *Dunaliella salina*. In: *Technical Resource Papers. Regional Workshop on the Culture and Utilisation of Seaweeds 2. Regional Seafarming Development and Demonstration Project*, FAO Network of Aquaculture Centres in Asia: Bangkok, Thailand. pp. 63-80.
- Borowitzka MA (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70:313-321.
- Brusca S, Famoso F, Lanzafame R, Messina M and Wilson J (2017) A site selection model to identify optimal locations for microalgae biofuel production facilities in Sicily (Italy). *International Journal of Applied Engineering Research* 12: 16058-16067.
- Carvalho AP, Silva SO, Baptista JM, Malcata FX (2011) Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied microbiology and biotechnology* 89(5): 1275-1288. [10.1007/s00253-010-3047-8](https://doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8)
- Chang JS, Show PL, Ling TC, Chen CY, Ho SH, Tan CH, Nagarajan D, Phong WN (2017) Photobioreactors. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls*. Larroche C, Sanroman M, Du G, Pandey A (Eds). Elsevier, New York, NY. pp. 313-352.
- Chaumont D (1993) Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology* 5: 593–604. <https://doi.org/10.1007/BF02184638>
- Chaumont D, Thepenier C, Gudín C (1988) Scaling up a tubular photoreactor for continuous culture of *Porphyridium cruentum* - From laboratory to pilot plant. In: *Algal Biotechnology*. Stadler T, Morillon J, Verdus MC, Karamanos W, Morvan H, Christiaen D (Eds). Elsevier, New York, NY. pp. 199-208.
- Chew KW, Chia SR, Show PL, Yap YJ, Ling TC, Chang JS (2018) Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 91: 332-344. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.039>
- Chisti Y (2009) Mass transfer. In: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. Flickinger MC (Ed). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp.1-38.
- Chisti Y, Jauregui-Haza UJ (2002) Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 10: 143-153. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00174-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00174-7)
- Chisti, Y (2016) Large-scale production of algal biomass: Raceway ponds. In: *Algae Biotechnology: Products and Processes*. Bux F, Chisti Y. (Eds). Springer, New York, pp. 21-40.
- Daneshvar E, Ok YS, Tavakoli S, Sarkar B, Shaheen SM, Hong H, Bhatnagar A (2021) Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresource Technology* 329: 124870. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870>
- Del Campo, J. A., García-González, M., & Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 74, 1163-1174. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.019>

- Delrue F, Alaux E, Moudjaoui L, Gaignard C, Fleury G, Perilhou A, Sassi JF (2017) Optimization of *Arthrospira platensis* (Spirulina) Growth: From Laboratory Scale to Pilot Scale. *Fermentation* 3: 59. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040059>
- Deprá MC, Mérida LG, de Menezes CR, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2019) A new hybrid photobioreactor design for microalgae culture. *Chemical Engineering Research and Design* 144: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.01.023>
- Dias RR, Lasta, P, Vendruscolo RG, Wagner R, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2020) Mapping the performance of photobioreactors for microalgae cultivation. Part II: equatorial and tropical climate zone. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 96: 613-621. <https://doi.org/10.1002/jctb.6574>
- Ende SSW, Noke A (2019) Heterotrophic microalgae production on food waste and by-products. *Journal of Applied Phycology* 31: 1565-1571. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1697-6>
- Enzing C, Sijtsma L, Parisi C, Viganì M, Barbosa M, Ploeg M, Rodrigues Cerezo E (2014) Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. European Commission, Luxembourg.
- Estrada-Graf A, Hernández S, Morales M (2020) Biomitigation of CO₂ from flue gas by *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM using a hybrid photobioreactor coupled to a biomass recovery stage by electro-coagulation-flotation. *Environmental Science and Pollution Research* 27: 28561-28574. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08240-2>
- Eustance E, Lai YJS, Shesh T, Rittmann BE (2020) Improved CO₂ utilization efficiency using membrane carbonation in outdoor raceways. *Algal Research* 51: 102070. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102070>
- Falk S, Maxwell DP, Laudenbach DE, Huner NP (1996) Photosynthetic adjustment to temperature. In *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 5. Baker NR (Ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 367-383.
- Faried M, Samer M, Abdelsalam E, Yousef RS, Attia YA, Ali AS (2017) Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent Advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 79: 893-913. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.199>
- Fernandez FGA, Sevilla JMF, Grima EM (2013) Photobioreactors for the production of microalgae. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12: 131-151. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9307-6>
- Fetanat A, Tayebi M, Mofid H (2021) Water-energy-food security nexus based selection of energy recovery from wastewater treatment technologies: An extended decision making framework under intuitionistic fuzzy environment. *Sustainable Energy Technologies and Assessments* 43: 100937. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2020.100937>
- Francisco EC, Franco TT, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2015) From waste-to-energy: The process integration and intensification for bulk oil and biodiesel production by microalgae. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 3: 482-487. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.12.017>
- Fu J, Huang Y, Liao Q, Xia A, Fu Q, Zhu X (2019) Photo-bioreactor design for microalgae: a review from the aspect of CO₂ transfer and conversion. *Bioresource technology* 292: 121947. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121947>
- García-González M, Moreno J, Canavate J, Anguis V, Prieto A, Manzano C, Florencio FJ, Guerrero MG (2003) Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of Applied Phycology* 15: 177-184.
- García-Mañas F, Guzmán JL, Berenguel M, Acien FG (2019) Biomass estimation of an industrial raceway photobioreactor using an extended Kalman filter and a dynamic model for microalgae production. *Algal Research* 37: 103-114. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.009>

- Griffiths DJ, Thresher CL, Street HE (1960) The heterotrophic nutrition of *Chlorella vulgaris* (brannon no. 1 strain). *Annals of Botany* 24: 1-11. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083682>
- Gudin C, Chaumont D (1983) Solar biotechnology study and development of tubular solar reactors for controlled production of photosynthetic cellular biomass. In: *Proceedings of the Workshop and E.C. Contractor's Meeting in Capri*. Palz, W., Pirwitz, D. (Eds). D. Reidel Publishing Co., Dordrecht, pp.184-193.
- Hamed I (2016) The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15: 1104-1123. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12227>
- Harmelen TV, Oonk H (2006) Microalgae biofixation processes: applications and potential contributions to greenhouse gas mitigation options. In: *International network on biofixation of CO₂ and greenhouse gas abatement with microalgae operated under the international energy agency greenhouse gas R&D programme*. Apeldoorn, The Netherlands.
- Holdmann C, Schmid-Staiger U, Hirth T (2019) Outdoor microalgae cultivation at different biomass concentrations — Assessment of different daily and seasonal light scenarios by modeling. *Algal Research* 38: 101405-102413. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101405>
- Huang JJ, Lin S, Xu W, Cheung PCK (2017) Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. *Biotechnology advances* 35: 597-618. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.001>
- Inostroza C, Solimeno A, García J, Fernández-Sevilla JM, Acién FG (2021) Improvement of real-scale raceway bioreactors for microalgae production using Computational Fluid Dynamics (CFD). *Algal Research* 54: 102207. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102207>
- Jareonsin S, Pumas C (2021) Advantages of Heterotrophic Microalgae as a Host for Phytochemicals Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9: 628597. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.628597>
- Jesus SS, Neto JM, Filho RM (2017) Hydrodynamics and mass transfer in bubble column, conventional airlift, stirred airlift and stirred tank bioreactors, using viscous fluid: a comparative study. *Biochemical engineering journal* 118: 70-81.
- Jossen V, Eibl R, Pörtner R, Kraume M, Eibl D (2017) Stirred Bioreactors. In: *Current State and Developments, With Special Emphasis on Biopharmaceutical Production Processes*. Larroche C, Sanromán MA, Du G, Pandey A (Eds). Elsevier, New York, NY. pp. 179-215.
- Katiyar R, Gurjar BR, Bharti RK, Kumar A, Biswas S, Pruthi V (2017) Heterotrophic cultivation of microalgae in photobioreactor using low cost crude glycerol for enhanced biodiesel production. *Renewable Energy* 113: 1359-1365. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.100>
- Kazbar A, Cogne G, Urbain B, Marec H, Le-Gouic B, Tallec J, Pruvost J (2019) Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Research* 39: 101432. [doi:10.1016/j.algal.2019.101432](https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101432)
- 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: 1-21. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kirnev PCS, Carvalh JC, Vandenberghe LPS, Karp SG, Soccol CR (2020) Technological mapping and trends in photobioreactors for the production of microalgae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36: 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02819-0>

- Kitaya Y, Xiao L, Masuda A, Ozawa T, Tsuda M, Omasa K (2008) Effects of temperature, photosynthetic photon flux density, photoperiod and O₂ and CO₂ concentrations on growth rates of the symbiotic dinoflagellate, *Amphidinium* sp.. In: Nineteenth International Seaweed Symposium. Developments in Applied Phycology, vol 2. Borowitzka MA, Critchley AT, Kraan S, Peters A, Sjøtun K, Notoya M (Eds). Springer, Dordrecht, pp.287-292.
- Koller M (2015) Design of Closed Photobioreactors for Algal Cultivation. In: Algal biorefineries volume 2: Products and refinery design. Prokop A, Bajpai RK, Zappi ME (Eds.). Springer International Publishing, Switzerland, pp.139-186.
- Kotzen B., Emerenciano MGC, Moheimani N, Burnell GM (2019) Aquaponics: Alternative Types and Approaches. In: Aquaponics Food Production Systems. Goddek S, Joyce A, Kotzen B, Burnell G. (Eds). Springer International Publishing, Switzerland, pp.301–330.
- Kumar K, Dasgupta CN, Nayak BK, Lindblad P, Das D (2011) Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology* 102: 4945-53. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.054>
- Kumar K, Mishra SK, Shrivastav A, Park MS, Yang JW (2015) Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 51: 875-885. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.033>
- Kwan PP, Banerjee S, Shariff M, Yusoff F (2020) Influence of light on biomass and lipid production in microalgae cultivation. *Aquaculture Research* 52: 1337–1347. <https://doi.org/10.1111/are.15023>
- Leone G, De la Cruz Valbuena G, Cicco SR, et al. (2021) Incorporating a molecular antenna in diatom microalgae cells enhances photosynthesis. *Scientific Reports* 11: 5209. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84690-z>
- Maroneze MM, Barin JS, Menezes CR, Queiroz MI, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2014) Treatment of cattle-slaughterhouse wastewater and the reuse of sludge for biodiesel production by microalgal heterotrophic bioreactors. *Scientia Agricola* 71: 521-524. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0092>
- Maroneze MM, Deprá MC, Zepka LQ, Jacob-Lopes, E (2019) Artificial lighting strategies in photobioreactors for bioenergy production by *Scenedesmus obliquus* CPCC05. *SN Applied Sciences* 1: 1-12. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1761-0>
- Maroneze MM, Dias RR, Severo IA, Queiroz MI (2020) Microalgae-Based Processes for Pigments Production. In *Pigments from Microalgae Handbook*. Jacob-Lopes E, Zepka LQ, Queiroz MI (Eds). Springer International Publishing, Switzerland, pp. 241-264.
- Maroneze MM, Queiroz MI (2018) Microalgal Production Systems with Highlights of Bioenergy Production. In: *Energy from Microalgae*. Jacob-Lopes E, Zepka LQ, Queiroz MI (Eds). Springer International Publishing, Switzerland, pp. 5-34.
- Maroneze MM, Siqueira SF, Vendruscolo RG, Wagner R, Menezes CR, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2016) The role of photoperiods on photobioreactors – A potential strategy to reduce costs. *Bioresource Technology* 219: 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.003>
- Martín-Girela I, Curt MD, Fernández J (2017) Flashing light effects on CO₂ absorption by microalgae grown on a biofilm photobioreactor. *Algal research* 25: 421-430. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.06.008>
- Mendoza JK, Granados MR, Godos I, Ación FG, Molina E, Heaven S, Banks CJ (2013) Oxygen transfer and evolution in microalgal culture in open raceways *Bioresource Technology* 137: 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.127>

- Mirón AS, Gómez AC, Camacho FG, Grima EM, Chisti Y (1999) Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology* 70: 249-270. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00079-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00079-6)
- Moheimani NR, Borowitzka MA (2006) The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. *Journal of Applied Phycology* 18: 703-712. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9075-1>
- Molina Grima E (2009) Algae biomass in Spain: a case study. First European Algae Biomass Association conference & general assembly, Florence, Italy.
- Neves C, Maroneze MM, Santos AMD, Francisco EC, Wagner R, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2016) Cassava processing wastewater as a platform for third generation biodiesel production. *Scientia Agricola* 73: 412-416. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0302>
- Norsker NH, Barbosa MJ, Vermuë MH, Wijffels RH (2011) Microalgal production-A close look at the economics. *Biotechnology Advances* 29: 24-27. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>
- Olaizola M (2000) Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000 liter outdoor photobioreactors. *Journal of Applied Phycology* 12: 499-506. <https://doi.org/10.1023/A:1008159127672>
- Olguín EJ, Galicia S, Mercado G, Pérez T (2003) Annual productivity of *Spirulina* (Arthrospira) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology* 15: 249-257. <https://doi.org/10.1023/A:1023856702544>
- Patel AK, Choi YY, Sim SJ (2020) Emerging prospects of mixotrophic microalgae: Way forward to sustainable bioprocess for environmental remediation and cost-effective biofuels. *Bioresource technology*, 300: 122741. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122741>
- Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*.45: 11-36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Pirt SJ, Lee YK, Walach MR, Pirt MW, Balyuzi HHM, Bazin MJ (1983) A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 33: 35-58.
- Pleissner D, Smetana S (2020) Estimation of the economy of heterotrophic microalgae-and insect-based food waste utilization processes. *Waste Management* 102: 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.10.031>
- Pleissner, D., Lam, W. C., Sun, Z., & Lin, C. S. K. (2013). Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation. *Bioresource technology*, 137, 139-146.
- Queiroz MI, Maroneze MM, Manetti AGDS, Vieira JG, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2018) Enhanced single-cell oil production by cold shock in cyanobacterial cultures. *Ciência Rural* 48: 1-8. [10.1590/0103-8478cr20180366](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180366)
- Ramírez-Mérida LGR, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2017) Current Production of Microalgae at Industrial Scale. In: *Recent Advances in Renewable Energy*. Pires JCM (Ed.). Bentham Science Publishers, Sharjah, pp. 242-260.
- Ras M, Steyer JP and Bernard O (2013) Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12: 153-164. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>
- Raso S, Genugten BV, Vermuë M, Wijffels RH (2012) Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity. *Journal of Applied Phycology* 24: 863-871. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9706-z>

- Rastogi RP, Madamwar D, Nakamoto H, Incharoensakdi A (2019) Resilience and self-regulation processes of microalgae under UV radiation stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 43: 100322. doi:10.1016/j.jphotochemrev.2019.100322
- Reyna-Velarde R, Cristiani-Urbina E, Hernández-Melchor DJ, Thalasso F, Cañizares-Villanueva RO (2010) Hydrodynamic and mass transfer characterization of a flat-panel airlift photobioreactor with high light path. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 49: 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.11.014>
- Richmond A (1990) Large scale microalgal culture and applications. In: *Progress in Phycological Research*. Round FE, Chapman DJ (Eds). Biopress Ltd, Britol, pp.269-330.
- Richmond A, Boussiba A, Vonshak A, Kopel R (1993) A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *Journal of Applied Phycology* 5: 327-332. <https://doi.org/10.1007/BF02186235>
- Ryu KH, Lee JY, Heo S, Lee J (2019) Improved microalgae production by using a heat supplied open raceway pond. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 21: 9099-9108. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00986>
- Schipper K, Das P, Al Muraikhi M, AbdulQuadir M, Thaher MI, Al Jabri HMS, Wiffels RH Barbosa MJ (2021) Outdoor scale-up of *Leptolyngbya* sp.: Effect of light intensity and inoculum volume on photoinhibition and-oxidation. *Biotechnology and Bioengineering*. 118: 2368-2379. <https://doi.org/10.1002/bit.27750>
- Singh RN, Sharma S (2012) Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16: 2347-2353. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>
- Siqueira SF, Maroneze MM, Dias RR, Vendruscolo RG, Wagner R, de Menezes CR, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2020) Mapping the performance of photobioreactors for microalgae cultivation: geographic position and local climate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 95: 2411-2420. <https://doi.org/10.1002/jctb.6423>
- Sirikulrat K, Jeeraporn P, Pumas C (2021) Illumination system for growth and net energy ratio enhancement of *Arthrospira* (*Spirulina*) platensis outdoor cultivation in deep raceway pond. *Bioresource Technology Reports* 14: 100661. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100661>
- Slade R, Bauen A (2013) Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and bioenergy*, 53, 29-38. Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects
- Soman A, Shastri Y (2015) Optimization of novel photobioreactor design using computational fluid dynamics. *Applied Energy* 140: 246-255. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.11.072>
- Soni RA, Sudhakar K, Rana RS (2017) *Spirulina* – from growth to nutritional product: a review. *Trends in Food Science & Technology* 69: 157-171. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>
- Sousa, C., Compadre, A., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2013). Effect of oxygen at low and high light intensities on the growth of *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research*, 2(2), 122-126. doi:10.1016/j.algal.2013.01.007
- Speranza LG, Ingram A and Leeke GA, Assessment of algae biodiesel viability based on the area requirement in the European Union, United States and Brazil. *Renew Energy* 78:406-417 (2015).

- Tamiya H, Hase E, Shibata K, Mituya A, Iwamura T, Nihei T, Sasa T (1953) Kinetics of growth of *Chlorella*, with special reference to its dependence on quantity of available light and on temperature. In: *Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant*. Burlew JS (Ed).. Carnegie Institution of Washington, Washington DC, pp. 204-232.
- Tang DYY, Khoo KS, Chew KW, Tao Y, Ho SH, Show PL (2020) Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. *Bioresource technology* 304: 122997. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122997>
- Torzillo G, Chini Zittelli G (2015) Tubular Photobioreactors. In: *Algal biorefineries volume 2: Products and refinery design*. Prokop A, Bajpai RK, Zappi ME (Eds.). Springer International Publishing, Switzerland, pp.187-212.
- Transparency Market Research. (2018). *Algae Market (Cultivation Technology: Open Ponds Cultivation Technology, Raceway Ponds Cultivation Technology, Closed Photo bioreactor Cultivation Technology, and Closed Fermenter Systems Cultivation Technology; Application: Marine Sector, Aviation Sector, Road Transport, DHA Production (Protein Sales), DHA Production (Pharmaceutical Applications), Bioplastics, and Others) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast, 2019 – 2027*.
- Trediti MR (2004) Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Richmond A. (Ed). Wiley, Hoboken, NJ. pp.178-214.
- Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99: 4021-4028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>
- Uyar B, Kapucu N (2015) Passive temperature control of an outdoor photobioreactor by phase change materials. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 90: 915-920. <https://doi.org/10.1002/jctb.4398>
- Waltz E (2009) Biotech's green gold? *Nature Biotechnology* 27: 15-18. <https://doi.org/10.1038/nbt0109-15>
- Wibisono Y, Agung Nugroho W, Akbar Devianto L, Adi Sulianto A, Roil Bilad M (2019) Microalgae in food-energy-water nexus: A review on progress of forward osmosis applications. *Membranes* 9: 166. <https://doi.org/10.3390/membranes9120166>
- Xiong W, Li X, Xiang J, Wu Q (2008) High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbial-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78: 29-36. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1285-1>
- Xu J, Cheng J, Xin K, Xu J, Yang W (2020) Strengthening flash light effect with a pond-tubular hybrid photobioreactor to improve microalgal biomass yield. *Bioresource Technology* 318: 124079. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124079>
- Yen, H.-W., Hu, I.-C., Chen, C.-Y., Nagarajan, D., & Chang, J.-S. (2019). Design of photobioreactors for algal cultivation. In: Pandey, A. (Ed). *Biofuels from Algae*, pp. 225–256.
- Yin Z, Zhu L, Li S, Hu T, Chu R, Mo F, Li B (2020) A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresource technology* 301: 122804. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804>
- Zhan J, Rong J, Wan Q (2017) Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy* 42: 8505–8517. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.12.021
- Zitelli GC, Rodolfi L, Bassi N, Biondi N, Tredici MR (2013) Photobioreactors for biofuel production. In: *Algae for biofuels and energy*. Borowitzka MA, Moheimani NR (Eds.). Springer International Publishing, Switzerland, pp.115-131.

Pigmentos en microalgas: funciones, aplicaciones y técnicas de sobreproducción

Francisco Vera-López Portillo*, Alfredo Martínez Jiménez

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México.

francisco.vera@ibt.unam.mx

Resumen

Los carotenoides, ficobiliproteínas y clorofila se utilizan como pigmentos “naturales”, además, debido a sus propiedades antioxidantes, son considerados agentes nutraceuticos. La utilización de microalgas para la obtención de pigmentos ha generado amplio interés debido a que existe un gran número de microalgas, entre ellas despliegan diversidad metabólica y pueden crecer en diferentes condiciones ambientales. Además, en comparación con plantas superiores, presentan velocidades de crecimiento y contenido de pigmentos altos. No obstante, las concentraciones obtenidas en su mayoría son menores del 5% (p/p) en peso seco de microalgas, lo cual hace que su producción sea económicamente poco factible en comparación con los colorantes sintéticos. En esta revisión se examinan las funciones que juegan estos pigmentos en la captación de luz y en su capacidad fotoprotectora en las microalgas; se describen los procesos de biosíntesis de estos pigmentos y se revisan investigaciones realizadas para incrementar la concentración de pigmentos evaluando parámetros de cultivo, tales como: intensidad de luz, longitud de onda, estrés oxidativo, y composición del medio de cultivo, entre otros. Con base en estos puntos, se evalúan las limitaciones y estrategias para mejorar la producción de los pigmentos en cultivos heterotróficos y autotróficos.

Palabras clave: Arrecifes, Carotenoides, ficobiliproteínas, microalgas.

Abstract

Carotenoids, phycobiliproteins, and chlorophyll are used as natural pigments, in addition, due to their antioxidant properties, they are considered nutraceutical agents. Because the metabolic diversity, the use of microalgae to obtain pigments has generated wide interest. In addition, compared to higher plants, many microalgae have high specific growth rates and a high specific pigment content. However, the pigment concentrations range, from 0.5 to 5 % (w/w) dry weight, restricts the economic feasibility to produce them at commercial scale. In this review, the functions that these pigments have in the process of capturing light and their role in their photoprotective capacity in microalgae, are examined. The biosynthetic process that generates these pigments are discussed. Also, the studies carried out to increase the concentration of pigments by modifying the cultivation parameters, such as wavelength, light intensity, oxidative stress, and the composition of the culture medium, among others, are reviewed. On the basis of this review, the limitations and strategies to improve the overproduction of pigments, in heterotrophic and autotrophic cultures, is evaluated.

Key words: Carotenoids, phycobiliproteins, microalgae.

Introducción

Actualmente la producción de pigmentos naturales ha cobrado un gran interés en diferentes industrias como la textil, cosmética, farmacéutica y alimentaria, entre otras. Esto debido a que se ha asociado el uso de colorantes artificiales en alimentos con enfermedades, tales como el trastorno de déficit de atención e hiperactividad (Mulders et al., 2014). Así mismo, se ha demostrado que algunos colorantes naturales, entre ellos los carotenoides y las ficobiliproteínas, presentan efectos preventivos para algunas enfermedades como: diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares (De Mejia et al., 2020).

Los pigmentos naturales se extraen generalmente de insectos, frutas, verduras, semillas, raíces y microorganismos, estos colorantes son denominados "biocolorantes" debido a su origen biológico (De Carvalho et al., 2014; Tuli et al., 2015). Algunos ejemplos de biocolorantes extraídos de plantas y microorganismos se presentan en la tabla 1.

Debido a su uso seguro en alimentos y prevención de problemas de salud, aunado a su naturaleza ecológica, el uso de estos pigmentos ha tomado una gran importancia en la actualidad. Sin embargo, con el fin de obtener biocolorantes con precios competitivos, en comparación con los pigmentos obtenidos de recursos fósiles, se

Tabla 1. Pigmentos obtenidos de organismos.

Origen	Pigmento	Color
Plantas		
Aceite de palma	Mezcla de carotenoides	Amarillo a anaranjado
Achiote	Bixina	Anaranjado
Ají	Capsantina	Rojo-anaranjado
Betabel	Betanina	Rosa-rojo
Caléndula	Luteína	Amarillo dorado
Col morada	Antocianina	Rojo-purpura
Cúrcuma	Cucumina	Amarillo brillante
Ortiga	Clorofila	Verde olivo
Pasto	Clorofila	Verde olivo
Tomate	licopenos	Rojo
Microorganismos		
<i>Flavobacterium</i> spp. (bacteria)	Zeaxantina	Amarillo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (bacteria)	Ficocianina	Azul
<i>Serratia marcescens</i> (bacteria)	Prodigiosina	Rojo
<i>Staphylococcus aureus</i> (bacteria)	Zeaxantina	Amarillo
<i>Monascus purpureus</i> (levadura)	Monascorubramina	Amarillo-rojo
<i>Phaffia rhodozyma</i> (levadura)	Astaxantina	Rojo
Blakesela trispora (hongo)	Licopenos	Rojo
<i>Arthrospira platensis</i> (cianobacteria)	Ficocianina	Azul
<i>Dunaliella salina</i> (microalga)	β -caroteno	amarillo
<i>Galdieria sulphuraria</i> (microalga)	Ficocianina	Azul
<i>Haematococcus pluvialis</i> (microalga)	Astaxantina	Rojo
<i>Rhodomonas</i> sp (microalgas)	Clorofila	Verde olivo
<i>Scenedesmus</i> sp (microoaga)	Luteína	Amarillo dorado

Artículos

requiere mejorar las técnicas de producción de estos colorantes. El proceso de producción puede dividirse en: cultivo y cosecha de los organismos y en la recuperación de producción de estos colorantes. El proceso de producción puede dividirse en: cultivo y cosecha de los organismos y en la recuperación comparación con los pigmentos obtenidos de recursos fósiles, se requiere mejorar las técnicas de producción de estos colorantes. El proceso de producción puede dividirse en: cultivo y cosecha de los organismos y en la recuperación y purificación de los pigmentos. Para mejorar los procesos previamente mencionados es necesario conocer el proceso de biosíntesis y de degradación de estos pigmentos en los organismos que los producen, con el fin de regular su metabolismo y así poder obtener mejores rendimientos. Una vez lograda una alta productividad de los pigmentos es deseable conocer sus propiedades fisicoquímicas para garantizar procesos de extracción y purificación eficientes y de bajo costo.

Dentro de los microorganismos que producen pigmentos se encuentran las cianobacterias y las microalgas. Los cuales presentan una gran variedad de colorantes. La

principal función de los pigmentos en estos microorganismos es la absorción de energía a diferentes longitudes de onda presentes en el espectro de luz visible (figura 1). Los principales pigmentos fotosintéticos encontrados en estos microorganismos son: la clorofila, las ficobiliproteínas y los carotenos (figura 2). Cada uno de estos presenta un rango de absorción específico, siendo diferente inclusive entre pigmentos del mismo grupo (tabla 2).

El uso de microalgas para la producción de pigmentos presenta como principales ventajas: (1) amplia gama de pigmentos, (2) rápido crecimiento en comparación con plantas superiores, (3) las concentraciones de pigmentos pueden ser superiores a los encontrados en plantas superiores y, (4) facilidad de cultivos (Mulders et al., 2014).

El objetivo de este trabajo es identificar las oportunidades y restricciones en la producción de pigmentos con microalgas: conociendo la estructura y propiedades de los colorantes, las rutas de biosíntesis de estos, identificar las funciones secundarias dentro de las microalgas, y detallar las estrategias de producción de estos biocolorantes.

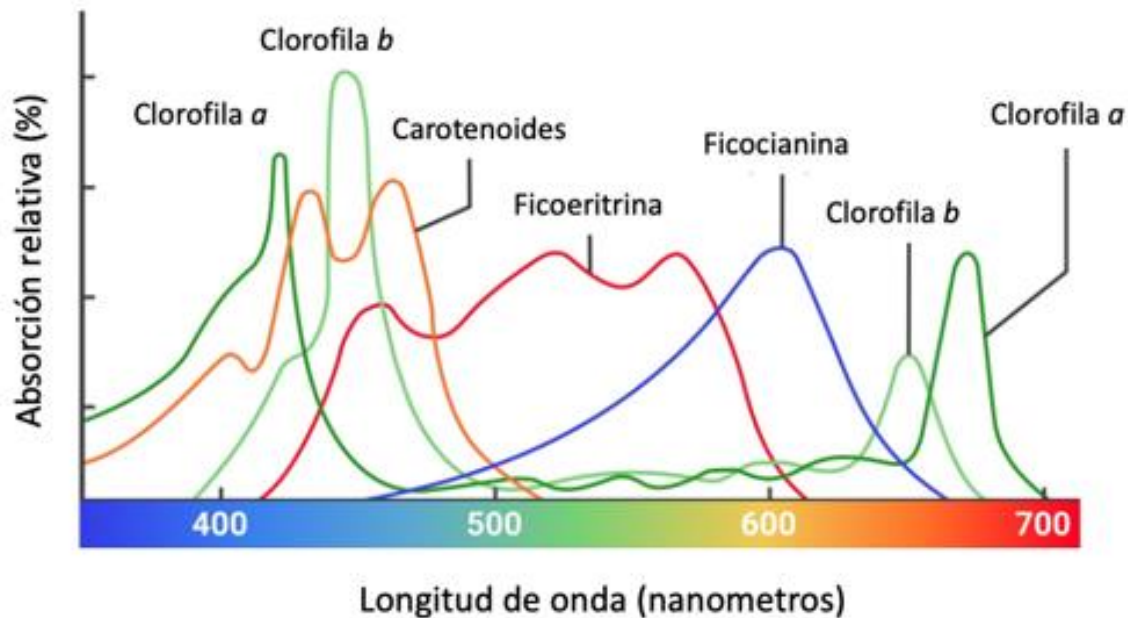


Figura 1. Espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticos.

Modificado de <https://www.circuitbread.com/ee-faq/how-are-leds-used-for-growing-plants> (agosto 2021)








Figura 2. Principales colorantes obtenidos de las microalgas. Figura de autoría propia.

<http://www.natureontheshelf.com> (junio 2021 - Clorofila)

<http://www.plantbased-powder.com> (junio 2021 - Beta-caroteno)

Tabla 2. Principales pigmentos encontrados en microalgas.

Pigmento	Compuesto	Absorción (λ_{max})	Color
<u>Ficobiliproteínas</u>	<u>Aloficocianina B</u>	671 nm	
	<u>Aloficocianina A</u>	650 nm	
	<u>Ficocianina</u>	620 nm	
	<u>Ficoeritrina</u>	500 - 580 nm	
	<u>Ficoeritrocianina</u>	568 nm	
Clorofila	Clorofila <i>a</i>	663 nm	
	Clorofila <i>b</i>	652 nm	
Carotenoides	B caroteno	455 nm	
	<u>Fucoxantina</u>	490 nm	
	Luteína	445 nm	
	<u>Astaxantina</u>	482 nm	

Estructura de los pigmentos

Clorofila

Existen dos tipos principales de clorofila, clorofila *a* y *b*, siendo la clorofila *b* la más estable. Además, debido a reacciones de la clorofila *a*, derivadas de la influencia del pH, oxígeno e intensidad luminosa, entre otros, se generaron productos de degradación (Halim et al., 2010).

La clorofila está conformada por dos estructuras químicas: un anillo tetra pirrol y una cadena fitol (alcohol diterpénico) (figura 3A). La molécula central del anillo tetra pirrol es un ion magnesio (Mg^{2+}), el cual se

encuentra rodeado de 4 átomos de nitrógeno contenidos en una estructura denominada anillo porfirínico. Este anillo se encuentra unido a una cadena larga hidrogenada, conocida como cadena fitol. La diferencia entre los sustituyentes, tanto del anillo porfirínico como de la cola fitol, son las que dan lugar a los diferentes tipos de clorofila. Estas diferencias provocan que cada clorofila tenga una absorbancia máxima característica. La clorofila *b* presenta una absorbancia máxima en el rango de 660 a 665 nm (pigmento verde-azul) mientras que la clorofila *a* presenta una absorbancia máxima de 642 a 652 nm (pigmento verde-amarillo) (Halim et al., 2010; Mass et al., 2011).

Carotenoides

Los carotenoides comprenden más de 700 pigmentos liposolubles que presentan absorbancia en el rango de 400 a 550 nm lo que les confiere coloraciones de rojo, naranja y amarillo brillante. La mayoría de los carotenoides son hidrocarburos que contienen 40 átomos de carbono y dos anillos terminales. Los carotenoides tienen como unidad a los isoprenos y en su mayoría son tetraterpenoides (C₄₀ ó 8 unidades de isoprenoides), estos se encuentran en una molécula lineal y simétrica. El sistema de dobles enlaces conjugados les confiere una alta reactividad química, por lo cual se pueden isomerizar y oxidar fácilmente (Mezzomo & Ferreira, 2016). Su estructura básica se puede modificarse mediante hidrogenación, deshidrogenación, ciclación y oxidación.

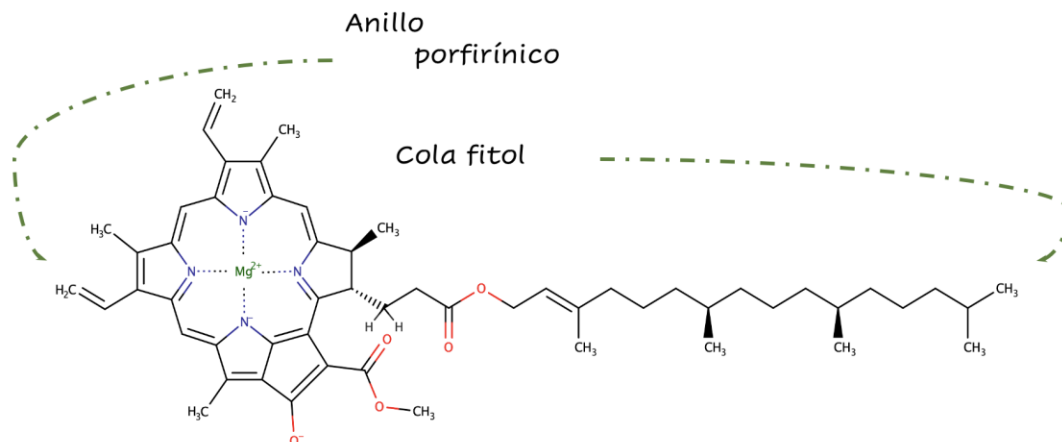
En la naturaleza se encuentran dos clases de carotenoides (figura 3B): (1) los carotenos, que consisten en hidrocarburos lineales que pueden ciclarse en un extremo o en ambos extremos de la molécula, su principal representante es el β -caroteno, y (2) las xantofilas, las cuales son derivados oxigenados de carotenos, siendo su principal representante la luteína (Hu et al., 2018). Su función dentro de la célula depende de su localización, ya que si se encuentran cerca del centro de reacción, su principal función será en el proceso de transferencia de energía; no obstante, si se encuentran embebidos en membranas o en otros compartimentos, debido a que son compuestos anfipáticos, su

principal función es la de proteger a la célula de la oxidación, esto debido a su propiedad antioxidante (Mulders et al., 2014).

Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas (FBP) son proteínas pigmentadas que se encuentran presentes en cianobacterias y algas rojas. Estas proteínas se encuentran formadas por dos unidades (figura 3C): una proteica y un pigmento denominado ficobilina. Dichas unidades se encuentran unidas mediante enlace covalente a un aminoácido cisteína. La ficobilina está compuesta por grupos prostéticos tetrapirrólicos, estos, al presentar enlaces dobles y sencillos alternados (sistema conjugado), pueden deslocalizar electrones como consecuencia de una excitación luminosa a una determinada longitud de onda (Mulders et al., 2014). Las ficobiliproteínas absorben luz en el rango verde y rojo-naranja, lo cual permite que los microorganismos que las poseen puedan realizar la fotosíntesis dentro de aguas profundas; donde sólo la luz verde penetra (Tandeau De Marsac, 2003). Actualmente se conocen diferentes tipos de FBP, las cuales se clasifican con base en la longitud de onda en la que absorben: aloficocianina B (λ_{\max} 671 nm;), aloficocianina A (λ_{\max} 650 nm; azul claro), ficocianina (λ_{\max} 620 nm; azul), ficoeritrina (λ_{\max} 500-580 nm; rojo) y ficoeritrocianina (λ_{\max} 568 nm) (Bryant et al., 1979). Las diferencias entre las longitudes de absorción de las diferentes FBP se debe a pequeñas diferencias presentes en la proteína y en las estructuras de la ficobilina.

A) Clorofila A:



B) Carotenoides:

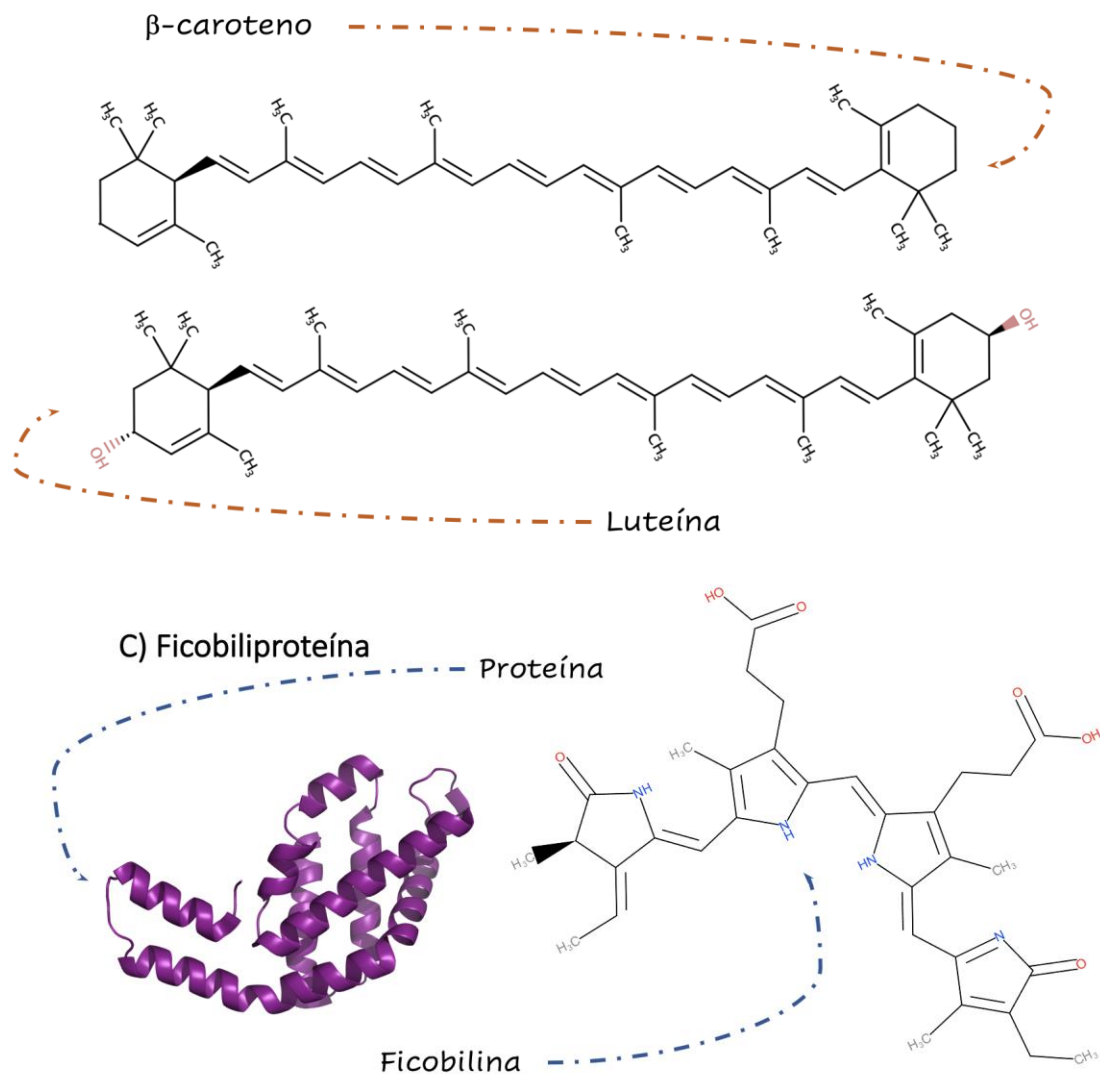


Figura 3.- Estructuras moleculares de los principales pigmentos encontrados en microalgas y cianobacterias. A) Clorofila a, B) Carotenoides y C) Ficobiliproteína.

Biosíntesis de los pigmentos

Las microalgas requieren de la energía luminosa, el dióxido de carbono y, a través de la fotosíntesis y el Ciclo de Calvin-Benson, producir glucosa para crecer. Sin embargo, para sintetizar las macromoléculas se requieren otros componentes: fuentes de nitrógeno (nitratos, nitritos, amonio y/o urea), de fosfatos y de carbono (CO_2), entre otros elementos. A partir de estos componentes las microalgas sintetizan las macromoléculas y los compuestos

requeridos para su crecimiento y supervivencia, y, como se discutirá más adelante, estos nutrientes pueden ser factores para modificar la distribución de las biomoléculas en las células incluyendo la formación de pigmentos.

Específicamente, para la síntesis de los pigmentos se conocen las vías de síntesis en plantas y algunas cianobacterias. Para la biosíntesis de la clorofila se parte de dos vías diferentes: la formación del anillo porfirínico y

la cadena fitol, para su posterior unión. La formación del anillo porfirínico se lleva a cabo en el cloroplasto (células eucariotas), y se inicia por la formación del ácido 5-aminolevulínico (ALA). La formación de este compuesto puede partir por dos vías, una es mediante la condensación de una glicina y del tioéster succinil-CoA, mientras que la otra vía consta de tres pasos partiendo del aminoácido glutamato (vía C5). La primera vía es utilizada por animales, levadura y bacterias, mientras que la vía C5 es característica de plantas superiores y cianobacterias. Partiendo del ALA se llevan a cabo reacciones de condensación, oxidación y reducción hasta dar lugar a la protoporfirina IX (figura 3A), la cual, por un proceso de quelación, integra al ion Mg^{2+} , posteriormente el grupo fitil es incorporado al anillo para dar lugar a la clorofila (figura 4A). Finalmente, las moléculas de clorofila son unidas de forma no covalente a proteínas presentes en la membrana fotosintética (Halim et al., 2010; Von Wettstein et al., 1995).

La producción de las ficobiliproteínas se realiza mediante la condensación de dos estructuras: una holoproteína y de 1 a 3 ficobilinas. La biosíntesis de la ficobilina comienza con el grupo hemo el cual, por medio de la enzima hemo-oxigenasa, conduce a la conversión del cromóforo biliverdina. Una vez formada la molécula lineal, oxigenasas específicas derivan esta molécula a las diferentes ficobilinas (figura 4A), para posteriormente ser integradas covalentemente a las holoproteínas (específicas de cada ficobiliproteína), mediante enzimas denominadas bilin-liasas (Kannaujiya et al., 2017).

Los carotenoides son una subclase de los terpenoides y para su biosíntesis comparten una molécula inicial de 5 carbonos denominada pirofosfato de isopentenilo (IPP). La síntesis del IPP deriva de dos posibles vías: 1) vía del mevalonato (MVA) la cual inicia por la condensación de dos moléculas de acetil-CoA y 2) vía del 2-C-metileritrol 4-fosfato (MEP o vía no-mevalonato), la cual inicia por condensación de una molécula de piruvato y una de gliceraldehido 3-fosfato. La mayoría de las cianobacterias utilizan exclusivamente la vía MEP, mientras que la mayoría de eucariotas y arqueas poseen sólo la vía MVA (Zhang, 2018).

Una vez generado el IPP, se llevan a cabo una serie de condensaciones hasta llegar a una molécula de 40 carbonos denominada fitoeno (caroteno incoloro), a partir de este compuesto se forman los carotenoides y, mediante reacciones de oxigenación de estos, deriva la formación de las xantofilas (figura 4B). Conocer el cómo son sintetizados estos compuestos proporciona indicios de los nutrientes, genes y proteínas que se podrían modificar, para que la vía de síntesis no se vea comprometida y conlleve a un aumento en la acumulación de los pigmentos.

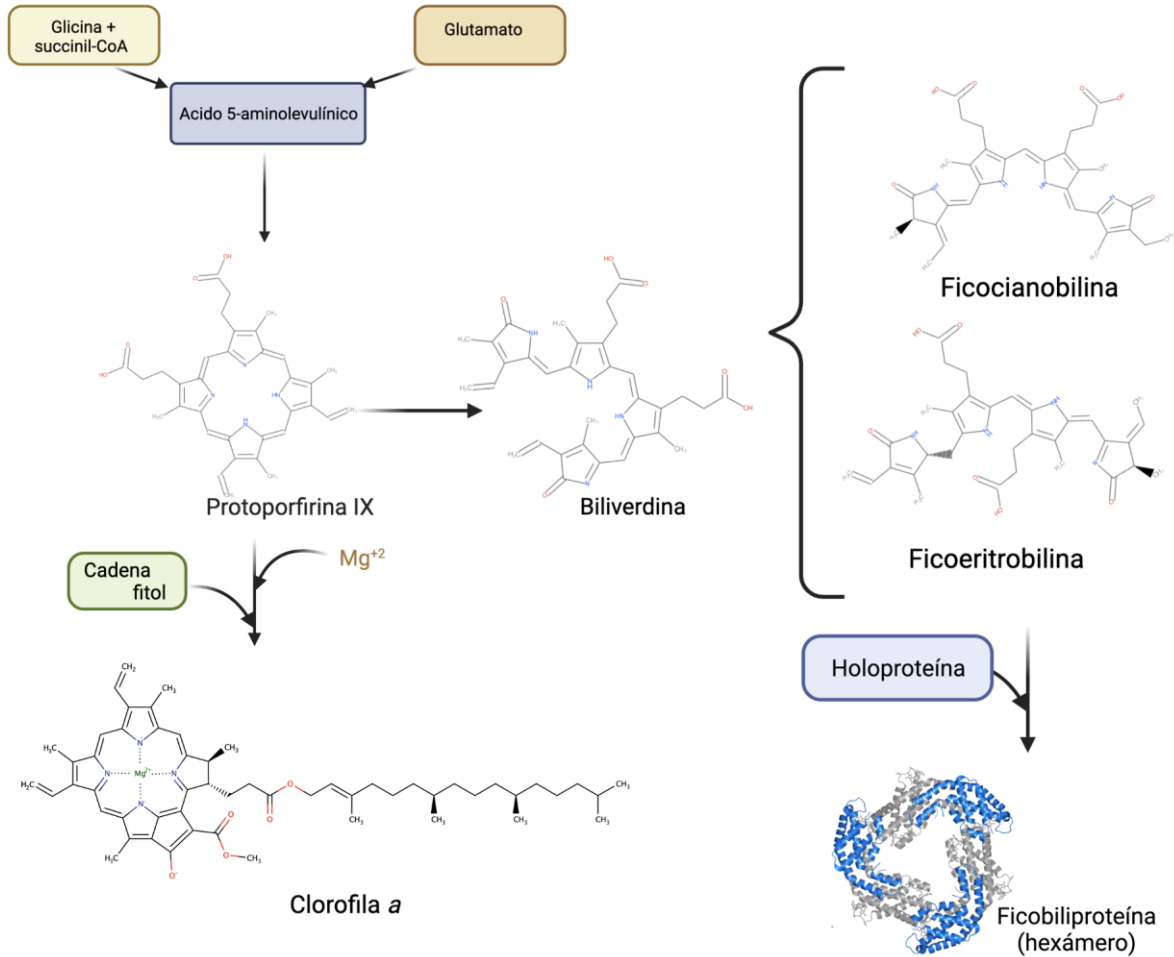
Funciones de los pigmentos en los microorganismos

Como se ha mencionado, la principal función de los pigmentos en los organismos fotosintéticos es mejorar la captura de fotones y la translocación de estos hacia los fotosistemas; no obstante, los pigmentos también presentan la función de ser fotoprotectores, reservorio de carbono y nitrógeno. A continuación, se describirán estas dos funciones de los pigmentos.

Los pigmentos captadores de luz se pueden dividir en dos: principales y secundarios. Dentro de los principales se encuentra únicamente la clorofila *a*, ya que es el pigmento encargado de romper la molécula del agua y, por consiguiente, la liberación del protón y capturar el electrón, el cual será utilizado en la fotosíntesis para la posterior formación de energía en forma de ATP (reservorio de energía química) y formación del poder reductor (NADPH), el cual es utilizado para reducir el CO_2 en azúcares. Dentro de los pigmentos secundarios se encuentran las demás clorofilas, las ficobiliproteínas y los carotenos.

Los pigmentos que funcionan como fotoprotectores evitan el daño de la autooxidación. Para explicar el proceso de autooxidación que sufre la célula, derivado de la fotosíntesis, es necesario entender que existe una velocidad de transferencia de energía entre el centro de reacción (clorofila *a*) y la cadena transportadora de electrones. Así mismo, existe una velocidad de translocación de los fotones, desde los pigmentos hasta el centro de reacción. Cuando esta velocidad es menor que la velocidad a la cual la clorofila *a* recibe los fotones, la clorofila *a* entra en un

A) Síntesis de clorofilas y ficobiliproteínas



B) Síntesis de carotenoides y xantofilas

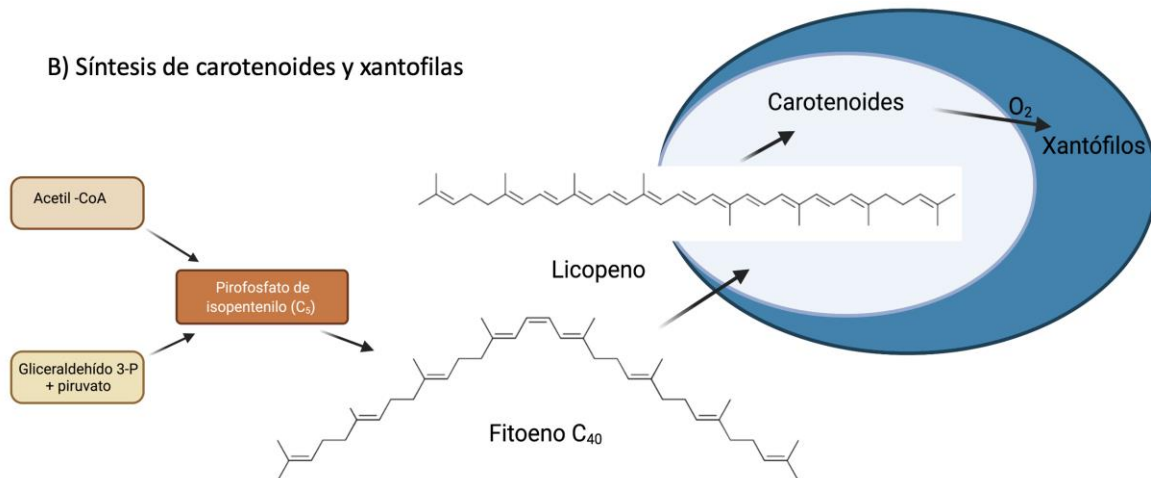


Figura 4. Biosíntesis de pigmentos A) clorofila y ficocianina B) carotenoides.

estado de oxidación (tripleto), aunque esta no es dañina por sí sola es un compuesto inestable, y transloca esta energía a una molécula de oxígeno, derivando en la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales atacan al ADN, proteínas y lípidos de membrana, conllevando a un daño celular.

Los pigmentos considerados fotoprotectores tienen como función evitar la fotooxidación derivada de la fotosíntesis y son producidos principalmente cuando hay un exceso de intensidad luminosa o altos tiempos de exposición a la luz, así como por la presencia de agentes externos oxidantes. Dentro de los pigmentos fotoprotectores hay una subdivisión, la cual, con base en su mecanismo de acción en contra de la fotooxidación, son divididas en: 1) fotoprotectores de filtrado, 2) enfriamiento y 3) barrido (Glenn, 2009).

1.- Los fotoprotectores de filtrado previenen la formación del tripleto de clorofila *a*, derivado de la sobreexcitación de la clorofila; en este mecanismo los carotenoides absorben una gran cantidad de la radiación, evitando así que llegue a los centros de reacción. Esta energía capturada puede ser guardada para su posterior uso (reservorio de electrones) o bien puede ser liberada en forma de calor, los principales pigmentos que cumplen esta función son: β -caroteno y astaxantina.

2.- Los fotoprotectores de enfriamiento previenen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Una vez que la clorofila *a* llega a su estado máximo de excitación (tripleto) y antes de que esta energía sea translocada a una molécula de oxígeno para la formación de las ROS, algunos pigmentos pueden absorber esta energía directamente de la clorofila. Los tripletes generados por esta translocación en los carotenoides presentan una energía relativamente baja, debido a que los carotenoides contienen más de 7 dobles enlaces y pueden aceptar esta energía sin causar daño a su entorno. Esta energía aceptada por los carotenoides puede ser liberada en forma de calor. Los principales carotenoides que cumplen esta función son: β -caroteno, astaxantina, luteína, zeaxantinas, violaxantina y diadinoxantina.

3.- Los fotoprotectores de barrido reaccionan con las ROS. Una vez formadas las ROS los carotenoides aceptan la energía de estas almacenándola o liberándola en forma de calor y así evitando que las ROS causen daño a las biomoléculas estructurales y funcionales. Los principales carotenoides que cumplen esta función son: β -caroteno, astaxantina y luteína.

De igual forma, los organismos no fotosintéticos pueden utilizar estos compuestos como antioxidantes y es por esto, que la producción y extracción de estos pigmentos tiene un gran mercado en la industria farmacéutica. El conocer las funciones de los pigmentos en las microalgas, es importante ya que mediante la manipulación de las condiciones del cultivo se puede incrementar la biosíntesis de estos pigmentos para su uso biotecnológico.

Factores que afectan la producción de pigmentos en microalgas

Los factores ambientales y nutricionales pueden afectar el crecimiento y composición celular de las microalgas. Se han realizados diversos estudios donde se observa que al generar un estrés en las microalgas es posible alterar el crecimiento celular e incrementar las concentraciones de los pigmentos. Algunos factores que pueden generar este estrés son: la intensidad de la luz, la longitud de onda de la luz, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, estrés oxidativo y la osmolaridad del cultivo. (Kobayashi et al., 1992; Sloth et al., 2006). A continuación, se discutirán algunas técnicas empleadas y un resumen de las técnicas usadas se muestra en la tabla 3.

Efectos de la luz

La luz tiene uno de los efectos más importantes en la producción de pigmentos en microalgas (Begum et al., 2016), ya que estos son principalmente utilizados como captadores de energía para llevar a cabo la fotosíntesis. Por lo que cambios en la intensidad de luz, longitud de onda y tiempo de exposición generan cambios en la acumulación de los pigmentos. Los tiempos cortos de exposición a la luz o intensidad de la luz conllevan a una baja captura de energía, por lo que las células incrementan el número

Artículos

Tabla 3. Estrategias utilizadas para incrementar la acumulación de los principales pigmentos en microalgas.

Pigmento	Aplicación	Microalga	Estrategias de producción	Referencia
β-caroteno	Precursor de la vitamina A, propiedades antioxidantes, previene la degeneración macular.	<i>Asterarcys quadricellulare</i>	Modificación del medio de cultivo	(Singh et al., 2019)
		<i>Dunaliella</i> sp.	Radiación UV Alta intensidad luminosa, limitación de nitrógeno y fosforo, temperaturas mayores a 15°C	(Morowvat & Ghasemi, 2016) (Mogedas et al., 2009) (Wu et al., 2016)
		<i>Scenedesmus</i> sp.	Alta intensidad luminosa	(Perez-Garcia et al., 2011)
Astaxantina	Proteger de los rayos UV, antioxidantes, colorante alimentario, mejorar las funciones del sistema inmune.	<i>Chlorella</i> sp.	Cultivo heterótrofo relación C/N =180 Modificación del medio de cultivo	(Ip & Chen, 2005) (Ip et al., 2004)
		<i>Chlorococcum</i> sp.	Estrés oxidativo (H ₂ O ₂ 0.1 mM)	(Ma & Chen, 2001)
		<i>Haematococcus pluvialis</i>	Aplicación periódica de tratamiento eléctrico	(Kim et al., 2018)
			Exposición a longitud de onda 470nm (Luz LED azul)	(Xi et al., 2016)
			Cultivo mixotrófico de dos etapas con aumento de irradiación gradual Estudio en la limitación de nitrógeno (NO ₃) Aumento en la temperatura del cultivo	(Park et al., 2014) (Orosa et al., 2005) (Tjahjono et al., 1994)
Luteína	Previene la degeneración macular por la edad, aditivo de alimentos, disminuye el riesgo de cataratas y enfermedades cardiovasculares.	<i>Coccomyxa acidophila</i>	Diferentes fuentes de nitrógeno	(Casal et al., 2011)
		<i>Scenedesmus obliquus</i>	Exposición a diferentes longitudes de onda (luz blanca vs luz monocromática roja, azul y verde)	(Ho et al., 2014)
		<i>Chlorella protothecoides</i>	Cultivo heterotrófico alimentado con fuente de nitrógeno	(Shi et al., 2002)
		<i>Chlorella minutissima</i>	Irradiación creciente en forma lineal	(Dineshkumar et al., 2016)
		<i>Chlamydomonas</i> sp.	Alta intensidad de luz Generación de estrés osmótico	(Ma et al., 2019) (Xie et al., 2019)
Clorofila	Colorante en la industria alimentaria, antioxidante.	<i>Chlorella vulgaris</i>	Utilización de luz roja	(Mohsenpour et al., 2012)
		<i>Gloeothece membranacea</i>	Utilización de luz verde	
		<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	Medio de cultivo, ciclos de luz oscuridad e intensidad de luz	(George et al., 2014)
		<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Scenedesmus obliquus</i>	Aumento del fosforo Aumento de temperatura aunado con el aumento de fosforo	(Chen et al., 2011)
Ficocianina	Marcador fluorescente, actividad hepatoprotectora, antioxidante, antiinflamatoria y neuroprotectora.	<i>Galdieria sulphuraria</i>	Cultivos alimentados con glucosa Baja intensidad luminosa	(Graverholt & Eriksen, 2007) (Sloth et al., 2006)
		<i>Arthrospira platensis</i>	Estrés metabólico aunado con exceso de nitrógeno	(Manirafasha et al., 2018)
			Utilización de luz verde	(Prates et al., 2018)
Ficoeritrina	Marcador fluorescente, colorante utilizado en industria alimentaria y cosmética.	<i>Porphyridium marinum</i>	Estudio y modificación el medio de cultivo	(Gargouch et al., 2018)
		<i>Pseudanabaena</i> sp.	Utilización de luz LED verde	(Mishra et al., 2012)
		<i>Porphyridium purpureum</i>	Evaluación del tiempo de cultivo Manipulación genética para disminuir la producción de clorofila	(Xu et al., 2020) (Jeon et al., 2021)

de pigmentos antena y así la captación de la energía que llega a los fotosistemas. Es por esto que la clorofila y las ficobiliproteínas son los pigmentos mayormente influenciados por la baja exposición a la luz. En contraparte, los carotenoides, además de ser complejos antena, son principalmente sintetizados en respuesta a la presencia de especies reactivas de oxígeno o bien en respuesta a sobreexcitación de la clorofila.

Hoy en día, las luces artificiales son una herramienta utilizada en los cultivos autotróficos, ya que hacen posible controlar la longitud de onda (color de la luz), intensidad y tiempo de exposición a la luz. Se ha demostrado que se puede lograr una mayor producción de biomasa controlando la intensidad de la luz, utilizando luz artificial como los diodos emisores de luz (LED), lámparas incandescentes o tubos fluorescentes. En la actualidad, gran parte de estudios en el crecimiento de las microalgas ha sido mediante el uso de LED, ya que son de tamaño pequeño, tienen una baja disipación de energía en forma de calor, un tiempo de vida media elevada, alta eficiencia de conversión fotoeléctrica y un reducido consumo de energía.

Dentro de las técnicas utilizadas, para manipular el efecto de la luz, se encuentra la variación de la longitud de onda, la cual se fundamenta bajo la premisa que los pigmentos presentan un rango de longitud de onda en la cual la absorción de energía es mayor, siendo esta longitud diferente para cada pigmento (figura 1). Por lo que, al someter a la microalga a una longitud de onda específica, se reduce el intervalo en el cual puede captar energía y, en consecuencia, tiende a incrementar la concentración de estos pigmentos para satisfacer los requerimientos energéticos. Cabe mencionar que cada género de microalga presenta una distribución de pigmentos diferentes, por lo que si se desea aumentar específicamente la producción de algunos se deben de considerar todos los pigmentos con los que cuenta el microorganismo.

La utilización de un rango de longitud de onda específico se ha mostrado como una técnica eficiente para incrementar el contenido de pigmentos en las microalgas y cianobacterias. Tal es el caso de la cianobacteria *Pseudanabaena* sp., donde se

observó que existe una acumulación de ficoeritrina bajo la longitud de onda correspondiente al color verde y de ficocianina con longitudes de onda correspondiente al color rojo; no obstante, la producción de biomasa se vio comprometida comparada con la utilización de la luz blanca (Mishra et al., 2012). Mientras que para la cianobacteria *Arthrospira platensis* se observó que la producción de biomasa y ficocianina aumentaron en un 26% y 44%, respectivamente, utilizando concentradores solares luminiscentes bajo la longitud de onda correspondiente a la luz roja (Raeisossadati et al., 2019). Así mismo, la producción de β -caroteno y luteína en la cepa *D. salina* (Fu et al., 2013), y la biosíntesis de astaxantina en *H. pluvialis* (Xi et al., 2016), se incrementó al utilizar una combinación de luz roja y azul, debido a que las células estuvieron sometidas a diferentes longitudes de onda y no se les permitió adaptarse sola a una, generando condiciones constantes de estrés que dieron como resultado un incremento en estos pigmentos secundarios.

No es posible extrapolar directamente las técnicas utilizadas para el aumento en la producción de pigmentos a las diferentes especies de microalgas, debido a que cada microorganismo presenta una respuesta diferente a los estímulos. Por ejemplo, el grupo de Mohsenpour y colaboradores, en el 2012, estudiaron la utilización de luces monocromáticas y reportaron que, diferentes longitudes de onda, permitieron incrementar la acumulación de clorofila-*a* en cepas de *Chlorella vulgaris* y *Guzmania membranacea*, debido a que la luz roja y la luz verde, respectivamente, generan un aumento de este pigmento (Mohsenpour et al., 2012). De igual forma, en la cianobacteria *Scenedesmus obliquus* FSP-3, se observó que el uso de LED blanco resultó en una mejor eficiencia para la producción de luteína en comparación con fuentes LED monocromáticas (rojo, azul y verde) (Ho et al., 2014). Estos datos difieren con los mencionados previamente, en los cuales el uso de fuentes de luz monocromáticas aumenta la producción de pigmentos, confirmando que los requerimientos de luz son diferentes para cada microorganismo. Aunado a esto, se ha reportado que la incidencia de luz fuera del rango visible, en la cepa *Dunaliella bardawil*, generó un aumento en la producción de

carotenoides al usar luz UV-A, sin efectos negativos sobre el crecimiento celular (Mogedas et al., 2009), por lo que esta es un área de oportunidad explotable para favorecer la acumulación de pigmentos en otras microalgas.

La potencia ponderada por la longitud de onda emitida por una fuente de luz o intensidad luminosa es un factor importante para considerar en el contenido de pigmentos en microalgas. El contenido de pigmentos puede ser regulado al variar este factor; de forma general se ha observado que al disminuir la intensidad de luz hay un incremento en pigmentos secundarios (Prates et al., 2018; Sloth et al., 2006), debido a que el aporte energético disminuye por el uso de bajas intensidades luminosas y es necesario estimular la producción de más pigmentos antena y así mejorar la eficiencia fotosintética. En el otro extremo, el aumento en la intensidad de luz puede verse reflejado en un incremento en la concentración de clorofila y pigmentos fotoprotectores (George et al., 2014; Ho et al., 2014; Tomaselli et al., 1997). Probablemente, al aumentar la intensidad de luz existe una sobreexcitación y, por ende, la formación de los tripletes de alta energía en la clorofila-a, lo que deriva en la formación de estrés oxidativo y, como consecuencia, la célula promueve el incremento de los pigmentos fotoprotectores.

Una limitante en el crecimiento y en la producción de pigmentos es el efecto de sombreamiento. Este fenómeno se genera cuando existe una gran concentración de células que impiden el paso de la luz y, por lo tanto, el promedio de energía luminosa que reciben las células disminuye. El efecto de sombreamiento provoca que la luz que reciben las células sea limitada, lo que repercute negativamente en el crecimiento celular o bien en la producción de pigmentos. Para evitar este efecto existen técnicas como lo son el incremento lineal de luz, ya sea en (1) tiempo de exposición: existen cultivos que son sometidos a intervalos controlados de luz/obscuridad (fotoperiodos) y el tiempo de exposición a la luz incrementa de forma lineal (Dineshkumar et al., 2016), o bien en (2) un incremento gradual de la intensidad de luz (Ma et al., 2019). Con estas técnicas se asegura que, aunque exista un incremento de células, estas siempre se encuentran

sometidas a un exceso de luz, lo que provoca una condición de estrés para generar carotenos.

El propósito de estas técnicas es contar con condiciones que aseguren una productividad volumétrica de pigmentos elevada, mediante la obtención de una alta concentración celular, aunado a una alta acumulación de pigmentos por célula. Sin embargo, el generar un estrés celular, que conlleva a una acumulación de pigmentos, por lo general deriva en un bajo crecimiento celular y por lo tanto en una baja concentración de biomasa final (Mishra et al., 2012). Para contender con este problema se utilizan cultivos en dos fases, donde cada fase tiene un objetivo específico. En la primera fase las condiciones de cultivos son las óptimas para alcanzar una gran concentración de biomasa (normalmente en condiciones heterotróficas). Mientras que en la segunda fase las microalgas se exponen a condiciones que provocan un estrés celular y, por consiguiente, aumentan la producción de pigmentos (Azizi et al., 2019; Park et al., 2014; Wan et al., 2016), de esta manera se logra una elevada concentración de células y pigmentos. Por lo general se requiere realizar diluciones entre la primera y la segunda fase para evitar el efecto del sombreamiento.

Medio de cultivo

Las condiciones de cultivos son muy importantes para la acumulación de pigmentos, siendo los factores relacionados con la luz los que ejercen mayor influencia; sin embargo, se ha observado que los nutrientes presentes en el medio de cultivo y la proporción de estos tienen un efecto en el crecimiento y en la acumulación de algunos metabolitos.

Algunos estudios mostraron que en cultivos heterotróficos o mixotróficos, el aumentar la concentración de fuente de carbono orgánico y disminuir la concentración de fuente de nitrógeno conlleva a un incremento en el contenido de carotenos, ya que estos son generados en una respuesta a la deficiencia de nitrógeno (Ip et al., 2004; Shi et al., 2002). Por otro lado, en cultivos donde la fuente de carbono es baja y existe un exceso de la fuente de nitrógeno, se ha observado que algunas microalgas son capaces de acumular ficobiliproteínas como reservorio de nitrógeno (Sloth et al., 2006).

Diversos grupos de trabajo han reportado que el contenido de pigmentos puede variar dependiendo la fuente de carbono utilizada dentro de las cuales están la glucosa, el acetato, el malonato, entre otras; o bien, dependiendo el grado de oxidación del nitrógeno (nitratos, nitritos amonio y urea; fuente de carbono y nitrógeno). Aún se desconoce el principio de por qué al usar cierta fuente de carbono o nitrógeno, se promueve la acumulación de ciertos pigmentos (Casal et al., 2011; Manirafasha et al., 2018; Orosa et al., 2005).

En esta misma línea, varios grupos de trabajo realizan optimizaciones de cultivo. Para este tipo de estudios realizan diseños experimentales donde proponen modificar diversas variables como: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, temperatura, pH, salinidad y elementos metálicos en bajas concentraciones con un posterior estudio estadístico, donde se determinan las mejores condiciones de cultivo, con el fin de lograr una mayor producción específica y/o volumétrica de los pigmentos (Chen et al., 2011; Gargouch et al., 2018; Morowvat & Ghasemi, 2016; Singh et al., 2019).

Estrés oxidativo

Una de las principales funciones de la mayoría de los carotenos es evitar la oxidación de proteínas, lípidos y material genético, ya que reaccionan con las especies reactivas de oxígeno generadas en la fotosíntesis antes de que estas lleguen a las biomoléculas vitales. Por esta razón, se ha evaluado el efecto del estrés oxidativo en la producción de carotenos y se ha observado que, cuando hay un aumento en la producción de ROS, se promueve un incremento en la producción de carotenos. Para poder generar especies de oxígeno y por ende llevar a las células a un estrés oxidativo la principal técnica es incrementar la intensidad de luz (Xie et al., 2019) y así desestabilizar el flujo de energía en el procesos fotosintético. Sin embargo, existen otras técnicas como la de generar estrés oxidativo por medio de la adición de iones metálicos, o bien peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Un caso muy particular es la generación de astaxantina en configuración-trans, la cual puede ser aumentada en la microalga verde *Chlorococcum* sp. por medio de la adición de H_2O_2 (0.1 mM), obtenido un rendimiento 60% mayor en comparación con un cultivo mixotrófico (Ma & Chen, 2001).

Otros mecanismos de estrés para la producción de pigmentos

Actualmente se han estudiado otras técnicas para incrementar la concentración de pigmentos, entre ellas está la aplicación periódica de tratamiento eléctrico, con la cual se genera la electrólisis del agua y por lo tanto la formación de ROS, mediante un tratamiento con 100 mA se logró un incremento del 10% de astaxantina en la cepa *H. pluvialis* (Kim et al., 2018). Otro factor que se ha observado incrementa el contenido de pigmentos es la temperatura: En cepas de *H. pluvialis* (Tjahjono et al., 1994) y *C. protothecoides*, (Shi et al., 2002) al aumentar la temperatura, presentaron un incremento del 300% y 20% el contenido de astaxantina y luteína, respectivamente. Para el caso de la clorofila, también se observó que la temperatura ocasionó modificaciones en el tamaño de las células y la cantidad de clorofila-a (Chen et al., 2011). Para las ficobiliproteínas se ha observado que un factor importante es el tiempo de cultivo ya que para las cepas *P. purpureum* (Xu et al., 2020) y *Pseudanabaena* sp. (Mishra et al., 2012), se observó que existe un pico en la acumulación de ficoeritrina aproximadamente a las 13 días en un cultivo autotrófico.

Por último, una de las técnicas para la producción de metabolitos más utilizada en diversos microorganismos es la manipulación genética; sin embargo, debido a que existe poca información de las secuencias de las microalgas y las técnicas que existen están muy especializadas para otros modelos celulares, principalmente otros microorganismos, la utilización de estas técnicas se encuentra poco desarrollada para microalgas. Un ejemplo interesante fue la eliminación de genes involucrados en la biosíntesis de la clorofila en la cepa *Porphyridium* sp. lo que incrementó la producción de ficoeritrina (Jeon et al., 2021).

Cabe mencionar que, los procedimientos aquí descritos, dan una idea general del efecto observado en las microalgas. No obstante, cada cepa tiene sus características particulares, inclusive entre mismas especies de cepas, pero aisladas de diferentes nichos, puede haber diferencias en la acumulación de pigmentos, y en sus características de crecimiento (Shi et al., 1997).

Conclusiones

La clorofila, ficobiliproteínas y carotenoides son pigmentos de interés comercial por la diversidad de colores que presentan y gracias a su capacidad antioxidante y su naturaleza no tóxica ofrecen muchos beneficios a la salud como productos nutraceuticos. Por tales motivos se ha buscado incrementar la producción de estos pigmentos; adicionalmente, debido al alto contenido de biocolorantes, la gran versatilidad y el rápido crecimiento que presentan en comparación con plantas superiores se ha propuesto a las microalgas como fuente de estos pigmentos. Es por esta razón que la estructura, biosíntesis y funciones de los pigmentos en microalgas se ha estudiado de forma detallada y, con la información generada, se ha podido proponer y realizar optimizaciones en la producción de estos colorantes. Todos los enfoques para la sobreproducción de pigmentos evaluados en esta revisión (efectos de la luz, composición del medio de cultivo, estrés oxidativo, temperatura, etc.) son resultado de respuestas en las vías biosintéticas. Y, aunque se han logrado varios avances en la productividad de diferentes pigmentos, aún es necesario mejorar estrategias de cultivo y desarrollar técnicas basadas en biología molecular e ingeniería metabólica para mejorar los rendimientos y productividades.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM: IT201119. FVLP recibió una beca de posgrado de CONACyT.

Referencias

- Azizi, M., Hejazi, M.A., Hashemi, M., 2019. Supplementation with polyalcohols and sequential mixotrophy dilution photoinduction strategy boost the accumulation of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture* 511,734225. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734225>
- Begum, H., Yusoff, F.M.D., Banerjee, S., Khatoon, H., Shariff, M., 2016. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 2209–2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>
- Bryant, D.A., Guglielmi, G., de Marsac, N.T., Castets, A.M., Cohen-Bazire, G., 1979. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Arch. Microbiol.* 123, 113–127. <https://doi.org/10.1007/BF00446810>
- Carotenoids, volume 4: Natural functions, 1377. <https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7499-0>
- Casal, C., Cuaresma, M., Vega, J.M., Vilchez, C., 2011. Enhanced productivity of a lutein-enriched novel acidophile microalga grown on urea. *Mar. Drugs* 9, 29–42. <https://doi.org/10.3390/md9010029>
- Chen, M., Li, J., Dai, X., Sun, Y., Chen, F., 2011. Effect of phosphorus and temperature on chlorophyll a contents and cell sizes of *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa*. *Limnology* 12, 187–192. <https://doi.org/10.1007/s10201-010-0336-y>
- De Carvalho, J.C., Cardoso, L.C., Ghiggi, V., Woiciechowski, A.L., De Souza Vandenberghe, L.P., Soccol, C.R., 2014. Microbial pigments. Biotransformation Waste Biomass into High Value Biochem. 9781461480, 73–97. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1_4
- De Mejia, E.G., Zhang, Q., Penta, K., Eroglu, A., Lila, M.A., 2020. The Colors of Health: Chemistry, Bioactivity, and Market Demand for Colorful Foods and Natural Food Sources of Colorants. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 11, 145–182. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051729>

- Dineshkumar, R., Subramanian, G., Dash, S.K., Sen, R., 2016. Development of an optimal light-feeding strategy coupled with semi-continuous reactor operation for simultaneous improvement of microalgal photosynthetic efficiency, lutein production and CO₂ sequestration. *Biochem. Eng. J.* 113, 47–56.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.05.011>
- Fu, W., Guomundsson, Ó., Paglia, G., Herjólfsson, G., Andrésón, Ó.S., Pálsson, B.O., Brynjólfsson, S., 2013. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2395–2403.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4502-5>
- Gargouch, N., Karkouch, I., Elleuch, J., Elkahoui, S., Michaud, P., Abdelkafi, S., Laroche, C., Fendri, I., 2018. Enhanced B-phycoerythrin production by the red microalga *Porphyridium marinum*: A powerful agent in industrial applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 120, 2106–2114.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.037>
- George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T., Mishra, S., 2014. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* - A potential strain for bio-fuel production. *Bioresour. Technol.* 171, 367–374.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.086>
- Graverholt, O.S., Eriksen, N.T., 2007. Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 69–75.
<https://doi.org/10.1007/s00253-007-1150-2>
- Halim, R., Hosikian, A., Lim, S., Danquah, M.K., 2010. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. *Int. J. Chem. Eng.* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/391632>
- Ho, S.H., Chan, M.C., Liu, C.C., Chen, C.Y., Lee, W.L., Lee, D.J., Chang, J.S., 2014. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. *Bioresour. Technol.* 152, 275–282.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.031>
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.S., Lee, D.J., 2018. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnol. Adv.* 36, 54–67.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009>
- Ip, P.F., Chen, F., 2005. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochem.* 40, 733–738.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.039>
- Ip, P.F., Wong, K.H., Chen, F., 2004. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture. *Process Biochem.* 39, 1761–1766.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.08.003>
- Jeon, M.S., Han, S. II, Jeon, M., Choi, Y.E., 2021. Enhancement of phycoerythrin productivity in *Porphyridium purpureum* using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 ribonucleoprotein system. *Bioresour. Technol.* 330, 124974.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124974>
- Kannaujiya, V.K., Sundaram, S., Sinha, R.P., 2017. Phycobiliproteins: Recent developments and future applications, Phycobiliproteins: Recent Developments and Future Applications.
<https://doi.org/10.1007/978-981-10-6460-9>
- Kim, J.Y., Lee, C., Jeon, M.S., Park, J., Choi, Y.E., 2018. Enhancement of microalga *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production by electrical treatment. *Bioresour. Technol.* 268, 815–819.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.014>

- Kobayashi, M., Kakizono, T., Yamaguchi, K., Nishio, N., Nagai, S., 1992. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 74, 17–20. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90261-R](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90261-R)
- Ma, R., Zhao, X., Xie, Y., Ho, S.H., Chen, J., 2019. Enhancing lutein productivity of *Chlamydomonas* sp. via high-intensity light exposure with corresponding carotenogenic genes expression profiles. *Bioresour. Technol.* 275, 416–420. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.109>
- Ma, R.Y.N., Chen, F., 2001. Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum* sp. *Process Biochem.* 36, 1175–1179. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00157-1)
- Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Rashid Ahmed, N., Liu, J., Lu, Y., Zeng, X., Ling, X., Jing, K., 2018. Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresour. Technol.* 255, 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.068>
- Mass, O., Taniguchi, M., Ptaszek, M., Springer, J.W., Faries, K.M., Diers, J.R., Bocian, D.F., Holten, D., Lindsey, J.S., 2011. Structural characteristics that make chlorophylls green: Interplay of hydrocarbon skeleton and substituents. *New J. Chem.* 35, 76–88. <https://doi.org/10.1039/c0nj00652a>
- Mezzomo, N., Ferreira, S.R.S., 2016. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A review. *J. Chem.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3164312>
- Mishra, S.K., Shrivastav, A., Maurya, R.R., Patidar, S.K., Haldar, S., Mishra, S., 2012. Effect of light quality on the C-phycoerythrin production in marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. isolated from Gujarat coast, India. *Protein Expr. Purif.* 81, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.011>
- Mogedas, B., Casal, C., Forján, E., Vilchez, C., 2009. β -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors. *J. Biosci. Bioeng.* 108, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.02.022>
- Mohsenpour, S.F., Richards, B., Willoughby, N., 2012. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresour. Technol.* 125, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.072>
- Morowvat, M.H., Ghasemi, Y., 2016. Culture medium optimization for enhanced β -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.008>
- Mulders, K.J.M., Lamers, P.P., Martens, D.E., Wijffels, R.H., 2014. Phototrophic pigment production with microalgae: Biological constraints and opportunities. *J. Phycol.* 50, 229–242. <https://doi.org/10.1111/jpy.12173>
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., Abalde, J., 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* 96, 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.04.006>
- Park, J.C., Choi, S.P., Hong, M.E., Sim, S.J., 2014. Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 2039–2047. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1180-y>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* 45, 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Prates, D. da F., Radmann, E.M., Duarte, J.H., Morais, M.G. de, Costa, J.A.V., 2018. *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. *Bioresour. Technol.* 256, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.122>

- Raeisossadati, M., Moheimani, N.R., Parlevliet, D., 2019. Red and blue luminescent solar concentrators for increasing *Arthrospira platensis* biomass and phycocyanin productivity in outdoor raceway ponds. *Bioresour. Technol.* 291, 121801. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121801>
- Shi, X.M., Chen, F., Yuan, J.P., Chen, H., 1997. Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains. *J. Appl. Phycol.* 9, 445–450. <https://doi.org/10.1023/A:1007938215655>
- Shi, X.M., Jiang, Y., Chen, F., 2002. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotechnol. Prog.* 18, 723–727. <https://doi.org/10.1021/bp0101987>
- Singh, D.P., Khattar, J.S., Rajput, A., Chaudhary, R., Singh, R., 2019. High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions. *PLoS One* 14, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221930>
- Sloth, J.K., Wiebe, M.G., Eriksen, N.T., 2006. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.010>
- Tandeau De Marsac, N., 2003. Phycobiliproteins and phycobilisomes: The early observations. *Photosynth. Res.* 76, 193–205. https://doi.org/10.1007/1-4020-3324-9_43
- Tjahjono, A., Hayama, Y., Kakizono, 1994. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures 16, 133–138.
- Tomaselli, L., Boldrini, G., Margheri, M.C., 1997. Physiological behaviour of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* during acclimation to changes in irradiance. *J. Appl. Phycol.* 9, 37–43. <https://doi.org/10.1023/A:1007956210329>
- Tuli, H.S., Chaudhary, P., Beniwal, V., Sharma, A.K., 2015. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *J. Food Sci. Technol.* 52, 4669–4678. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1601-6>
- Von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C.G., 1995. Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell* 7, 1039–1057. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1039>
- Wan, M., Wang, Z., Zhang, Z., Wang, J., Li, S., Yu, A., Li, Y., 2016. A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Bioresour. Technol.* 218, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.045>
- Wu, Z., Duangmanee, P., Zhao, P., Ma, C., 2016. The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *dunaliella salina* strains isolated from saline soil. *Jundishapur J. Microbiol.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.5812/jjm.26732>
- Xi, T., Kim, D.G., Roh, S.W., Choi, J.S., Choi, Y.E., 2016. Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 6231–6238. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7301-6>
- Xie, Y., Lu, K., Zhao, X., Ma, R., Chen, J., Ho, S.H., 2019. Manipulating Nutritional Conditions and Salinity-Gradient Stress for Enhanced Lutein Production in Marine Microalga *Chlamydomonas* sp. *Biotechnol. J.* 14, 1–28. <https://doi.org/10.1002/biot.201800380>
- Xu, Y., Jiao, K., Zhong, H., Wu, S., Ho, S.H., Zeng, X., Li, J., Tang, X., Sun, Y., Lin, L., 2020. Induced cultivation pattern enhanced the phycoerythrin production in red alga *Porphyridium purpureum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 43, 347–355. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02230-6>
- Zhang, C., 2018. Biosynthesis of Carotenoids and Apocarotenoids by Microorganisms and Their Industrial Potential. *Prog. Carotenoid Res.* <https://doi.org/10.5772/intechopen.79061>

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 (β -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 (β -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.

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 α -(1-4) y ramificaciones unidas en ciertos puntos a través de enlaces α -(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 α -(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	α -(1-4) α -(1-4) y α -(1-6)	Cloroplasto	Chlorophyta
Almidón Florideo	Glucosa	α -(1-4) y α -(1-6)	Citosol	Rhodophyta
Glucógeno	Glucosa	α -(1-4) y α -(1-6)	Citosol	Cyanophyta
Laminarina	Glucosa	β -(1-3) y β -(1-6)	Citosol	Phaeophyceae
Crisolaminarina	Glucosa	β -(1-3) y β -(1-6)	Citosol	Bacillariophyceae Xanthophyceae Chrysophyceae Haptophyta Chlorarachniophyta
Paramilon	Glucosa	β -(1-3)	Citosol	Euglenophyta

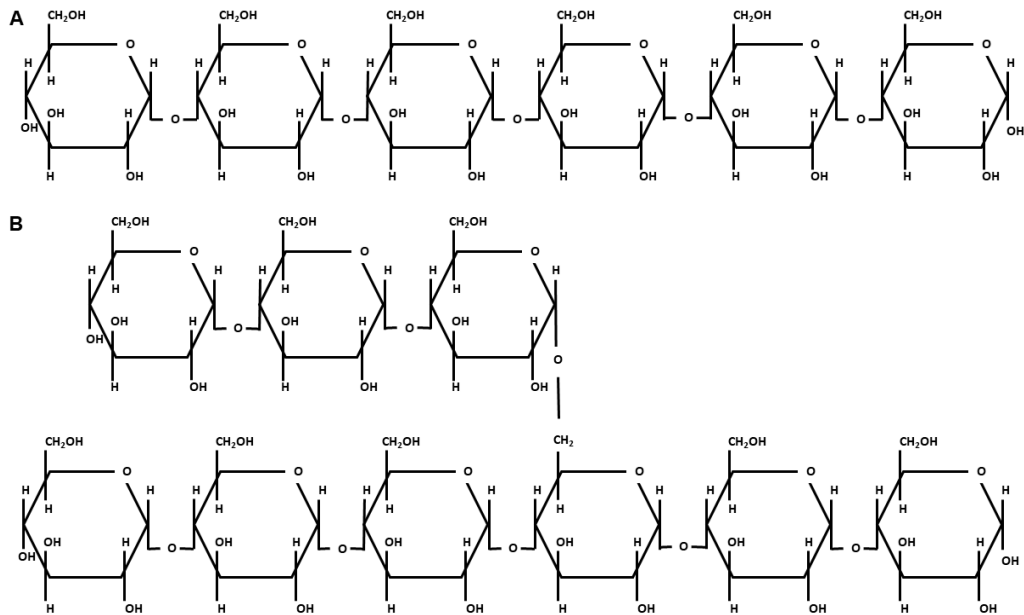


Figura 2. Representación esquemática de la estructura química de los principales alfa-glucanos de reserva de microalgas. A. Estructura lineal de la amilosa. B. Estructura lineal y ramificada de la amilopectina, almidón florideo y glucógeno (adaptado de Al Abdallah et al., 2016).

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 β -glucanos, corresponden a polímeros lineales de glucosa unidos por enlaces β -(1-3) y con ramificaciones β -(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 β -(1-3) : β -(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 β -glucanos al carecer de

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

Biosíntesis de los glucanos de reserva en microalgas

Fijación del CO₂

Al ser microorganismos fotosintéticos, el primer paso es la fijación de CO₂ (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 CO₂ 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

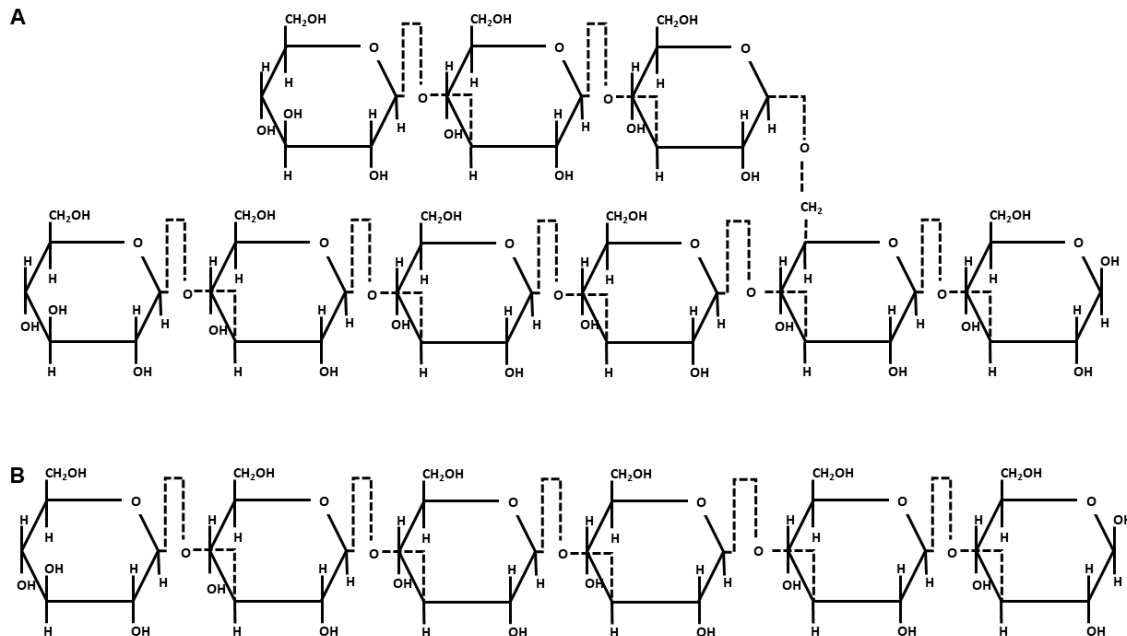


Figura 3. Representación esquemática de la estructura química de los principales beta-glucanos de reserva de microalgas. A. Estructura lineal y ramificada de la laminarina y crisolaminarina. B. Estructura lineal del paramillon (adaptado de Al Abdallah et al., 2016).

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 α -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 α -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 α -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 α -(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 α -(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

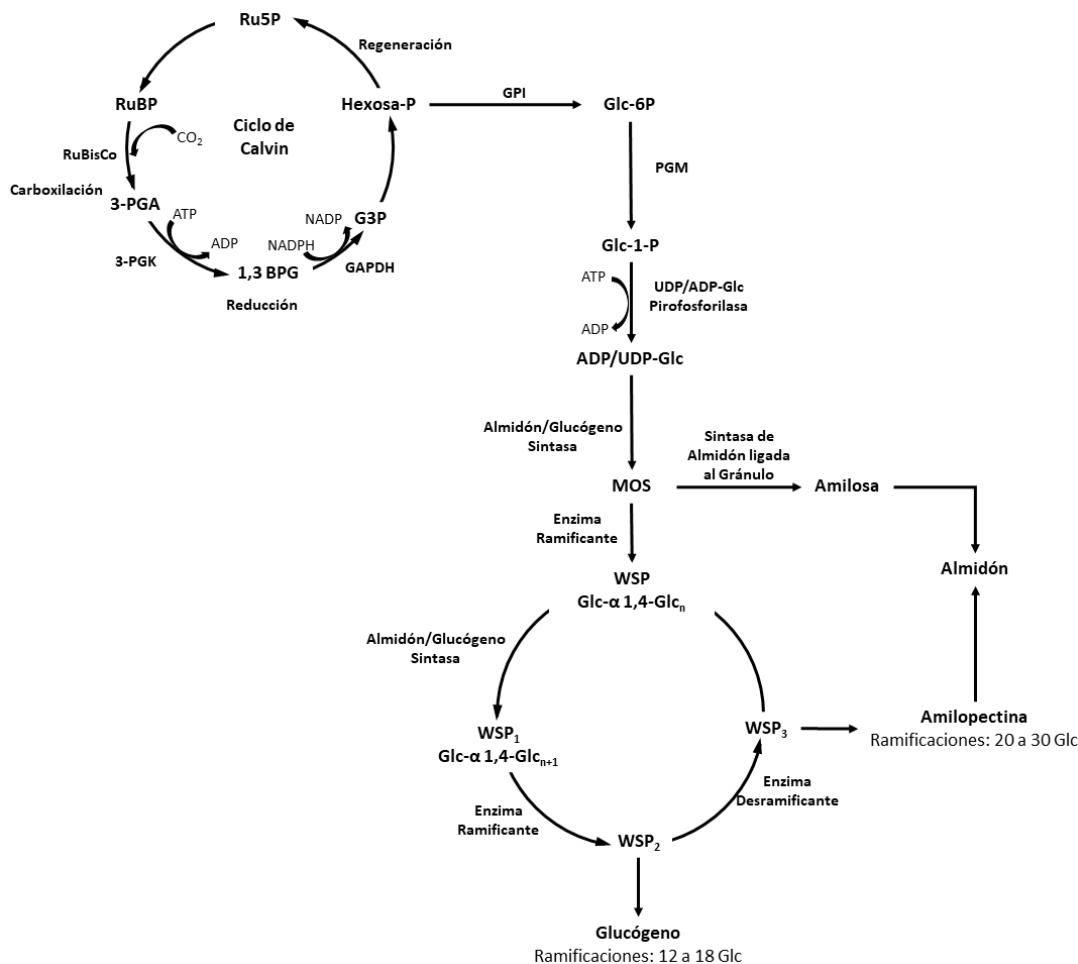


Figura 4. Vía de síntesis de los principales alfa-glucanos de reserva (glucógeno y almidón) acumulados en microalgas (adaptado de Ran et al., 2019). Las abreviaturas corresponden a RuBP: ribulosa-1,5-bisfosfato, RuBisCo: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, 3-PGA: ácido-3-fosfoglicérico, 3-PGK: 3-fosfoglicerato quinasa, 1,3 BPG: 1,3-bisfosfoglicerato, GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, G3P: gliceraldehido-3-fosfato, Ru5P: ribulosa-5-fosfato, GPI: Fosfoglucoasa 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 α -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 β -(1-3) glucosídicos entre las subunidades monoméricas, obteniendo de forma inicial un polímero β -(1-3)-glucano insoluble, que da lugar a formación del gránulo citoplasmático (Merwe, 2007; O'Neill et al., 2015; Muchut et al., 2021).

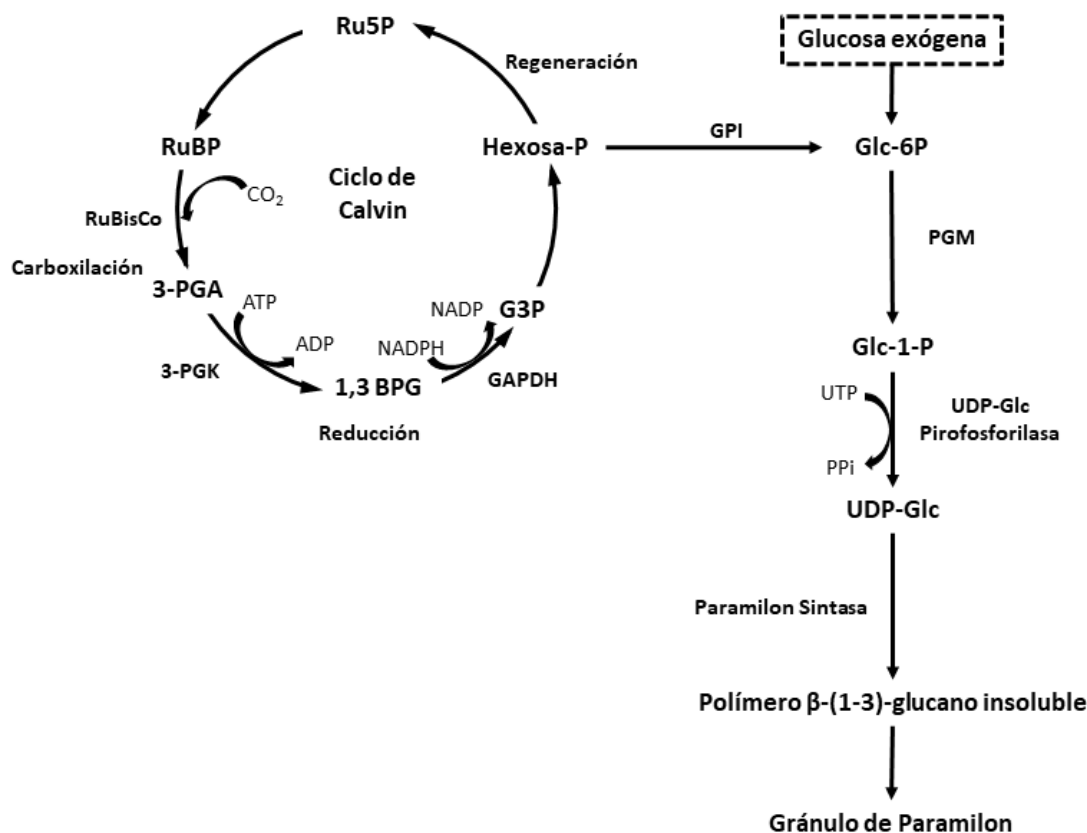


Figura 5. Vía de síntesis de beta-glucanos de reserva (Paramilon) acumulados en microalgas. (Merwe, 2007; O'Neill et al., 2015; Muchut et al., 2021). Las abreviaturas corresponden a RuBP: ribulosa-1,5-bisfosfato, RuBisCo: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, 3-PGA: ácido-3-fosfoglicérico, 3-PGK: 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 CO₂ 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 CO₂ (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 α -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⁻¹ 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 KNO₃ y MgSO₄ 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⁻¹ d⁻¹, una producción máxima de 2.7 g l⁻¹ 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⁻¹ y una productividad de 0.29 g l⁻¹ d⁻¹.

De igual forma, Aikawa et al. (2014) llevaron a cabo el estudio de los efectos de la intensidad de la luz, la concentración de CO₂ y la salinidad sobre el crecimiento celular y el

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

Microorganismo	Poliglucano (g l ⁻¹)	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 ₂ .	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 ⁻¹ y (NH ₄) ₂ SO ₄ 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 ₂ , KNO ₃ 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 ₂ , KNO ₃ 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 ₂	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 ₃ . 200 mM	Aikawa et al., 2012
<i>Galdieria sulphuraria</i> O74 W	0.45	Cultivo en condiciones mixotróficas, oscuridad, pH 2, CO ₂ 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 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 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 CO_2 atmosférico y glucosa 25 mM). La producción máxima de biomasa se obtuvo en el cultivo mixotrófico con un valor de 3.8 g l^{-1} . Así mismo, obtuvieron altas cantidades de glucógeno en los cultivos mixotróficos (0.45 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 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 g l^{-1} cuando el microorganismo se cultivó en medio con nitrógeno reducido (BG11 Δ 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 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 α -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 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 ± 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 CO₂, 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
- 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 CO₂ 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 CO₂ 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 O₂ evolution in *Chlorella vulgaris* under high light and increased CO₂ 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 α (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 β -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>

***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.

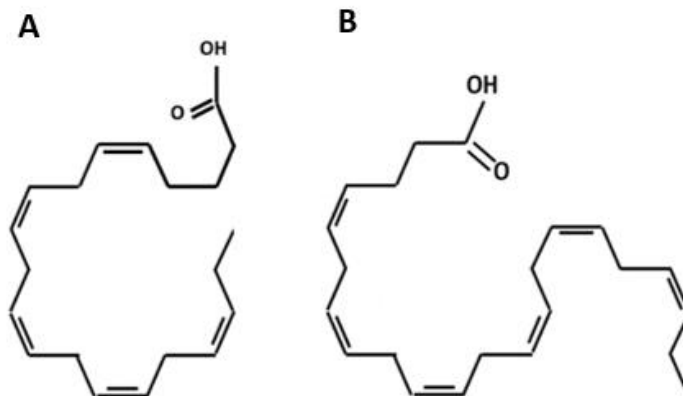


Figura 1. Estructura química omega-3 (A) EPA: Ácido eicosapentaenoico ($20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$), (B) DHA: Ácido docosahexaenoico ($22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$). Adaptado de Moreno *et al.*, 2012.

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, triacilgliceroles (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

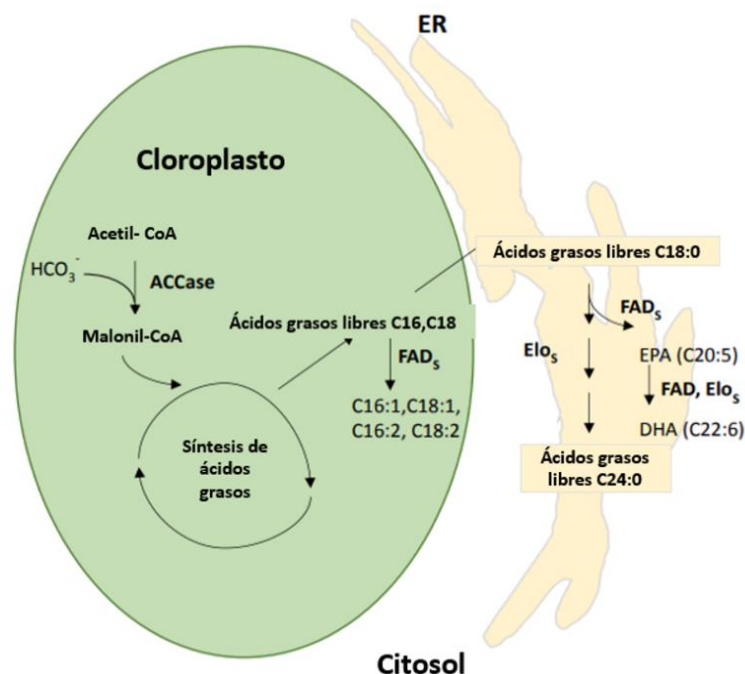


Figura 3. Vías de biosíntesis de ácidos grasos y omega-3.

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.

Ficocianina y su acumulación en la microalga roja *Galdieria sulphuraria*

Francisco Vera-López Portillo², Carlos A. Montenegro-Herrera²,
Ricardo A. Alvarado-Cosío¹, Alfredo Martínez Jiménez², Helena Porta Ducoing*¹

¹Departamento de Biología Molecular de Plantas, ²Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos.

helena.porta@ibt.unam.mx

Resumen

La microalga roja *Galdieria sulphuraria* ha llamado el interés de diferentes industrias como la alimentaria y la farmacéutica por ser un organismo del cual se puede obtener la proteína pigmentada denominada ficocianina (FC). Esta proteína se participa directamente en la absorción de fotones durante el proceso de fotosíntesis en condiciones de baja intensidad de luz. Actualmente la FC se extrae de cultivos autótrofos de la cianobacteria *Arthrospira platensis*. Sin embargo, obtener este pigmento a partir de cultivos de la microalga *G. sulphuraria* es atractivo debido a que es un microorganismo extremófilo, capaz de crecer a pH menores de 3 y temperaturas mayores a 40 °C, lo cual ayuda a mantener los cultivos axénicos. Además, dicha microalga es capaz de crecer en condiciones heterótrofas (en ausencia de luz), mixótrofas y autótrofas. Adicionalmente, la FC extraída de *G. sulphuraria* presenta una termoestabilidad mayor a la extraída por *A. platensis*. En este trabajo se presenta un panorama general de la ficocianina, su función y estructura, así como las características generales de *G. sulphuraria*, los tipos de cultivos evaluados para su crecimiento y las estrategias para incrementar la acumulación de FC. Entre estas estrategias destacan, la fuente de carbono, intensidad y longitud de onda de la luz, técnicas de cultivo y el papel de la FC como reservorio de nitrógeno.

Palabras clave: Ficocianina, Microalga roja, *Galdieria sulphuraria*.

Abstract

The red microalgae *Galdieria sulphuraria* has attracted the interest of different industries, such as food and pharmaceuticals, since it is a source of the protein-pigment called phycocyanin (PC). This protein is directly involved in the absorption of photons during the photosynthesis process at low light conditions. Currently this protein is obtained from autotrophic cultures of the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. However, some culture characteristics makes attractive the use of *G. sulphuraria* to produce PC. This extremophilic microalga can thrive at pH values lower than 3 and temperatures above 40 °C, which helps to maintain axenic cultures. Furthermore, this microalga can grow under heterotrophic (in the absence of light), autotrophic and mixotrophic conditions. The extracted PC from this microalga has a higher thermostability than the obtained from *A. platensis*. In this work an overview of phycocyanin function and structure, as well as the general characteristics of microalgae *G. sulphuraria*, the diversity of cultures for its growth assessment, and the strategies used to increase PC accumulation is presented. These strategies include the use of different carbon sources, intensity and wavelength of light, culture techniques, and the role of PC as a nitrogen reservoir.

Key words: Phycocyanin, Red microalgae, *Galdieria sulphuraria*.

Introducción

La ficocianina (FC) es un pigmento fotosintético accesorio que se encuentra presente en cianobacterias y en las microalgas rodofitas, criptofitas y glaucofitas. Esta proteína está catalogada como una ficobiliproteína (FBP), que en conjunto con otras FBP (aloficocianina y ficoeritrina, principalmente) constituyen complejos supramoleculares altamente organizados denominados ficobilisomas (Glazer and Clark, 1986). Estos complejos son los principales recolectores de luz en las cianobacterias y algunos *phyla* de microalgas (figura 1).

Las FBP abarcan cerca del 80% del peso seco del ficobilisoma, el 20% restante lo conforman proteínas no pigmentadas, las cuales se encargan de unir y estabilizar el ficobilisoma a la membrana externa del tilacoide (Bryant et al., 1979). Una de las funciones de los tilacoides es capturar la energía lumínica para luego transferirse a los centros de reacción, donde se lleva a cabo la fotólisis del agua generando electrones, protones y oxígeno (MacColl, 1998).

Las FBP se encuentran ordenadas en los ficobilisomas con base en la emisión de fluorescencia y absorción de cada FBP (figura 1) y se sugiere que la transición de fotones se lleva a cabo en el siguiente orden: ficoeritrina → ficocianina → aloficocianina → fotosistemas I ó II (Zilinskas and Howell, 1983). Un modelo del proceso de absorción y utilización de energía presente en las plantas y microalgas se muestra en la figura 2.

Ficocianina, usos, estructura y estabilidad

La FC (figura 3A) es un pigmento fotosintético de color azul brillante. La coloración característica se debe a que su estructura contiene un tetrapirrol lineal denominado ficocianobilina que en su estructura tiene enlaces dobles y sencillos alternados (sistema conjugado; figura 3B), que le permiten deslocalizar electrones en respuesta a una excitación luminosa a una longitud de onda máxima de 620 nm; este tetrapirrol se encuentra estabilizado dentro de la proteína por la unión a un residuo cisteína mediante un enlace tioéster (Mulders et al., 2014).

Dos subunidades proteicas conforman a la ficocianina, una denominada α (~18 kDa) y la otra β (~20 kDa). Las diferencias entre éstas versan, principalmente, en que la subunidad β cuenta con dos moléculas del cromóforo ficocianobilina, mientras que la subunidad α sólo presenta una. La conformación de la proteína cuaternaria depende del pH en el que se encuentra: en un rango de pH de 5 a 6 la conformación mayoritariamente se encuentra es un hexámero $(\alpha\beta)_6$, mientras que a un pH de 7 la estructura cuaternaria se encuentra principalmente en forma de trímero $(\alpha\beta)_3$ (Bryant et al., 1979).

La producción de FC, al igual que otros colorantes naturales del ficobilisoma, es atractiva a múltiples industrias, principalmente la alimentaria y la farmacéutica, debido a que existen reportes en donde se demuestra que los colorantes químicos se encuentran

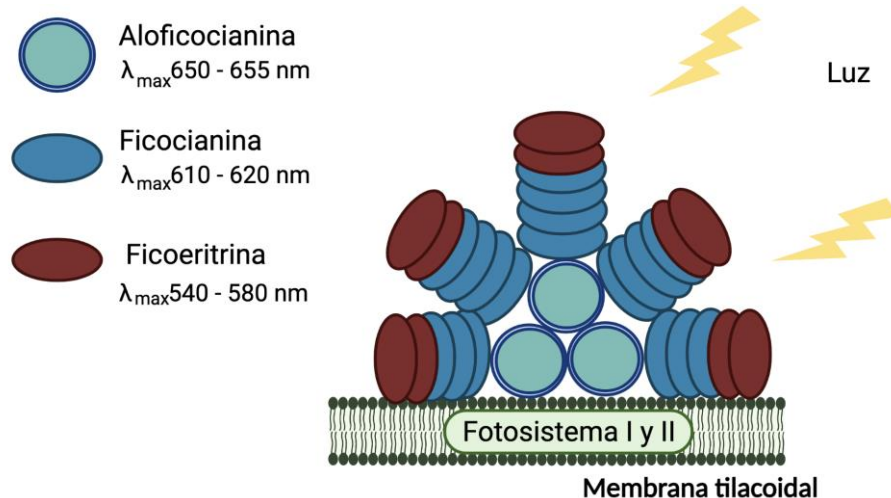


Figura 1. Diagrama del ficobilisoma situado en la membrana tilacoideal. Se presenta la distribución de ficobiliproteínas que funcionan como fotorreceptores y transfieren la energía hacia los fotosistemas I y II.

(Modificado de Gaiqnard et al. 2019).

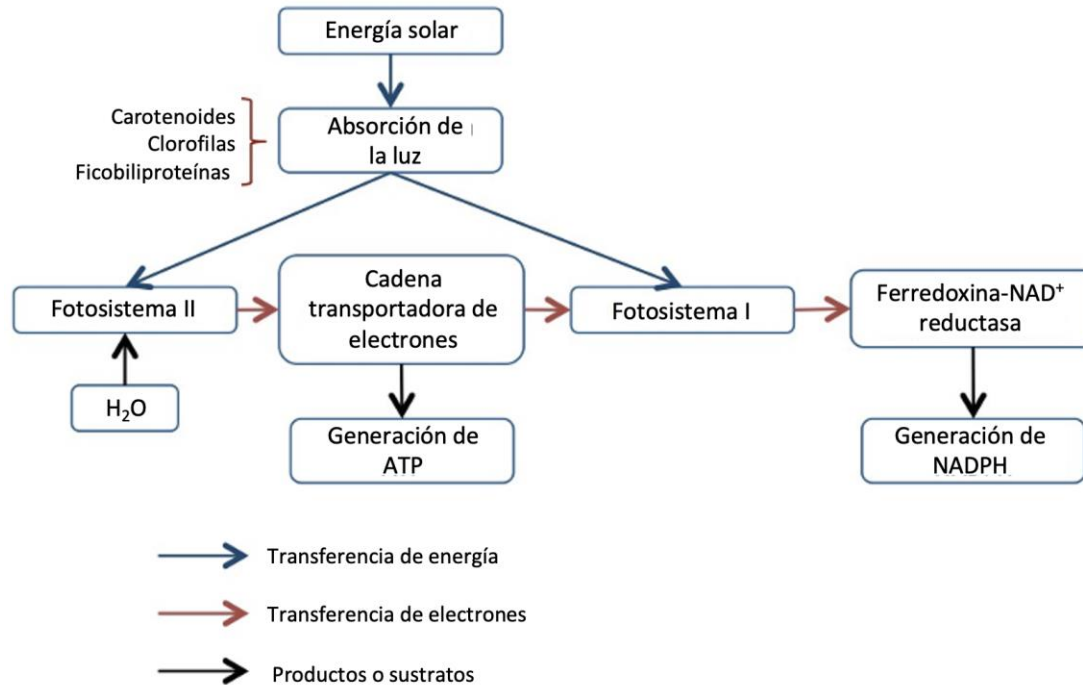


Figura 2. Diagrama simplificado de la absorción de luz y transporte de electrones en microalgas. (Modificado de Zilinskas y Howell, 1983).

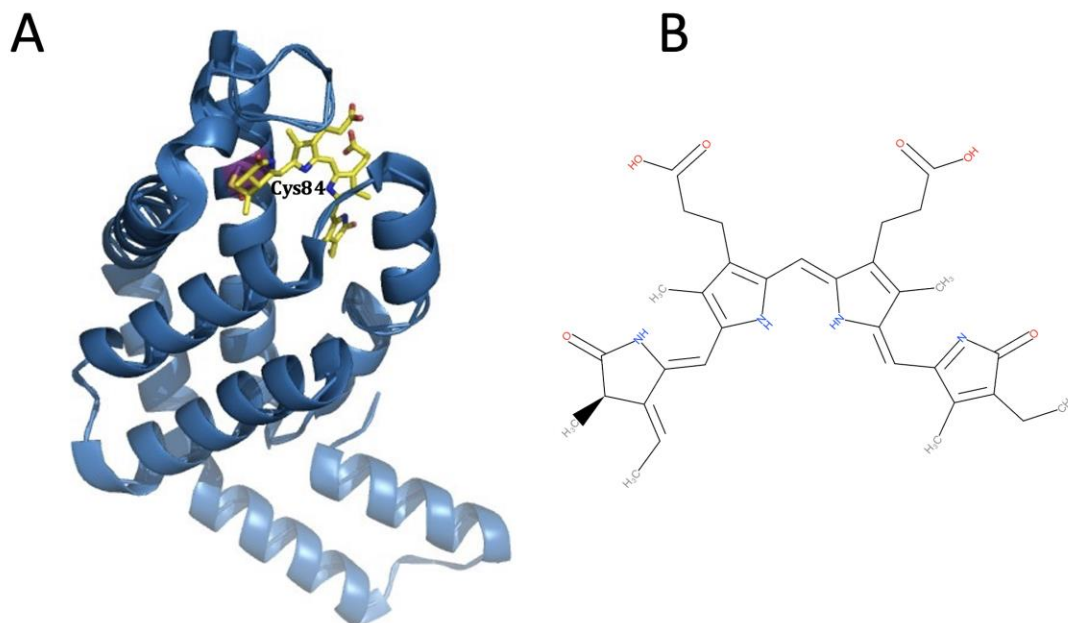


Figura 3. Estructura de las ficobiliproteínas, las cuales están compuestas por una parte proteica y un tetrapirrol unido mediante un enlace covalente a un residuo cisteína. (A) Ficocianina de la cianobacteria *Phormidium rubidum*. (B) Ficocianobilina: estructura con enlaces dobles y sencillos alternados que le permiten deslocalizar electrones en respuesta a una excitación luminosa. (Figura de autoría propia).

relacionados con enfermedades infantiles, principalmente como la hiperactividad y conductas donde se altera la atención (Mulders et al., 2014). Aunado a esto, los consumidores optan por adquirir “productos ecológicos” y con menor impacto ambiental en su obtención, con lo cual se presume que tendrá un impacto en las ventas de los productos que opten por estas alternativas. Actualmente, diferentes líneas de investigación se desarrollan con fines de estudio básico y de la optimización en la producción de estos pigmentos de origen natural.

Debido a su pigmentación brillante, naturaleza no tóxica y capacidad antioxidante, las FBP se consumen como suplementos alimenticios, ya sea como cultivos celulares liofilizados o bien en extractos purificados donde predominan estas proteínas. Las FBP también se emplean en diversas aplicaciones, entre las que destacan: agentes antioxidantes, neuroprotectores, hepatoprotectores, anticancerígenos, y colorantes en cosméticos y alimentos (Morales-Sánchez et al., 2016). Dentro de sus aplicaciones, en el área de análisis inmunoquímicos se emplea a las FBP como marcadores fluorescentes en ensayos de citometría de flujo, en ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), técnicas de histoquímica y para la detección de especies reactivas de oxígeno (Eriksen, 2008). Actualmente existen más de 30 patentes a nivel internacional relacionadas con la producción de FBP, y su utilización en diferentes industrias como la farmacéutica, alimentaria y terapéutica, entre otras (Sekar & Chandramohan, 2008), por lo cual existe una necesidad específica de incrementar la producción de estas proteínas pigmentadas a nivel comercial.

Estas proteínas se encuentran en diferentes especies de microalgas y cianobacterias; se han realizado estudios para describir las diferencias o particularidades de las FCs presentes en los diferentes organismos que las producen. Se ha observado que, aunque todas las FCs contienen el mismo cromóforo (ficocianobilina), existen diferencias en la estabilidad de estas moléculas. Estas diferencias se deben a la composición aminoacídica de la parte proteica ya que presentan un mayor número de residuos

cisteína, los cuales forman enlaces disulfuro que estabilizan la proteína; no obstante, estas diferencias no afectan la estructura terciaria de las proteínas. Con base en el alineamiento de la cadena de aminoácidos de ficocianinas de diferentes organismos, se encontró que su composición de aminoácidos está muy conservada y que, además, presentan una alta proporción de cadena alfa hélices en su conformación secundaria y, por tanto, a nivel de estructura terciaria son muy similares (Eriksen, 2008).

Actualmente la FC más comercializada es la obtenida de la cianobacteria *A. platensis* (conocida comúnmente como Espirulina), y debido al incremento en el uso de colorantes naturales, la demanda de esta proteína ha aumentado, y es por esto por lo que se analizan nuevas técnicas de producción y fuentes de extracción. Aunque existen diversas microalgas que producen esta proteína, la obtención de FC de la microalga roja *Galdieria sulphuraria* es muy atractiva debido a sus características metabólicas y extremófilas, las cuales se describen a continuación.

***Galdieria sulphuraria* y ficocianina: características y propiedades**

G. sulphuraria se encuentra dentro de la clase *Cyanidiophyceae*; estas microalgas tienen la capacidad de crecer en ambientes extremos, como fuentes termales y geiseres, usualmente asociadas a localidades donde existe actividad volcánica y aguas sulfurosas. Estas condiciones derivan en un ambiente hostil para la mayoría de los organismos, como un pH menor a tres y temperaturas en el rango de 50 a 80 °C (Brock et al., 2003). Las microalgas *Cyanidiophyceae* son una clase del filo Rhodophyta (algas rojas) que, junto con las plantas verdes (*Viridiplantae*), glaucófitas (*Glaucophyta*) y cianobacterias, son organismos fotosintéticos (Reyes-Prieto et al., 2007). La clase *Cyanidiophyceae* incluye en su mayoría microalgas extremófilas, las cuales se dividen en tres géneros que son: *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* y *Galdieria* (Albertano et al., 2000). Dentro de la clase *Cyanidiophyceae* el único género que también presenta la capacidad de crecer en ausencia de una fuente luminosa es el género *Galdieria*, esto derivado de su capacidad de metabolizar diversos compuestos orgánicos como fuente de energía. Algunas características de este género de algas eucariotas unicelulares

Artículos

incluyen una morfología esférica, reproducción por medio de endosporas (4-8 endosporas), no cuentan con una pared celular sin embargo, presentan una cubierta de exopolisacáridos. De acuerdo con lo reportado por Albertano et al. (2000) y Gaignard et al. (2019), *G. sulphuraria* cuenta con un solo cloroplasto; sin embargo, presenta varias mitocondrias (>3 por célula), esto difiere de las demás microalgas rojas hasta la fecha reportadas, ya que solo presentan una mitocondria. Una representación gráfica de la estructura de *G. sulphuraria* se muestra en la figura 4.

Entre sus características metabólicas, *G. sulphuraria* tiene la capacidad de utilizar más de 30 diferentes biomoléculas como fuente de carbono, tales como hexosas, pentosas y polioles (alcoholes de azúcares), entre otros (Oesterhelt et al., 1999). Un resumen de las fuentes de carbono que se han reportado puede consumirse se presentan en la tabla 1. Aunque se ha determinado que *G. sulphuraria* es capaz de crecer en diferentes fuentes de carbono, la caracterización del crecimiento a detalle en estas fuentes no se ha evaluado, únicamente

se ha caracterizado el crecimiento de esta microalga con glucosa, glicerol, fructosa y sacarosa (Sloth et al., 2006). Como resultado de estas caracterizaciones se ha demostrado que el crecimiento celular y, por lo tanto, la productividad de biomasa obtenida en cultivos heterotróficos y mixotróficos se encuentra por encima de los reportados para otras microalgas capaces de crecer en cultivos heterotróficos suplementados con glucosa, p. ej. *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella vulgaris* (Guldhe et al., 2017). El modelo para explicar su eficiente crecimiento propone que su metabolismo al utilizar glucosa se encuentra relacionado con el pH ácido del medio en que se encuentra, ya que los transportadores reportados para microalgas (incluida *G. sulphuraria*) son del tipo simporte (Stadler et al., 1995), por lo cual translocan dos moléculas simultáneamente (azúcar y H^+). Al transportar el protón del medio de cultivo (pH 2) al interior de la célula (pH 7) genera la energía suficiente para translocar a la glucosa, lo que hace al proceso muy eficiente en comparación con las microalgas que habitan en pH cercanos a 7 y que probablemente requieren de ATP para transportar a la glucosa.

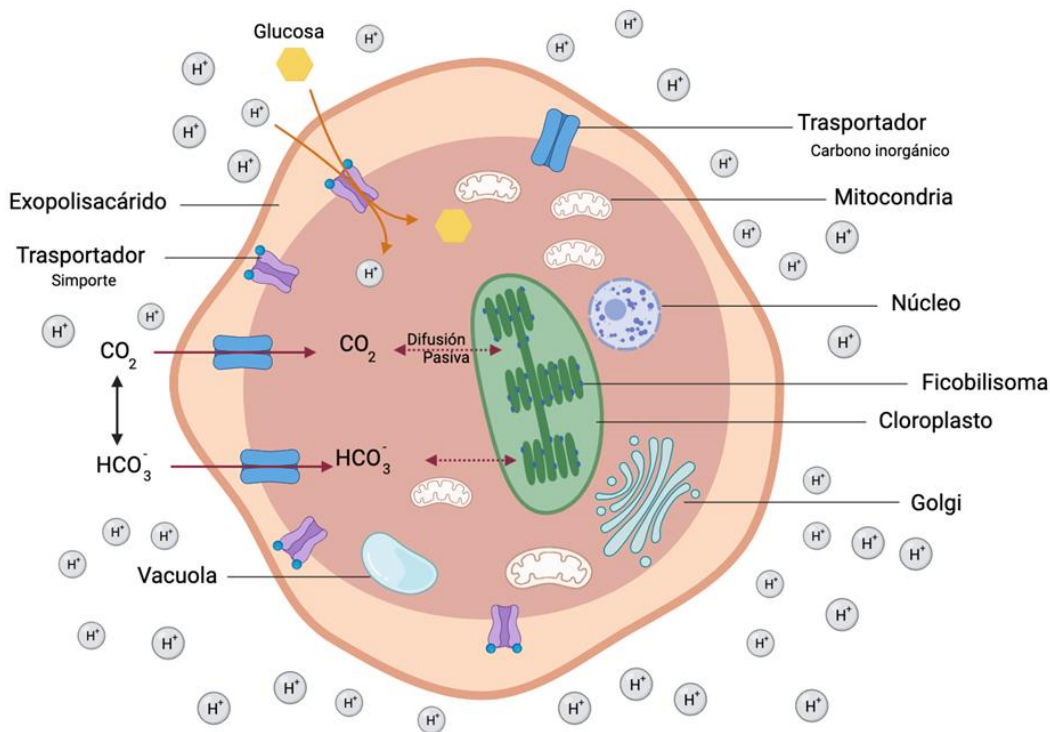


Figura 4. Esquema general de la microalga roja *G. sulphuraria*. Ésta cuenta con un cloroplasto y varias mitocondrias (>3 por célula). Se muestra la presencia de algunos transportadores de moléculas orgánicas e inorgánicas, los cuales le proporcionan la capacidad para crecer bajo condiciones heterotróficas, autotróficas y mixotróficas.

Artículos

Tabla 1. Fuentes de carbono a (hexosas, pentosas y polioles) reportadas como sustratos utilizados por *Galdieria sulphuraria* cepa MBI (Adaptado de Oesterhelt et al 1999).

Hexosas	Pentosas	Polioles
D-Glucosa	D-Xilosa	D-Sorbitol
D-Manosa	D-Ribosa	D-Manitol
D-Galactosa	D-Arabinosa	D-Arabitol
D- Fructosa		L-Arabitol
6-Deoxi-glucosa		Xilitol
D-Sorbosa		Dulcitol
L-Fucosa		Ribitol
L-Ramnosa		

Nota: Se utilizó una concentración de 125 mM para todas las fuentes de carbono

Con el objetivo de reforzar la clasificación taxonómica de la clase *Cyanidiophyceae*, Cozzolino et al. (2000), realizaron un estudio filogenético utilizando los genes que codifican para la subunidad larga de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo; codificada por el gen *rbcL*). Para este estudio se utilizó la secuencia del *rbcL* de diferentes microalgas recolectadas en diversas localidades del mundo. Como resultado de este estudio se determinó que existen diferencias genéticas que permiten separar los géneros *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* y *Galdieria*. Además, se observó que las cepas de *Galdieria* usadas en diferentes investigaciones, se encuentran estrechamente relacionadas sin importar su distribución geográfica (figura 5).

Debido a las características de las *Cyanidiophyceae* (crecimiento en condiciones extremas), se ha evaluado la estabilidad de la FC producida por esta clase, encontrando que es estable a altas temperaturas. Su estabilidad se pierde a temperaturas superiores a los 60 °C, mientras que la obtenida de *A. platensis* se desestabiliza a los 47 °C (Moon et al., 2014; Rahman et al., 2017). Estudios donde se evaluó la cinética de desnaturalización de la FC, con base en la velocidad de pérdida en su coloración, mostraron que al incubar la ficocianina de *G. sulphuraria* y *A. platensis* a 60 °C durante 30 minutos a pH 7, la pérdida de la coloración es equivalente al 13.34 y 39.17%, respectivamente. Estos investigadores, también demostraron que el tiempo de vida media de la FC de *G. sulphuraria* es 3 veces

mayor que el de la FC de *A. platensis*. Probablemente, las diferencias en estabilidad de las diferentes FCs esté relacionada con el alto número de residuos cisteína encontrados en la secuencia de aminoácidos de la ficocianina de *Galdieria*. Asimismo, se evaluó la capacidad antioxidante de ambas moléculas y se encontró que su poder antioxidante es similar, por estas razones la ficocianina extraída de la microalga *G. sulphuraria* es un producto competitivo en el mercado (Carfagna et al., 2018).

Cultivo de microalgas

Debido a que *G. sulphuraria* tiene la capacidad de crecer en diferentes condiciones de cultivo, en esta sección se presenta un resumen de las condiciones de cultivo para crecer esta microalga. El cultivo de microalgas a gran escala se usa para producir biomasa y metabolitos específicos como carotenoides, lípidos, FBPs y toxinas específicas, entre otros (Mulders et al., 2014). La producción de estos metabolitos, así como su biomasa, está directamente relacionada con las condiciones del cultivo las cuales se clasificaron en cuatro tipos (Chojnacka & Noworyta, 2004). (A) *Fotoautotrofia*: Donde la luz se usa como fuente de energía (fotosíntesis) y la fuente de carbono proviene de la asimilación del dióxido de carbono (CO₂). (B) *Heterotrofia*: Donde tanto la obtención de energía como la fuente de carbono proviene del catabolismo de una fuente de carbono orgánico, y el crecimiento se lleva a cabo en condiciones de obscuridad. (C) *Mixotrofia*: El crecimiento se da tanto por fotosíntesis como por heterotrofia y, por lo tanto, la fuente de carbono es de origen

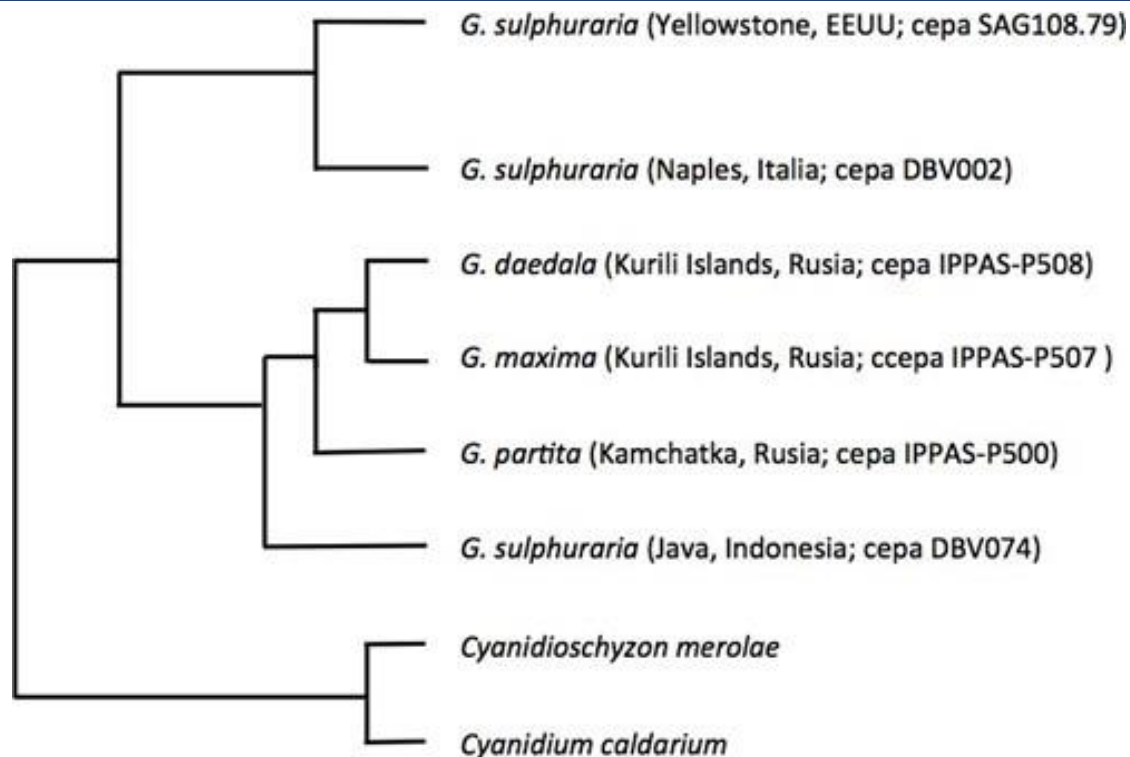


Figura 5. Fenograma donde se representa la relación dentro de la clase *Cyanidiophyceae*.
Modificado de (Cozzolino et al., 2000).

orgánico e inorgánico. (D) *Fotoheterotrofia*: Cultivo en donde la energía se obtiene tanto por fotosíntesis como por heterotrofia; no obstante, las estructuras de carbono necesarias para su anabolismo provienen únicamente de los compuestos orgánicos.

Debido a que existen pocas especies de microalgas capaces de asimilar y metabolizar fuentes de carbono orgánicas, en la mayoría de los casos el cultivo de microalgas se realiza en condiciones fotótrofas, en reactores al aire libre, debido a los bajos costos que representa su instalación y manteniendo. Sin embargo, los cultivos al aire libre tienen algunos inconvenientes, tales como una baja concentración de biomasa final (1-3 g/l) debido a la escasa difusión de luz dentro del cultivo, ya que a bajas intensidades de luz el proceso de fotosíntesis disminuye; así mismo los cultivos abiertos están propensos a contaminaciones, y no es posible controlar la temperatura del cultivo, ya que depende de la temperatura del ambiente, lo cual provoca que la productividad de biomasa se dependa de la estación del año en que se

trabaje y la localidad geográfica en la que se encuentre el cultivo (Siqueira et al., 2020). Los foto-reactores son una alternativa para evitar estos inconvenientes del cultivo bajo condiciones autótrofas. En los foto-reactores es posible controlar las condiciones de cultivo (intensidad de luz, temperatura y pH) y se puede garantizar la esterilidad del medio y cultivos axénicos. Por estas razones, los foto-reactores se emplean preferentemente para la producción de metabolitos dirigidos a las industrias farmacéutica y alimentaria (Chen & Chen, 2006). El mayor inconveniente de estos reactores es su alto costo, debido a que el material debe ser transparente y resistente a químicos abrasivos, además, del alto costo de mantenimiento del cultivo ya que los reactores se mantienen iluminados artificialmente, durante todo el proceso.

Una alternativa para el crecimiento a altas densidades celulares de microalgas es el uso de cultivos heterotróficos. Sin embargo, existe un grupo muy pequeño de microalgas que crecen en condiciones heterotróficas, p. ej. de los géneros *Chlorella* (Guldhe et al., 2017),

Neochloris (Morales-Sánchez et al., 2014) y *Galdieria* (Weber et al., 2004), debido a que cuentan con los transportadores y las vías metabólicas necesarias para translocar la fuente de carbono del medio de cultivo al interior de la célula y posteriormente realizar su catabolismo. El metabolismo heterotrófico de las fuentes de carbono en las microalgas se puede llevar a cabo en diferentes compartimientos celulares, como lo son: el cloroplasto, el citoplasma, la mitocondria y el glioxisoma (Morales-Sánchez et al., 2015). Cabe puntualizar que, aunque las microalgas cuentan con algunas vías metabólicas necesarias para utilizar biomoléculas como fuente de energía, la ausencia de transportadores específicos es el principal cuello de botella en este metabolismo ya que, para poder utilizar las fuentes de carbono, éstas deben atravesar la membrana plasmática (Fiechter & Seghezzi, 1992).

Diferentes géneros de microalgas han demostrado la capacidad de utilizar fuentes de carbono orgánico, y se han realizado estudios en los que se compara la velocidad de crecimiento en condiciones heterotróficas, autótrofas y mixotróficas. Como resultado se observa que la mayoría de microalgas presentan mayores velocidades de crecimiento en condiciones autótrofas; debido a que la internalización que tienen de los substratos orgánicos es baja (Lee, 2001). Sin embargo, existen microalgas las cuales presentan mejores velocidades de crecimiento en condiciones heterotróficas en comparación con ambientes autótrofos. Esto se debe a que la energía obtenida en forma de ATP, así como la cantidad de NADH y NADPH generados por medio de catabolismo de compuestos orgánicos, es mayor a la obtenida por medio de la fotosíntesis, lo que facilita el rápido crecimiento de las microalgas que tienen la capacidad de crecer en heterotrofia (Graverholt & Eriksen, 2007; Morales-Sánchez et al., 2014). En las microalgas que presentan buen crecimiento en condiciones heterotróficas se ha observado que existe una sinergia en el crecimiento cuando se utilizan condiciones mixotróficas. Esta sinergia se debe a la producción y asimilación de CO₂ de las microalgas que presentan un metabolismo heterótrofo y autótrofo, respectivamente.

Producción de ficocianina en la microalga roja *G. sulphuraria*

La FC actualmente comercializada proveniente de la cepa *A. platensis* (*Spirulina*); no obstante, como se menciona anteriormente, el *phylo* Rhodophyta específicamente, *G. sulphuraria* es foco de atención para la producción de esta proteína pigmentada. A continuación, se describen los principales resultados reportados a nivel de investigación para la producción de ficocianina con *G. sulphuraria* (tabla 2).

Los ficobilisomas son un complejo antena accesoria, por lo que su generación se encuentra altamente relacionada con la presencia de luz y, normalmente, las cepas que crecen en ausencia de luz no presentan pigmentos accesorios como las ficobiliproteínas y carotenoides.

La producción de ficocianina en *Galdieria* se ha centrado principalmente en cultivos heterótrofos, debido a que, en comparación con los cultivos autótrofos, se puede obtener una alta concentración de biomasa en poco tiempo. No obstante, la concentración de ficocianina en cultivos sin exposición a la luz es baja, y, en algunas cepas, inclusive se puede perder este pigmento como lo observaron Gross & Schnarrenberger (1995) quienes evaluaron las cepas de *G. sulphuraria* 074G y 074W, aisladas del mismo nicho ecológico en Indonesia. Ambas cepas presentaron el mismo comportamiento y pigmentación en cultivos autótrofos; sin embargo, encontraron que la cepa 074W al cultivarse en ausencia de luz perdió su coloración mientras que la cepa 074G, inclusive después de ser cultivada durante dos años en obscuridad, mantuvo su pigmentación debido a la presencia de estas FBP's (Gross & Schnarrenberger, 1995). También, es por esto por lo que la mayoría de los trabajos realizados con *G. sulphuraria* para la producción de FC utilizan la cepa 074G.

Actualmente no existe información suficiente sobre la síntesis de FC en cepas de *G. sulphuraria* bajo las diferentes condiciones de cultivo indicadas al inicio de esta sección. No obstante, se han estudiado diferentes ambientes de crecimiento y se ha demostrado que existen condiciones donde se favorece la

Artículos

Tabla 2. Estrategias de cultivo utilizadas en la producción de ficocianina utilizando las cepas de *G. sulphuraria* y *A. platensis*

Microorganismo	Reactor	Fuente de Carbono	Volumen (l)	Biomasa (g/l)	Rendimiento (g _{FC} /g _{biomasa})	Productividad (g _{FC} /l día)	Referencia
Cultivos abiertos							
<i>A. platensis</i>	"Raceway"	CO ₂	135000	0.47	0.061	0.003	Jiménez et al. (2003)
<i>A. platensis</i>	"Raceway"	CO ₂	300	0.9	0.067	0.01	Pushparaj et al. (1997)
<i>A. platensis</i>	"Raceway"	CO ₂	300	1.6	0.074	0.024	Pushparaj et al. (1997)
<i>G. sulphuraria</i>	"Raceway"	CO ₂	15	2.23	0.098	0.016	Wang et al. (2020)
Cultivos cerrados							
<i>A. platensis</i>	Tubular	CO ₂	11	5	0.07	0.092	Carlozzi (2003)
<i>A. platensis</i>	Tubular	CO ₂	12	3	0.07	0.064	Zitelli et al. (1996)
<i>A. platensis</i>	Panel alveolar	CO ₂	6	6.9	0.07	0.089	Tredici et al. (1991)
Cultivos mixotróficos							
<i>A. platensis</i>	Alimentado	Glucosa	2.5	10.2	0.107	0.087	Chen and Zhang (1997)
<i>A. platensis</i>	Lote	Glucosa	0.1	2.52	0.131	0.22	Marquez et al. (1993)
<i>G. sulphuraria</i>	Lote	Glucosa	0.1	2.5	0.02	0.0125	Sloth et al (2006)
<i>G. sulphuraria</i>	Lote	Glicerol	0.1	3.2	0.04	0.032	Sloth et al (2006)
Cultivos heterotróficos							
<i>S. platensis</i>	Lote	Glucosa	0.1	0.83	0.058	0.01	Marquez et al. (1993)
<i>G. sulphuraria</i>	Lote	Glucosa	0.1	2.5	0.02	0.0125	Sloth et al (2006)
<i>G. sulphuraria</i>	Alimentado	Glucosa	2.5	109	0.027	0.47	Graverholt & Eriksen (2007)
<i>G. sulphuraria</i>	Quimioestado	Glucosa	2.5	83.3	0.16	0.086	Graverholt & Eriksen (2007)
<i>G. sulphuraria</i>	Heterotrófico	Glucosa	0.3	4.6	0.056	-	Graverholt & Eriksen (2007)
<i>G. sulphuraria</i>	Heterotrofia-Dilución-Fotoinducción	Glucosa	300 ml+ 1l	240	0.132	2.209	(Wan et al., 2016)

acumulación de esta proteína. Por esto, la mayoría de las investigaciones tratan de aumentar la productividad de FC, la cual se ve reflejada cuando se logra una elevada concentración final de biomasa en un tiempo corto y también por incrementos en la acumulación intracelular de FC. En este contexto, Graverholt y Eriksen (2007), compararon la producción de FC entre una cepa de *A. platensis* y *G. sulphuraria*. *A. platensis* se cultivó autotróficamente en cultivos abiertos y *G. sulphuraria*

heterotróficamente en cultivos alimentados, usando glucosa como fuente de carbono. Estos autores reportan que en comparación con la cianobacteria cultivada autotróficamente la cepa de *G. sulphuraria* en heterotrofia produjo FC a velocidades 1.7 a 13.6 veces mayor, ya que, aunque la concentración de ficocianina es menor a la encontrada en la cianobacteria (cultivo autótrofo), la producción de biomasa es mayor comparada con la producida por *A. platensis* (Graverholt & Eriksen, 2007).

Principales factores que afectan la productividad de ficocianina en *G. sulphuraria*

Estado de inanición

En cultivos heterótrofos y mixotróficos, que una vez agotada la fuente de carbono, la cepa entra en un estado de inanición por carbono y, como respuesta al estrés generado, se observa un incremento de FC de hasta el 300% en 24 h en comparación al pigmento cuantificado sin condiciones de estrés (Gross and Schnarrenberger, 1995). Adicionalmente se ha reportado que este efecto depende de la fuente de carbono. En cultivos en lote, donde se utilizó como fuente de carbono, fructosa, glucosa o glicerol (Sloth et al., 2006), se observó que 24 horas después de agotarse la fuente de carbono, pero con exceso de la fuente de nitrógeno, se incrementó la acumulación de FC. Sin embargo, en los cultivos donde se utilizó glicerol, la acumulación presente se duplicó en comparación con los cultivos que utilizaron glucosa y fructosa. Actualmente no se conocen las bases de este efecto.

Intensidad y longitud de onda de la luz

La ficocianina, al ser un pigmento secundario en el proceso de fotosíntesis, tiende a incrementar su concentración dentro de la célula cuando la intensidad de la luz es menor a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ya que a esta intensidad de luz la clorofila no puede absorber los fotones suficientes que permitan llevar a cabo las funciones básicas de metabolismo celular. En consecuencia, para aprovechar mejor la poca intensidad luminosa, se sintetizan más ficobilisomas (Sloth et al., 2006). Además, aunque todavía no está estudiado en *G. sulphuraria*, para *A. platensis*, además de observarse el efecto en la intensidad de luz descrito anteriormente, se sabe que dependiendo la longitud de onda utilizada es posible afectar la acumulación de ficocianina o ficoeritrina. Bajo la misma premisa discutida previamente, la clorofila absorbe fotones a longitudes de onda de 400 a 500 nm, mientras que la ficocianina absorbe a 620 nm, por lo que, si los cultivos son expuestos a la longitud de onda equivalente a la luz roja (en el intervalo de longitud de onda donde la FC absorbe fotones), la acumulación de ficocianina aumenta (Raeisossadati et al., 2019).

Concentración de oxígeno disuelto

Anteriormente se postuló que la glucosa inhibía la producción de clorofila y ficocianina en cultivos heterotróficos (Stadnichuk et al., 1998). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que este efecto de disminución del contenido de FC se debe a una limitación de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Debido a que la concentración celular en condiciones heterotróficas es alta y la transferencia de oxígeno insuficiente, por lo que se generan condiciones de limitación de oxígeno disuelto cercanas a cero en el medio de cultivo. En particular, se determinó que el oxígeno disuelto debe ser mayor a cero para que la enzima “coproporfirinógeno oxidasa” pueda llevar a cabo una catálisis eficiente. Cabe aclarar que esta oxidasa se necesita para la biosíntesis de intermediarios de clorofila y ficobilina (Sarian et al., 2016). Estudios realizados en quimiostato, mostraron que es posible aumentar la productividad de FC, e incrementar la concentración de biomasa final mediante el control de la velocidad de adición de la fuente de carbono. Esta operación, aunada a una recuperación simultánea de biomasa, permiten generar condiciones en las cuales el oxígeno no es limitante, es decir, que el nivel de oxígeno disuelto en el medio de cultivo es mayor a cero (Graverholt & Eriksen, 2007).

Concentraciones iniciales de biomasa y fuentes de carbono

Wan et al. (2016) demostraron que la concentración inicial de biomasa, en cultivos autotróficos con células provenientes de cultivos heterotróficos, tiene un impacto en el contenido de FC y en la producción de biomasa final. Evaluando diferentes concentraciones de biomasa inicial (0.1 a 1.5 g/l) en la etapa autotrófica, determinaron que las mejores concentraciones iniciales para la producción de biomasa y rendimiento de FC final son de 1.5 g/l y 0.6 g/l respectivamente (Wan et al., 2016).

Disponibilidad de nitrógeno

Como se comentó anteriormente, resultado de la inanición por carbono en cultivos heterotróficos, se observó la acumulación de FC, siempre y cuando exista un exceso de la fuente de nitrógeno (NH_4) en

el medio de cultivo. Se ha reportado que, con un exceso de nitrógeno, equivalente a una relación molar de 50:1 (mol de carbono: mol de nitrógeno), se promueve la acumulación de FC (Sloth et al., 2006). Esto se debe a que la FC también funciona como un reservorio de nitrógeno. Se han realizado estudios en cianobacterias y en *G. sulphuraria* cepa 011, donde cultivos que se encuentran limitados en nitrógeno, tienden a perder su coloración característica (verde-azul) debido a un efecto llamado blanqueamiento (Salbitani & Carfagna, 2020). En estos estudios se ha descrito que las primeras estructuras pigmentadas que se pierden son las FBPs, ya que se usan como fuente de nitrógeno. Con el propósito de tener una mayor producción de FC se ha estudiado la cinética de degradación de ésta, actualmente existen estudios enfocados en tratar de evitar la degradación de FC en cultivos con limitación de nitrógeno y donde esta proteína podría proporcionar la fuente de nitrógeno. En esos trabajos se demuestra que el proceso de autofagia, que es el principalmente usado para la degradación de proteínas, no se encuentra presente en algas rojas como *G. sulphuraria* y, en cambio, para la degradación de las macro estructuras como los ficobilisomas de ficocianina, esta microalga utiliza una proteína adaptadora responsable del reconocimiento del ficobilisoma y el complejo de degradación proteasa Clp, para la hidrólisis de la FC (Salbitani & Carfagna, 2020).

G. sulphuraria surge como una microalga roja prometedora para mejorar la obtención de ficocinina en cultivos heterotóxicos a gran escala debido a su alta productividad de biomasa y las condiciones de su cultivo que facilitan controlar los cultivos axénicos. Como se ha indicado en esta sección, se tienen varios avances en la producción de biomasa y ficocianina utilizando *G. sulphuraria*; sin embargo, es deseable desarrollar nuevas estrategias para incrementar su producción. Una de estas estrategias puede ser la generación de células genéticamente modificadas, por ejemplo, empleando promotores fuertes que pudieran impactar en varios genes de su vía biosintética de la FC. También, sería deseable formar vínculos entre grupos de investigación y tecnólogos industriales para poder lograr su sobreproducción a un bajo costo.

Conclusiones

La ficocianina posee un gran potencial de aplicaciones prácticas, principalmente debido a sus propiedades fluorescentes, cromóforas y antioxidantes, las cuales, a partir de la ficocianina obtenida de *A. platensis*, ya se han explotado en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. El desarrollo de estrategias para la obtención de ficocianina, competitivas con las estrategias empleadas actualmente para producir el pigmento con *A. platensis*, es de interés biotecnológico. El uso de la microalga roja *G. sulphuraria*, es una alternativa atractiva para la obtención de dicho pigmento, principalmente por su capacidad de crecer y producir ficocianina en condiciones acidófilas y a temperaturas relativamente elevadas, así como a su capacidad de crecer en condiciones autótrofas, mixotróficas y heterotróficas, y a acumular FC. Finalmente, debido a la gran plasticidad metabólica, *G. sulphuraria* abre la oportunidad de utilizar un amplio espectro de fuentes de carbonos en la generación de biomasa y obtención de ficocianina para aplicaciones en diferentes campos de la industria.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM: IT201119. FVLP, CAMH y RAAC recibieron becas de posgrado de CONACyT.

Referencias

- Albertano P, Ciniglia C, Pinto G, Pollio A (2000) The taxonomic position of *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* and *Galdieria*: An update. *Hydrobiología* 433:137-143. <https://doi.org/10.1023/A:1004031123806>
- Allen MN (1986) The cultivation of myxophyceae. *Archiv. Mikrobiol.* 17:34-53. <https://doi.org/10.1007/BF00410816>
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2003) *Brock biology of microorganisms*, 10th ed. Prentice-Hall.
- Bryant DA, Guglielmi G, de Marsac NT, Castets AM, Cohen-Bazire G (1979) The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Arch. Microbiol.* 123:113-127. <https://doi.org/10.1007/BF00446810>

- Carfagna S, Landi V, Coraggio F, Salbitani G, Vona V, Pinto G, Pollio A, Ciniglia C (2018) Different characteristics of C-phycocyanin (C-PC) in two strains of the extremophilic *Galdieria phlegrea*. *Algal Res.* 31:406-412. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.030>
- Carlozzi P (2003) Dilution of solar radiation through "culture" lamination in photobioreactor rows facing south-north: A way to improve the efficiency of light utilization by cyanobacteria (*Arthrospira platensis*). *Biotechnol. Bioeng.* 81:305-315. <https://doi.org/10.1002/bit.10478>
- Chen GQ, Chen F (2006) Growing phototrophic cells without light. *Biotechnol. Lett.* 28:607-616. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-0025-4>
- Chojnacka K, Noworyta A (2004) Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 34:461-465. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.002>
- Cozzolino S, Caputo P, De Castro O, Moretti A, Pinto G (2000) Molecular variation in *Galdieria sulphuraria* (Galdieri) *Merola* and its bearing on taxonomy. *Hydrobiologia* 433: 145-151. <https://doi.org/10.1023/A:1004035224715>
- Eriksen NT (2008) Production of phycocyanin - A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:1-14. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1542-y>
- Fiechter A, Seghezzi W (1992) Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *J. Biotechnol.* 27:27-45. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90028-8)
- Gaignard C, Gargouch N, Dubessay P, Delattre C, Pierre G, Laroche C, Fendri I, Abdelkafi S, Michaud P (2019) New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnol. Adv.* 37:193-222. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.014>
- Glazer AN, Clark JH (1986) Phycobilisomes: Macromolecular structure and energy flow dynamics. *Biophys. J.* 49:115-116. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83616-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83616-5)
- Graverholt OS, Eriksen NT (2007) Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:69-75. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1150-2>
- Gross W, Schnarrenberger C (1995) Heterotrophic growth of two strains of the acido-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant Cell Physiol.* 36:633-638. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078803>
- Guldhe A, Ansari FA, Singh P, Bux F (2017) Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. *Ecol. Eng.* 99:47-53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.013>
- Jiménez C, Cossío BR, Labella D, Niell FX (2003) The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. *Aquaculture* 217:179-190. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00118-7)
- Lee KY (2001) Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *J. Appl. Phycol.* 13:307-315. <https://doi.org/10.1023/A:1017560006941>
- MacColl R (1998) Cyanobacterial phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* 124:311-334. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4062>
- Marquez FJ, Sasaki K, Kakizono T, Nishio N, Nagai S (1993) Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *J Ferment Bioeng* 76:408-410. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(93\)90034-6](https://doi.org/10.1016/0922-338X(93)90034-6)
- Moon M, Mishra SK, Kim CW, Suh WI, Park MS, Yang JW (2014) Isolation and characterization of thermostable phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Korean J. Chem. Eng.* 31:490-495. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0239-9>

- Morales-Sánchez D, Kyndt J, Ogden K, Martínez A (2016) Toward an understanding of lipid and starch accumulation in microalgae: A proteomic study of *Neochloris oleoabundans* cultivated under N-limited heterotrophic conditions. *Algal Res.* 20:22-34. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.006>
- Morales-Sánchez D, Martínez-Rodríguez OA, Kyndt J, Martínez A (2015) Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31:1-9. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1773-2>
- Morales-Sánchez D, Tinoco-Valencia R, Caro-Bermúdez MA, Martínez A (2014) Culturing *Neochloris oleoabundans* microalga in a nitrogen-limited, heterotrophic fed-batch system to enhance lipid and carbohydrate accumulation. *Algal Res.* 5:61-69. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.05.006>
- Mulders KJM, Lamers PP, Martens DE, Wijffels RH (2014) Phototrophic pigment production with microalgae: Biological constraints and opportunities. *J. Phycol.* 50:229-242. <https://doi.org/10.1111/jpy.12173>
- Oesterhelt C, Schnarrenberger C, Gross W (1999) Characterization of a sugar/polyol uptake system in the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Eur. J. Phycol.* 34: 271-277. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736322>
- Pushparaj B, Pelosi E, Tredici MR, Pinzani E, Materassi R (1997) An integrated culture system for outdoor production of microalgae and cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.* 9:113-119. <https://doi.org/10.1023/A:1007988924153>
- Raisossadati M, Moheimani NR, Parlevliet D (2019) Red and blue luminescent solar concentrators for increasing *Arthrospira platensis* biomass and phycocyanin productivity in outdoor raceway ponds. *Bioresour. Technol.* 291:121801. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121801>
- Rahman DY, Sarian FD, van Wijk A, Martínez-García M, van der Maarel MJEC (2017) Thermostable phycocyanin from the red microalga *Cyanidioschyzon merolae*, a new natural blue food colorant. *J. Appl. Phycol.* 29:1233-1239. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1007-0>
- Reyes-Prieto A, Weber APM, Bhattacharya D (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu. Rev. Genet.* 41:147-168. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130134>
- Rigano C, Fuggi A, Rigano VDM, Aliotta G (1976) Studies on utilization of 2-ketoglutarate, glutamate and other amino acids by the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. *Arch. Microbiol.* 107:133-138. <https://doi.org/10.1007/BF00446832>
- Salbitani G, Carfagna S (2020) Different behavior between autotrophic and heterotrophic *Galdieria sulphuraria* (Rhodophyta) cells to nitrogen starvation and restoration. Impact on pigment and free amino acid contents. *Int. J. Plant Biol.* 11:1-14. <https://doi.org/10.4081/pb.2020.8567>
- Sarian FD, Rahman DY, Schepers O, Van Der Maarel MJEC (2016) Effects of oxygen limitation on the biosynthesis of photo pigments in the red microalgae *Galdieria sulphuraria* strain 074g. *PLoS One* 11:1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148358>
- Sekar S, Chandramohan M (2008) Phycobiliproteins as a commodity: Trends applied research, patents and commercialization. *J. Appl. Phycol.* 20:113-136. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9188-1>
- Siqueira SF, Maroneze MM, Dias RR, Vendruscolo RG, Wagner R, de Menezes CR, Zepka LQ, Jacob-Lopes E (2020) Mapping the performance of photobioreactors for microalgae cultivation: geographic position and local climate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 95:2411-2420. <https://doi.org/10.1002/jctb.6423>
- Sloth JK, Wiebe MG, Eriksen NT (2006) Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme Microb. Technol.* 38:168-175. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.010>

Artículos

- Stadler R, Wolf K, Hilgarth C, Tanner W, Sauer N (1995) Subcellular localization of the inducible *Chlorella* HUP1 monosaccharide-H⁺ symporter and cloning of a co-induced galactose-H⁺ symporter. *Plant Physiol.* 107:33-41. <https://doi.org/10.1104/pp.107.1.33>
- Stadnichuk IN, Rakhimberdieva MG, Bolychevtseva YV, Yurina NP, Karapetyan NV, Selyakh, IO (1998) Inhibition by glucose of chlorophyll *a* and phycocyanobilin biosynthesis in the unicellular red alga *Galdieria partita* at the stage of coproporphyrinogen III formation. *Plant Sci.* 136:11-23. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00088-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00088-0)
- Tredici MR, Carozzi P, Chini Zittelli G, Materassi R (1991) A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* 38:153-159. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90147-C](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90147-C)
- Wan M, Wang Z, Zhang Z, Wang J, Li S, Yu A, Li Y (2016) A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Bioresour. Technol.* 218:272-278. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.045>
- Wang H, Zhang Z, Wan M, Wang R, Huang J, Zhang K, Guo J, Bai W, Li Y (2020) Comparative study on light attenuation models of *Galdieria sulphuraria* for efficient production of phycocyanin. *J. Appl. Phycol.* 32:165-174. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01982-8>
- Weber APM, Oesterhelt C, Gross W, Bräutigam A, Imboden LA, Krassovskaya I, Linka N, Truchina J, Schneidereit J, Voll H, Voll LM, Zimmermann M, Jamai A, Riekhof WR, Yu B, Garavito RM, Benning C (2004) EST-analysis of the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. *Plant Mol. Biol.* 55:17-32. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0376-y>
- Zilinskas BA, Howell DA (1983) Role of the colorless Polypeptides in phycobilisome assembly in *Nostoc* sp. *Plant Physiol.* 71:379-387. <https://doi.org/10.1104/pp.71.2.379>

Efecto de microplásticos en las microalgas

Monserrat Hernández-Maldonado* y Amelia Farrés

Lab. 312, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, CdMx

monserrat.hdez.m@gmail.com; farres@unam.mx

Resumen

Los plásticos se encuentran distribuidos en todos los ambientes y su degradación provoca daños a los organismos, ya sea por estrés oxidativo o alteraciones en procesos regulados hormonalmente. Uno de los plásticos con mayor presencia en ambientes terrestres y acuáticos es el poli (etilen tereftalato) (PET), el cual al degradarse libera varias moléculas, entre ellas los poliésteres de ácido ftálico (PAEs) y el bisfenol A (BPA). Se ha reportado que varias especies de algas tienen la capacidad de internalizar, almacenar e incluso degradar los PAEs que se encuentran presentes en ecosistemas acuáticos. Entre las especies que se han reportado están *Chlorella pyrenoidosa*, *Cylindrotheca closterium*, *Dunaliella salina*, *Chaetoceros muelleri*, *Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp., *Cyanothece* sp. y *Karenia brevis*, que pueden degradar algunos PAEs, así como *Desmodesmus* sp. WR1, que degrada el BPA. En esta revisión se aborda el panorama de la contaminación por microplásticos y el comportamiento de algunas microalgas frente a estos contaminantes.

Palabras clave: Microalgas, Microplásticos, Fitorremediación.

Abstract

Because the damage caused to organisms, either by oxidative stress or alterations in hormonally regulated processes, the degradation of plastics, which are distributed in all environments, has been considered as harmful to life. Poly (ethylene terephthalate) (PET) is one of the plastics with the greatest presence in terrestrial and aquatic environments and, when degraded, it releases several molecules, including the so-called phthalic acid polyesters (PAEs) and bisphenol A (BPA). Several algal species have been reported to have the ability to internalize, store and even degrade the PAEs that are present in aquatic ecosystems. Among the species that have been reported are *Chlorella pyrenoidosa*, *Cylindrotheca closterium*, *Dunaliella salina*, *Chaetoceros muelleri*, *Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp., *Cyanothece* sp., and *Karenia brevis*, which can degrade some PAEs, as well as *Desmodesmus* sp. WR1, which degrades BPA. In this review, the status of microplastics contamination and the behavior of some microalgae towards these contaminants is addressed.

Key words: Microalgae, Microplastics, Phycoremediation.

Introducción

La contaminación de diferentes ambientes por microplásticos (MP), definidos como partículas de plástico con un tamaño menor o igual a 5 mm de diámetro, se origina por la liberación de partículas manufacturadas primarias empleadas en muchas actividades industriales y domésticas, así como por la degradación de artículos plásticos más grandes en fragmentos de tamaño

micrométrico. La cantidad de MP liberados en el medio ambiente aumenta como resultado del crecimiento continuo de la producción de plásticos en todo el mundo, mientras que su degradación tarda cientos de años. Los efectos de los MP en el ambiente acuático son actualmente objeto de investigación, y en los últimos años ha incrementado el número de publicaciones que informan sobre especies acuáticas que han sido afectadas por la presencia de estos contaminantes, tanto con

modelos de laboratorio como con trabajos de campo, dentro de las cuales se incluye el papel de los MP como vectores de contaminantes orgánicos (Horton, 2017; Franzellitti et al., 2019). Por consiguiente, ha aumentado el interés por buscar una alternativa amigable con el medio ambiente para acelerar la degradación de MP que se encuentran en los mares y lagos, como los poliésteres. Entre estas alternativas se ha considerado el uso de microalgas.

Plástico

El plástico se define como un material sintético que puede moldearse fácilmente. Es el término que se utiliza de manera habitual para hacer referencia a diversos materiales sintéticos que tienen aplicaciones variadas en la vida cotidiana. Químicamente es definido como la unión repetitiva de moléculas que se unen por enlaces covalentes y contienen uno o más tipos de unidades denominadas monómeros, que se combinan entre sí mediante un proceso químico llamado reacción de polimerización (Beltrán & Marcilla, 2012). De acuerdo con los datos reportados por Ritchie & Roser (2020), en el 2015 la producción de plástico destinado a la generación de empaques fue de 146 millones de toneladas de plástico, seguido por el sector de la construcción con 65 millones de toneladas, mientras que otros sectores como el textil, transporte o maquinaria industrial también tienen participación en la producción de plásticos en el mundo (Fig. 1).

El uso del plástico se extiende por completo en la vida diaria, ya que otorga practicidad y a lo largo de varias décadas se promovió su incorporación a la cotidianidad. Se involucra en prácticamente todos los productos de consumo, desde regalos hasta alimentos. Además, ha reemplazado el uso de otro tipo de materiales como la madera, fibras vegetales, el vidrio o el acero. Hay infinidad de beneficios al utilizar estos polímeros: son baratos, livianos, resistentes y fácilmente moldeables, entre otros. Por esta razón es que es difícil romperlos y desgastarlos. Además, son altamente resistentes a la corrosión, a altas temperaturas y también se les considera aislantes eléctricos. Varias de estas características se logran mediante aditivos químicos (Thompson et al., 2004).

Entre algunos de los aditivos se encuentra el bisfenol A (BPA, 4,4'-isopropilidendifenol), el cual es utilizado en la fabricación de plásticos y resinas epoxi, para los revestimientos internos de latas de alimentos y bebidas. El BPA es una sustancia química, disruptora endocrina (EDC), lo que significa que tiene la capacidad de potenciar el efecto de algunas hormonas o por el contrario de inhibir la acción de las mismas, por ejemplo en humanos logra unirse a receptores hormonales, como el receptor de estrógeno nuclear (ER) (Pouzaud et al., 2018), ocasionando cambios en la expresión génica (Chianese et al., 2018); y también puede unirse a otras familias de receptores de

Producción de plástico por sector industrial en 2015

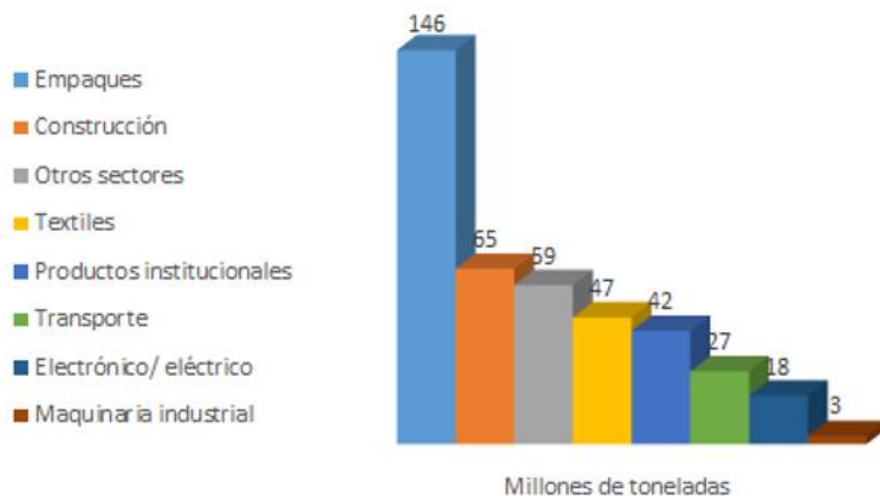


Figura 1. Producción de plástico por sector industrial (tomado y modificado de Ritchie & Roser, 2020).

membrana (Alonso-Magdalena et al., 2012), e incluso inducir actividades anti-androgénicas *in vitro* (Molina-Molina et al., 2013). Por otra parte, los ftalatos (1,2-dibencenodicarboxílico) son un conjunto de compuestos químicos, ésteres sintéticos formados a partir del ácido ftálico, que aportan, a los productos de consumo que los contienen, flexibilidad y elasticidad, por lo que se les conocen como plastificantes (Sathyanarayana, 2008). Éstos también pueden actuar como disruptores endócrinos, tanto en humanos como en otros animales (Psillakis et al., 2004; Xu et al., 2015).

Degradación del plástico

Se entiende como degradación del plástico a las reacciones en las que las moléculas orgánicas pierden uno o varios átomos de carbono, o donde las moléculas complejas se convierten en otras más simples. Este proceso se observa evaluando la pérdida de brillo, cambio de color, formación de grietas, aparición de zonas pegajosas y endurecimiento, y por lo tanto la pérdida de las propiedades termo-mecánicas. Algunos factores ambientales causan la degradación del plástico, como la luz solar, la presencia de oxígeno, la humedad, el calor: fotodegradación, degradación termo-oxidativa, degradación hidrolítica y biodegradación. Sin embargo, hay plásticos que se definen como no degradables, es decir que químicamente no se descomponen, sino que sólo se vuelven hojuelas o partículas de menor tamaño.

La combinación de la exposición a la radiación ultravioleta del sol, el viento, olas (en ambientes marinos) y la abrasión, ocasionan que los residuos degradados del plástico se fragmenten, lo que genera micro- y nanoplásticos (Arthur, et al., 2009). La acumulación de estos contaminantes se da por lo tanto en todos los ecosistemas, incluyendo el acuático como los ríos, mares y océanos, lo que provoca que también se acumulen en la fauna y en los sedimentos. Se considera MP a los fragmentos con un tamaño menor o igual a 5 mm de diámetro, y nanoplásticos a los fragmentos con un tamaño inferior a 100 nm (Browne et al., 2015). Los MP también se fabrican de ese tamaño para ser empleados en productos de limpieza e higiene, por ejemplo, los limpiadores faciales, contienen partículas de poliestireno que entran directamente a los sistemas de drenajes urbanos y por lo tanto llegan a los ambientes costeros adyacentes (Fendall & Sewell, 2009).

Hay reportes que señalan que en los MP se acumulan compuestos orgánicos hidrofóbicos como pesticidas organoclorados, bifenilos policlorados e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Mato et al., 2001; Ogata et al., 2009), debido a la superficie hidrofóbica que los caracteriza. Además de estos compuestos, también acumulan metales pesados como cadmio, zinc, níquel y plomo (Holmes et al., 2012; Rochman et al., 2014). Por esta razón los MP son considerados como vectores contaminantes, pues además de componerse por moléculas que son dañinas para quienes los ingieran, también les acompañan compuestos altamente tóxicos para las células.

El tamaño de los MP los hace componentes biodisponibles, ya que se logran incorporar a los organismos de manera accidental o intencional. Por lo tanto, la ingestión de estos materiales introduce toxinas a la base de la red trófica y es potencialmente bioacumulable, y conforme avanzan los niveles de la red trófica aumenta la acumulación de plástico en los organismos (Cole et al., 2011; Rochman et al., 2013).

Biodegradación

La biodegradación engloba la pérdida de características estructurales y masa molecular de un material (Zapata et al., 2007). Es un tipo de degradación química que involucra la actividad biológica provocada por la acción del metabolismo de microorganismos, tales como bacterias, hongos y algas. En el tema que se trata en este artículo, el proceso de biodegradación se debe a dos razones: la primera es el uso de algunos materiales presentes en los MP como sustrato que pueden ser empleados como fuente de carbono por el metabolismo del microorganismo, y la segunda por acción de algunas enzimas para evitar la toxicidad de los MP. La capacidad de degradación de las diferentes moléculas presentes en los MP se rige por las diversas características del polímero, como son la masa molecular, cristalinidad, tipos de grupos funcionales y plastificantes o aditivos.

Las enzimas que están involucradas en este proceso se denominan despolimerasas y se encuentran presentes tanto extracelular como intracelularmente. Las enzimas despolimerasas actúan ya sea de

forma endo (división aleatoria en los enlaces internos del polímero) o exo (escisión secuencial de la unidad monomérica terminal), en el proceso llamado despolimerización. Las enzimas extracelulares de los microorganismos primero rompen el complejo del polímero mediante oxidación y/o hidrólisis dando fragmentos oligoméricos más pequeños, que pueden permear a través de la pared celular, para ser utilizadas como fuente de carbono y energía. Puesto que las enzimas extracelulares se enfrentan al impedimento estérico con la estructura del material, sólo pueden actuar en la superficie del polímero, haciendo de la biodegradación de plásticos un proceso clásico de erosión de superficie, pero las enzimas intracelulares, al tener menor impedimento estérico son capaces de llevar a cabo el proceso de despolimerización (Müller et al., 2005; Kawai et al., 2019).

Los productos que se obtienen del proceso descrito previamente se pueden utilizar bioquímicamente en las vías metabólicas del microorganismo y, como resultado, de las moléculas de cadena corta se obtiene nueva biomasa y otros productos finales. A este proceso se le denomina mineralización y ocurre dentro de la célula donde los fragmentos oligoméricos más pequeños se convierten en CO₂, H₂O o metano (en la degradación anaeróbica).

Efecto de los plásticos sobre la vida

La exposición a los MP afecta de diversas maneras a los seres vivos, y los daños son causados por tres razones. La primera es por la ingesta del plástico, ya que

genera un daño físico en el sistema digestivo; la segunda razón es por la acumulación de los efectos negativos en el sistema, por las moléculas liberadas a partir de la degradación de los MP; y el tercer motivo es el daño que causa al organismo los contaminantes orgánicos y metales pesados que se adhieren durante la interacción del material plástico con el ambiente.

El MP puede considerarse como un agente xenobiótico, que es capaz de inducir estrés oxidativo como resultado de un proceso cíclico de oxidación-reducción (ciclo redox) en el cual, al ser biotransformado, sufre la reducción por un electrón donado por el NADPH, transformándose luego en un intermediario o especie reactiva que puede ser un radical libre. Esta especie reactiva, al intentar recuperar su configuración original, busca transferir o donar su electrón no apareado al oxígeno (O₂). Así el O₂ se reduce transformándose en el anión superóxido (O₂^{-•}) con la consecuente regeneración del componente parental. El O₂^{-•} reacciona a su vez con otras moléculas o consigo mismo y genera el radical hidroxilo (OH[•]) que, mediante una serie de reacciones en cadena y la capacidad de oxidar macromoléculas, puede ocasionar la muerte celular. Dentro de las principales lesiones asociadas con el ataque de estos radicales se encuentran la oxidación de las membranas lipídicas (peroxidación lipídica), oxidación a proteínas, oxidación de ácidos nucleicos y alteración del estatus celular redox (Fig. 2) (Ochoa & González, 2008).

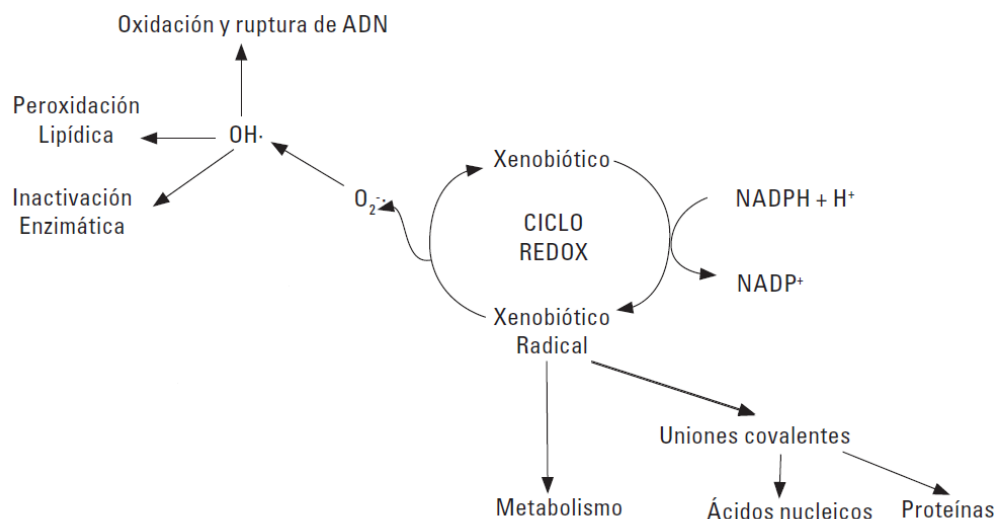


Figura 2. Esquema de óxido-reducción del MP como xenobiótico y consecuencias toxicológicas del ataque de los radicales libres (tomado y modificado de Ochoa & González, 2008).

Las partículas de MP, después de ser ingeridas por los seres vivos, tienen el potencial de translocarse a distintos tejidos, desencadenando una respuesta inmune localizada. En un estudio realizado en ratas se observó la translocación de las partículas contaminantes desde el intestino hasta la linfa y al sistema circulatorio (Hussain et al., 2001), lo que demuestra que los xenobióticos se pueden ubicar en diversos tejidos de los seres vivos. También se determinó que las partículas más finas atraviesan las membranas celulares, la barrera hematoencefálica y la placenta, lo que causa un estrés oxidativo, daño celular e inflamación (Vethaak & Leslie, 2016). Peces de agua dulce expuestos a diferentes clases de contaminantes, como insecticidas organofosforados o hidrocarburos aromáticos policíclicos, mostraron daño tisular por estrés oxidativo en exposiciones crónicas, así como alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes, con tendencia al aumento, principalmente en hígado y branquias, en exposiciones agudas (Ochoa & González, 2008).

La reducción de la fotosíntesis y del crecimiento de las algas, también han sido causadas por la presencia de los MP. En las algas de ambiente acuático, hay evidencia en la que se demuestra que sufren estrés oxidativo en presencia de contaminantes, como los metales pesados. En general, los niveles elevados de metales inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); por tanto, como respuesta a ese estrés, la célula presenta mecanismos antioxidantes enzimáticos que incluyen la sobreexpresión de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), y sistemas no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH), ascorbato y compuestos fenólicos (Cortés et al., 2018).

En otro artículo de revisión, describió que una vez que los MP están incorporados en el intestino de diversas especies, pueden liberar los monómeros que los constituyen, así como aditivos y toxinas absorbidas, que pueden causar daños fisiológicos, los cuales van desde estrés oxidativo hasta carcinogénesis, mismos daños que logran ser transmitidos a los seres humanos (Wang et al., 2018). Estudios *in vitro* con exposición a MP muestran daños por estrés oxidativo en diversas líneas celulares humanas epiteliales y cerebrales, lo que puede favorecer efectos localizados en el sistema inmunológico y aumentar la inflamación intestinal tras la ingestión de estos contaminantes (Schirinzi et al., 2017).

Contaminación en los océanos y mares

Alrededor del mundo existen cinco zonas de concentración de masa contaminante, formada de plásticos de diferentes tamaños de partícula (Fig. 3), donde la corriente marina, la presión atmosférica y los vientos, producen un área circular que mantiene unidos a los desechos flotantes. Se ha documentado que la basura proviene de fuentes terrestres (80 %) y de aporte de barcos (20 %) (Eriksen et al., 2014). Entre las principales vías de ingreso de contaminación plástica al mar, se encuentran los ríos, los drenajes pluviales y las cloacas; aunque también el viento es uno de los factores, las personas que van a las playas, los pescadores y los botes de recreación (Elías, 2015).

Ficorremediación

La ficorremediación es el uso de macroalgas y microalgas para la remoción o biotransformación de contaminantes, incluyendo nutrientes y xenobióticos de aguas residuales, y CO₂ del aire (Olguín, 2003). Es

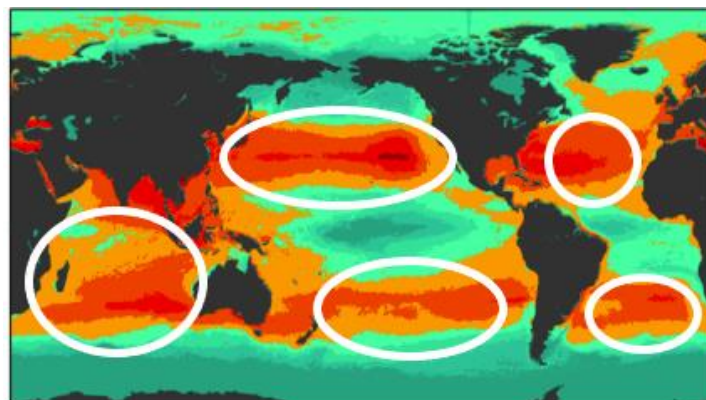


Figura 3. Giros subtropicales (señalados en los círculos blancos) donde se encuentra la acumulación de plásticos flotantes (tomado y modificado de Eriksen et al., 2014).

dada por un consorcio no definido de organismos, donde predominan las microalgas y cianobacterias. Estos microorganismos eucariotas y procariotas fotosintéticos, respectivamente, son la base del funcionamiento del tapete microbiano para lograr con éxito la biotransformación y/o bioacumulación de compuestos (Forero, 2015). Las microalgas permiten la eliminación de sustancias tóxicas, como pesticidas, herbicidas y metales pesados, entre otros; esto gracias a su capacidad de acumular importantes concentraciones de compuestos tóxicos, sin afectar su actividad biológica. Otro beneficio de las microalgas es la liberación de O₂ por medio de la fotosíntesis, mientras genera una acumulación de biomasa, la cual puede ser reutilizada potencialmente en sistemas de producción de biocombustibles y/o en procesos de avicultura, acuicultura o agricultura (Mehrabadi et al., 2015). Algunas de las aplicaciones de la ficorremediación son (Olguín, 2003):

- Remoción de nutrientes de aguas residuales con altos contenidos de materia orgánica.
- Tratamiento de aguas residuales ácidas y con metales.
- Captura de CO₂.
- Transformación y degradación de xenobióticos.

En cultivos autotróficos, la exposición a la luz ejerce un fuerte efecto en la productividad de las algas y en su capacidad de remoción de nutrientes. Otros parámetros por manipular, para mejorar la productividad son: la mezcla o agitación del cultivo, el tipo de incubación ya sea a gran escala o en etapa piloto (tipo de reactor a utilizar), concentración de biomasa y la densidad celular óptima (Olguín, 2003). Los sistemas de cultivo de las microalgas se clasifican en sistemas abiertos o cerrados en función de sus condiciones de diseño. En los sistemas abiertos, las algas se cultivan en entornos de áreas abiertas como estanques, lagunas, canales profundos y unidades con circulación del medio de cultivo con poca profundidad, entre otros. En sistemas cerrados, las algas se cultivan en recipientes con pared transparente y expuesta bajo la luz solar o radiación artificial para facilitar la fotosíntesis (Razzak et al., 2013).

En el sistema abierto se tiene como ventaja que se producen grandes cantidades de alga y no necesita inmensurables inversiones y mantenimiento, pero la problemática es al momento de querer controlar las condiciones de cultivo, y son más susceptibles a contaminaciones por otras algas o bacterias (Grima et al., 2009). En los sistemas cerrados la ventaja es que el cultivo de las algas es más efectivo dado que se controlan mejor las condiciones ambientales y se reduce el riesgo de contaminación, pero la mayor desventaja es el costo de construcción, mantenimiento y operación del sistema, además hay una posibilidad de que haya adhesión de las células a la superficie del reactor, lo que disminuye la disponibilidad de luz y por lo tanto la producción (Posten, 2009).

Degradación de microplásticos por algas

A continuación, se presenta el resumen de algunos estudios que se han hecho para observar el comportamiento de las microalgas frente a productos de degradación del poli (etilen tereftalato) (PET), el cual es uno de los plásticos con mayor presencia en las zonas contaminadas a nivel global (Tabla 1).

Chlorella pyrenoidosa

Yan et al. (1995), realizaron un estudio en el que analizaron el comportamiento de *C. pyrenoidosa* frente a tres PAEs: dimetil ftalato (DMP), dietil ftalato (DEP) y dibutil ftalato (DBP). Los Autores reportaron un factor de bioconcentración (BCF) máxima de 162 (24 h), 205 (12 h) y 4077 (12 h), para DMP, DEP y DBP, respectivamente. El factor de bioconcentración hace referencia a la proporción de concentración de los PAEs que hay en el organismo y la concentración que hay en el agua; mientras que la biodegradación promedio para cada poliéster fue de 13.4, 7.3 y 2.1 mg/l, es decir que se logró la descomposición de los poliésteres por acción de la microalga.

Cylindrotheca closterium, Dunaliella salina y Chaetoceros muelleri

Gao & Chi (2015) realizaron un estudio con tres diferentes microalgas (*C. closterium*, *D. salina* y *C. muelleri*), las cuales fueron expuestas a dos PAEs (DEP y DBP). Los Autores encontraron que la biodegradación del DBP se da en un comportamiento de primer orden, además los

Artículos

Tabla 1. Resumen de estudios realizados sobre la capacidad de crecimiento de las microalgas frente a PAEs y BPA.

Microalga	Compuesto añadido	Resultado	Referencia
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	DMP DEP DBP	Acumula y biodegrada.	Yan et al. (1995)
<i>Cylindrotheca closterium</i>	DEP DBP	Biodegrada con enzimas intra y extracelulares.	Gao & Chi (2015) Chi et al. (2019)
<i>Dunaliella salina</i>			
<i>Chaetoceros muelleri</i>			
<i>Synechocystis</i> sp.	DMP	Crecimiento máximo a 20 ppm del PAE.	Zhang et al. (2016)
<i>Synechococcus</i> sp.			
<i>Cyanothece</i> sp.			
<i>Desmodesmus</i> sp. WR1	BPA	Biodegrada y desintoxica.	Wang et al. (2017)
<i>Karenia brevis</i>	DMP DEP DAP DPrP	Disminución de PAEs del medio.	Sun et al. (2019)

compuestos fueron degradados por acción de enzimas (esterasas) intra y extracelulares. En su publicación mencionan que hay una rápida adsorción fisicoquímica pasiva inicial, seguido de absorción, acumulación y degradación de los compuestos. Además, explican que la degradación microbiana de los PAEs se inicia por reacciones de desesterificación secuenciales para formar monoéster y luego ácido ftálico. En este proceso las esterasas son las enzimas clave. Una esterasa es una enzima tipo hidrolasa que rompe enlaces éster, en los correspondientes alcoholes y ácidos, por medio de una reacción de hidrólisis. Las tasas de degradación de los PAEs por los microorganismos disminuyen con el aumento de la longitud de la cadena de alquilo como resultado del bloqueo estereoespecífico (Yan et al., 1995). De las tres algas con las que trabajaron, *C. closterium*, que tiene la capacidad de soportar ambientes contaminados, fue la especie con mayor eficiencia de biodegradación. Para DBP *C. closterium* tuvo un 93.1 % vs 40 y 47.1 % de *D. salina* y *C. muelleri*; mientras que para DEP *C. closterium* tuvo un 81.2 % vs 32.3 y 26.3 % de *D. salina* y *C. muelleri*. También observaron que DBP se degrada con mayor eficiencia en comparación a DEP, y cuando se encuentran mezclados el DBP tiene un efecto inhibitorio ante la degradación de DEP, ya que al disminuir la concentración de DBP en el medio, el DEP se degradó rápidamente. La degradación del DEP fue principalmente por

enzimas extracelulares en la fase acuosa, mientras que en DBP se observó la degradación en ambas fases (acuosa y en las microalgas) lo que indica que las enzimas que degradaban a este poliéster son intra y extracelulares.

Chi et al. (2019), publicaron otro estudio con las mismas tres cepas de microalgas y dos PAEs. En esta publicación se reportó la concentración del PAE que produce el 50 % del efecto máximo (EC50) y la concentración más alta del PAE a la cual no se observa efecto (NOEC). La cuantificación se relacionó con la densidad celular medida a las 96 h. Para DEP el EC50 fue de 194, 77 y 62 mg/l y el NOEC de 100, 50 y 30 mg/l para *C. muelleri*, *C. closterium* y *D. salina*, respectivamente. Mientras que para DBP el EC50 fue de 3.4, 4.2 y 0.7 mg/l y el NOEC de 1.0, 2.5 y 0.4 mg/l para *C. muelleri*, *C. closterium* y *D. salina*. Es así como observaron que para DEP la tolerancia era mayor en *C. muelleri*, seguida de *C. closterium* y finalmente por *D. salina*. En cambio, para DBP *C. closterium* tuvo más tolerancia que *C. muelleri*. Comparando los resultados del EC50 a las 96 h con el ensayo basado en la producción de clorofila a, el comportamiento es el mismo, ya que para DEP los valores son 146, 73 y 54 mg/l; y para DBP son 2.5, 3.3 y 0.6 mg/l para *C. muelleri*, *C. closterium* y *D. salina* en ambos casos. La concentración en la que se encuentran estos PAEs en el

ambiente, es de 0.1 mg/l, por lo que los valores EC50 y NOEC fueron más altos que los valores ambientales de DEP y DBP.

En ensayos subsecuentes (Chi et al., 2019), se usó una concentración inicial de DEP y DBP de 0.1 mg/l (concentración más relevante presente en el ambiente). El porcentaje de bioconcentración a las 96 h de DEP para *C. muelleri*, *C. closterium* y *D. salina* fue de 0.07, 0.01 y 0.17 %, mientras que para DBP de 12.3, 4.8 y 7.1 %, respectivamente. Al estar en combinaciones los dos PAEs el porcentaje de bioconcentración para *C. muelleri*, *C. closterium* y *D. salina* para DEP fue de 0.16, 0.14 y 0.52 %, y para DBP de 13.5, 6.9 y 9.7 %, respectivamente. Como se observa en los resultados, el porcentaje de bioconcentración aumenta para ambos PAEs cuando ambos están presentes en el medio, indicando que el DBP se bioconcentra más en las células en comparación al DEP.

En la medición de la biodegradación de los PAEs a las 96 h, se observa que en presencia de DEP el porcentaje de biodegradación de este es de 95.5, 97.7 y 91.2 %, y para DBP es 22.5, 91.5 y 34.5 % para *C. muelleri*, *C. closterium* y *D. salina*, respectivamente. Mientras que al estar combinados los PAEs el valor para DEP fue de 48, 42.5 y 71.1 %, y para DBP de 16.2, 56.4 y 21.0 % para *C. muelleri*, *C. closterium* y *D. salina*, respectivamente. Con esos resultados se demuestra que, en presencia de ambos PAEs, la biodegradación se ve afectada, es decir que es menos efectiva.

***Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp. y *Cyanothece* sp.**

Zhang et al. (2016), realizaron el estudio en diferentes cianobacterias: *Synechocystis* sp. (dulceacuícola), *Synechococcus* sp. (especie marina) y *Cyanothece* sp. (se desarrolla en ambos ambientes), y monitorearon la correlación de la concentración de DMP y el crecimiento de las cianobacterias. También cuantificaron la biodegradación del DMP y evaluaron el efecto de la temperatura en la biodegradación del DMP. Realizaron la comparativa con la acumulación del ácido tereftálico (TPA; subproducto de degradación del DMP), el cambio en el pH y la actividad de esterasa ante la degradación del DMP. En la primera parte, encontraron que las cianobacterias

crecían mejor en presencia de 20 mg/l del DMP que en ausencia de este compuesto. Sin embargo, a concentraciones de 50, 200 y 500 mg/l, el crecimiento se redujo conforme aumentaba la concentración del PAE.

Adicionalmente, usando 20 mg/L de DMP encontraron que *Cyanothece* logró degradar todo el DMP en 96 h, y al usar 50 mg/l la misma cepa logró la biodegradación en 120 h. Cuando analizaron el efecto de la temperatura en la degradación del DMP, observaron que entre 30 y 35 °C la degradación era mejor en comparación con 15, 25 y 40 °C, usando 96 h de incubación con una concentración inicial de 50 mg/l de DMP. También determinaron que el TPA es un subproducto de la degradación del DMP, y que a la par el valor del pH en el medio aumentó. Por esta razón se analizó el valor óptimo de pH inicial, para llevar a cabo una mejor degradación del DMP, por lo que hicieron la comparativa entre valores de pH de 6-10, y encontraron que el valor inicial de pH que favorece una mayor velocidad de degradación es 9. Finalmente, en el análisis de la actividad esterasa, encontraron que las tres cepas de cianobacterias la presentaban, aún en ausencia del DMP, pero cuando en el medio se encontraba el DMP la actividad era aproximadamente un orden de magnitud mayor a las 96 h con presencia de DMP la actividad era de 0.96, 0.87 y 1.11 U/ml, mientras que en ausencia de DMP la actividad fue de 0.09, 0.13 y 0.10 U/ml para *Synechocystis* sp. PCC6803, *Synechococcus* sp. PCC7942 y *Cyanothece* sp. PCC7822, respectivamente.

***Desmodesmus* sp. WR1**

Otro estudio fue realizado por Wang et al. (2017), donde se utilizó a *Desmodesmus* sp. WR1 para investigar los efectos del BPA sobre el crecimiento y la actividad fotosintética de la microalga, y para evaluar la desintoxicación del medio y la biodegradación del BPA. En ese estudio se empleó un análisis de transcriptoma para dilucidar la respuesta molecular del microorganismo a la exposición del BPA.

Los niveles de exposición que se utilizaron fueron de 1, 3, 5.5 y 13.5 mg/l de BPA. Interesantemente, encontraron que con esas concentraciones no se observa inhibición significativa en el crecimiento de la

microalga. El porcentaje de degradación del BPA, con las concentraciones previamente descritas, fueron del 57, 25, 18 y 26 %, respectivamente. Dentro del análisis del transcriptoma encontraron la presencia de genes que codifican para enzimas relacionadas con la biodegradación oxidativa del BPA (una oxidorreductasa), y para la adición de grupos glicosilo (una glicosiltransferasa). También, reportaron por primera vez la presencia de diversos subproductos de degradación del BPA, tales como el monohidroxi-BPA, el 2-hidroxi-3-hidroximetil-BPA, glicósidos y productos monofenólicos del BPA; concluyendo que estos productos se obtuvieron a partir de la hidroxilación oxidativa, la glicosilación y la escisión oxidativa del BPA. Lo que sugiere que esta microalga puede ser utilizada en procesos de biorremediación de ambientes acuáticos.

Karenia brevis

En otro estudio reportado (Sun et al., 2019), se utilizó una especie microalgal dinoflagelada, que se relaciona a una de las especies dañinas presentes en los fenómenos de marea roja. Con crecimiento de *K. brevis* durante 96 h, el contenido de DMP, DEP, DAP (dialil ftalato) y DPrP (dipropil ftalato) disminuyó 93.3%, 68.2%, 57.4% y 46.7%, respectivamente. La toxicidad de los PAEs y su acumulación en *K. brevis* incrementó con el aumento de las cadenas de alquilo, probablemente debido a la mayor lipoficidad de los PAEs de cadena más larga. Se detectaron metabolitos de biodegradación en *K. brevis* cuando se expuso a DEP, incluidos el DMP, monoetil ftalato (MEP), mono-metil ftalato (MMP), ácido ftálico (TPA) y el ácido protocatéquico (PrA). Cuando la cepa se encontró expuesta a DPrP, se detectó un compuesto intermedio adicional, que fue el ftalato de dietilo (DEP) en las células de *K. brevis*, además de los cinco metabolitos mencionados anteriormente. Esos resultados confirmaron que las principales vías de biodegradación de estos compuestos por *K. brevis* son por desesterificación, desmetilación o transesterificación. Estos hallazgos proporcionarán pruebas valiosas para predecir el destino ambiental y evaluar el riesgo potencial de PAEs en la aparición de floraciones de algas nocivas en el medio marino.

Conclusiones

Implementar tecnologías a partir de grupos biológicos, como las microalgas, para restaurar el medio ambiente, es una estrategia que conduce a beneficios de diversos tipos, ya que se obtienen ganancias económicas por la producción de compuestos de alto interés biotecnológico en la biomasa del organismo y se avanza en la restauración del medio ambiente a su estado natural. De acuerdo con los resultados que se han tenido hasta el momento, la biorremediación es un área que otorga una promesa respecto a la restauración de los ambientes acuáticos si hablamos de MP, ya que diversas especies microalgales, que crecen en condiciones acuáticas muy variables, son capaces de desintoxicar el medio en el que se encuentran, mediante diferentes mecanismos. Sin embargo, es un área que aún falta más por explorar, y que hasta el momento promete ser beneficioso para disminuir los efectos adversos de los microplásticos a los organismos.

De los diversos estudios que realizados con *Chlorella pyrenoidosa*, *Cylindrotheca closterium*, *Dunaliella salina*, *Chaetoceros muelleri*, *Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp., *Cyanothece* sp., *Desmodesmus* sp. WR1 y *Karenia brevis*, se demuestra que existen especies de microalgas que se sobreponen a condiciones de estrés causadas por la presencia de compuestos conocidos como plastificantes o el BPA, beneficios que soportan la aplicación de la biorremediación, lo que da pie a comenzar a cuestionarse y a experimentar sobre la combinación de las cepas microalgales.

Referencias

- Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, García-Arévalo M, Ripoll C, Fuentes E, Quesada I & Nadal A (2012) Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355(2), 201-207.
- Arthur C, Baker JE & Bamfort HA (2009) Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris. National Oceanic and Atmospheric Administration, Tacoma.

Artículos

- Beltrán M & Marcilla A (2012) Tecnología de polímeros, procesado y propiedades. Universidad de Alicante, España.
- Browne MA, Chapman MG, Thompson RC, Amaral LA, Jambeck J & Mallos NJ (2015) Spatial and temporal patterns of stranded intertidal marine debris: Is there a picture of global change? *Environ. Sci. Technol.* 49(12), 7082-7094.
- Chi J, Li Y & Gao J (2019) Interaction between three marine microalgae and two phthalate acid esters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 407-411.
- Chianese R, Troisi J, Richards S, Scafuro M, Fasano S, Guida M, Pierantoni R & Meccariello R (2018) Bisphenol A in reproduction: epigenetic effects. *Curr. Med. Chem.* 25(6), 748-770.
- Cole M, Lindeque P, Halsband C & Galloway TS (2011) Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588-2597.
- Cortés AA, Sánchez-Fortún S. & Bartolomé MC (2018) Mecanismos de resistencia a metales tóxicos (Cd) bajo variaciones abióticas en microalgas. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 21(1), 40-52.
- Elías R (2015) Mar del plástico: una revisión del plástico en el mar. *MAFIS.* 27, 83-105.
- Eriksen M, Lebreton LC, Carson HS, Thiel M, Moore CJ, Borerro JC, Galgani F, Ryan PG & Reisser, J (2014) Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PloS one.* 9(12), e111913.
- Fendall LS & Sewell MA (2009) Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1225-1228.
- Forero PA (2015) Fundamento teórico sobre tratamiento de aguas residuales por fitorremediación. Artículo de grado, Facultad de Ingeniería, Universidad Militar Nueva Granada.
- Franzellitti S, Canesi L, Auguste M, Wathsala RH & Fabbri E (2019) Microplastic exposure and effects in aquatic organisms: A physiological perspective. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 68, 37-51.
- Gao J & Chi J (2015) Biodegradation of phthalate acid esters by different marine microalgal species. *Mar. Pollut. Bull.* 99, 70-75.
- Grima EM, Fernández JM & Ación FG (2009) Microalgae, mass culture methods. *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology.* 1-24.
- Holmes LA, Turner A & Thompson RC (2012) Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. *Environ. Pollut.* 160, 42-48.
- Horton AA, Walton A, Spurgeon DJ, Lahive E & Svendsen C (2017) Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Sci. Tot. Environ.* 586, 127-141.
- Hussain N, Jaitley V & Florence AT (2001) Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50(1-2), 107-142.
- Kawai F, Kawabata T & Oda, M (2019) Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103(11), 4253-4268.
- Mato Y, Isobe T, Takada H, Kanehiro H, Ohtake C & Kaminuma T (2001) Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.* 35(2), 318-324.
- Mehrabadi A, Craggs R & Farid M (2015) Tratamiento de aguas residuales de alta tasa de estanques de algas (WWT HRAP) para la producción de biocombustibles de bajo costo. *Bioresour. Technol.* 184, 202-214.

- Molina-Molina J. M., Amaya E, Grimaldi M, Sáenz JM, Real M, Fernández MF & Olea N (2013) In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272(1), 127-136.
- Müller RJ, Schrader H, Profe J, Dresler K & Deckwer WD (2005) Enzymatic degradation of poly (ethylene terephthalate): rapid hydrolysis using a hidrolase from *T. fusca*. *Macromol. Rapid Commun.* 26, 1400-1405.
- Ochoa DM & González JF (2008) Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.* 55(II), 115-126.
- Ogata Y, Takada H, Mizukawa K, Hirai H, Iwasa S, Endo S, Mato Y, Saha M, Okuda K, Nasashima A, Murakami M, Zurcher N, Booyatumanondo R, Zakaria MP, Dung LQ, Gordon M, Miguez C, Suzuki S, Moore C, Karapanagioti HK, Weerts S, McClurg T, Burres E, Danner B, Stewardson N & Thompson RC (2009) International pellet watch: global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. *Mar. Pollut. Bull.* 58(10), 1437-1446.
- Olguín EJ (2003) Phycoremediation: key issues for cost effective nutrient removal processes. *Biotechnol. Adv.* 22, 81-91.
- Posten C (2009) Design principles of photobioreactors for cultivation of microalgae. *Eng. Life Sci.* 9(3), 165-177.
- Pouzaud F, Thierry-Mieg M, Burga K, Vérines-Jouin L, Fiore K, Beausoleil C & Pasquier E (2018) Concerns related to ED-mediated effects of Bisphenol A and their regulatory consideration. *Mol. Cell. Endocrinol.* 475, 92-106.
- Psillakis E, Mantzavinos D & Kalogerakis N (2004) Monitoring the sonochemical degradation of phthalate esters in water using solid-phase microextraction. *Chemosphere.* 54(7), 849-857.
- Razzak SA, Hossain MM, Lucky RA, Bassi AS & De Lasa H (2013) Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 27, 622-653.
- Ritchie H & Roser M (2020) Plastic pollution [en línea]. Disponible en: <https://ourworldindata.org/plastic-pollution>
- Rochman CM, Hentschel BT & Teh SJ (2014) Long-term sorption of metals is similar among plastic types: implications for plastic debris in aquatic environments. *PLOS one*, 9(1), e85433.
- Rochman CM, Hoh E, Kurobe T & Teh SJ (2015) Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Sci. Rep.* 3, 3263.
- Sathyanarayana S (2008) Phthalates and children's health. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care.* 2(38), 34-49.
- Schirinzi GF, Pérez-Pomeda I, Sanchís J, Rossini C, Farré M & Barceló D (2017) Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environ. Res.* 159, 579-587.
- Sun C, Zhang G, Zheng H, Liu N, Shi M, Luo X, Chen L, Li F & Hu S (2019) Fate of four phthalate esters with presence of *Karenia brevis*: Uptake and biodegradation. *Aquat. Toxicol.* 206, 81-90.
- Thompson RC, Olse Y, Mitchell RP, Davis A, Rowland SJ, John AW, McGonigle D & Russell AE (2004) Lost at sea: where is all the plastic? *Science.* 304, 838.
- Vethaak AD & Leslie HA (2016) Plastic Debris Is a Human Health Issue. *Environ. Sci. Technol.* 50(13), 6825-6826.
- Wang R, Diao P, Chen Q, Wu H, Xu N & Duan S (2017) Identification of novel pathways for biodegradations of bisphenol A by the green alga *Desmodesmus* sp.WR1, combined with mechanistic analysis at the transcriptome level. *Chem. Eng. J.* 321, 424-431.

Artículos

Wang F, Wong CS, Chen D, Lu X, Wang F, & Zeng EY (2018) Interaction of toxic chemicals with microplastics: a critical review. *Water Res.* 139, 208-219.

Xu LJ, Chu W & Graham N (2015) Sonophotolytic degradation of phthalate acid esters in water and wastewater: influence of compound properties and degradation mechanisms. *J. Hazard. Mater.* 288, 43-50.

Yan H, Ye C & Yin C (1995) Kinetics of phthalate ester biodegradation by *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Toxicol. Chem.: An International Journal.* 14(6), 931-938.

Zapata A, Estrany F, Pujol RO (2007) Degradación de los residuos de materiales plásticos. *Ingeniería Química.* 448, 186-190.

Zhang X, Liu L, Zhang S, Pan Y, Li J, Pan H, Xu S & Luo F (2016) Biodegradation of dimethyl phthalate by freshwater unicellular cyanobacteria. *BioMed Res. Intl.* 2016.

El potencial del genoma del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* para la producción de proteínas recombinantes

Christian Carreño-Campos*, María Luisa Villarreal, Anabel Ortiz Caltempa

Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos,
Av. Universidad 1001, 62209, Cuernavaca, Morelos

chrcam12@gmail.com

Resumen

En los últimos años, las microalgas son una gran alternativa en la investigación científica debido a su capacidad de producción de proteínas recombinantes con aplicaciones comerciales. Como plataforma de producción, tienen varias ventajas ya que crecen muy bien, se caracterizan por su capacidad de crecimiento en condiciones autótrofas, heterótrofas o mixótrofas. Con más de 70000 especies, las microalgas representan un gran potencial para producir proteínas recombinantes a niveles comercialmente factibles. De estas especies, *Chlamydomonas reinhardtii* se ha destacado por su gran potencial en la expresión de más de 100 genes en el genoma del cloroplasto que codifican para proteínas recombinantes como proteínas terapéuticas, anticuerpos, hormonas y vacunas. En comparación con la transformación nuclear, varios estudios demuestran que la acumulación de proteínas recombinantes es más alta cuando los genes que codifican para estas se expresan en el genoma del cloroplasto de las microalgas. Sin embargo, todavía existen muchos desafíos en el uso de la ingeniería del genoma del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* incluyendo la búsqueda de mejoras en las estrategias moleculares para que esta especie se posicione como una plataforma de expresión estándar para la industria biotecnológica. En este trabajo, se reporta el potencial de *Chlamydomonas reinhardtii* como una plataforma de producción de proteínas recombinantes utilizando la tecnología de transformación del genoma del cloroplasto de acuerdo con lo reportado en artículos científicos.

Palabras clave: Microalgas, proteínas recombinantes, *Chlamydomonas reinhardtii*, transformación del genoma del cloroplasto.

Abstract

In recent years, microalgae have emerged as an alternative platform for the production of recombinant proteins with commercial applications. As a production platform, it has several advantages, including rapid growth, facility to scale up, and the ability to grow in autotrophic, heterotrophic, or mixotrophic conditions. With more than 70,000 species, microalgae represents a vast, unexplored potential resource for producing recombinant proteins with economic feasibility. Of these, *Chlamydomonas reinhardtii* has been noted for its potential to express more than 100 different recombinant proteins, including therapeutic proteins, antibodies, hormones, and vaccines. Compared to nuclear transformation, several studies have shown that the accumulation of recombinant proteins is higher when their coding genes are expressed in the chloroplast genome of microalgae. However, there are still many challenges and bottlenecks in the use of chloroplast genome engineering with *C. reinhardtii*, such as improvements in molecular strategies to position this species as a standard expression platform for the biotechnology industry. In this work, the potential of *C. reinhardtii* as a platform to produce recombinant proteins using chloroplast genome transformation technology is discussed.

Key words: microalgae cells, recombinant proteins, *Chlamydomonas reinhardtii*, chloroplast genome transformation.

Introducción

A partir del desarrollo de las tecnologías del ADN recombinante en los años ochenta, los organismos modificados genéticamente se han convertido en una fuente importante para la producción de proteínas y metabolitos de interés industrial. En la actualidad, la mayoría de las proteínas recombinantes producidas comercialmente se obtienen con *Escherichia coli* (Shamriz et al., 2016), *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* (Salehzadeh et al., 2012); así como de líneas celulares de insectos (Demain y Vaishnav, 2009), mamíferos (Palomares et al., 2004) y plantas transgénicas (Ofoghi et al., 1999). Cada sistema ofrece distintas ventajas en términos de costo de producción, capacidad para producir proteínas funcionales correctamente plegadas, seguridad, distribución y rendimiento, entre otras (Tabla 1).

Las microalgas son un grupo amplio y diverso de células eucariotas fotosintéticas que viven en ecosistemas acuáticos y terrestres (Moazami et al., 2011). *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) son algas verdes biflageladas unicelulares de vida libre que se encuentran en agua dulce y suelo (Harris, 2009). Estas células se dividen por mitosis cuando existen condiciones

ambientales adecuadas (Harris, 2001). La temperatura mínima para el crecimiento de *Chlamydomonas* es de 13 a 15 °C en promedio, (Maikova et al., 2016), y crece en un intervalo mesófilo (15 a 37 °C). Cuando la temperatura disminuye a valores menores de 15°C (biorreactores sin control de temperatura) la división celular se detiene por completo (Lapina et al., 2013); sin embargo, se ha reportado que el tamaño de la célula continúa aumentando lentamente (Maikova et al., 2016), y su morfología cambia de tal manera que disminuye la densidad del nucleolo, cambia la forma del cloroplasto, aumenta el grosor de la capa de almidón alrededor del pirenoide y aumenta el tamaño de las vacuolas (Valledor et al., 2013). *C. reinhardtii* posee un cloroplasto grande y único que abarca aproximadamente el 40% del volumen celular (Schotz et al., 1972). El cloroplasto presenta un genoma circular de ~206 kb, alberga de 50 a 80 copias idénticas del plastoma, contiene 99 genes que codifican para los componentes centrales del aparato fotosintético y del aparato de transcripción-traducción del orgánulo (Gallaher et al., 2018).

C. reinhardtii es la microalga más caracterizada genéticamente en los tres genomas que posee (nuclear, cloroplasto y mitocondrial), los cuales han sido ya

Tabla 1. Comparación de diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes. Información tomada de Yan et al., 2016.

Parámetro	Microalgas	Plantas	Bacterias	Levaduras	Insectos	Células mamífero
Costo operación	Bajo	Bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy alto
Costo de escalamiento	Medio	Muy bajo	Alto	Alto	Muy alto	Muy alto
Velocidad de crecimiento	Rápido	Lento	Rápido	Rápido	Medio	Lento
Riesgo de contaminación	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Alto	Alto
Plegamiento de proteína	Alto	Alto	Bajo	Medio	Alto	Alto
Rendimiento de proteína	Alto	Alto	Alto	Medio	Medio	Medio
Seguridad	Alta	Alta	Bajo	Desconocido	Medio	Bajo
Distribución	Fácil	Fácil	Posible	Posible	Difícil	Difícil

secuenciados (Merchant et al., 2007; Gallaher et al., 2018). Actualmente existen procedimientos de transformación genética que permiten la integración de ADN exógeno en los tres genomas (Mussgnug, 2015). La modificación genética del cloroplasto de *C. reinhardtii* se realizó hace más de 30 años de forma estable mediante el método de biolística (Boynton et al., 1988) y posteriormente se obtuvo en agitación con perlas de vidrio (Kindle et al., 1991). Se ha demostrado científicamente en algas y plantas superiores, que las proteínas recombinantes se acumulan en niveles mucho más altos cuando se expresan en el genoma del cloroplasto en comparación con el genoma nuclear (Franklin et al., 2002, Daniell, 2006). La expresión de proteínas en el cloroplasto presenta varias ventajas, que incluyen: (1) niveles altos de proteína recombinante (2-20% de proteína soluble total) (Su Z et al., 2005); (2) ausencia de mecanismos de silenciamiento génico (Bock, 2015); (3) integración génica dirigida en el plastoma mediante recombinación homóloga; y (4) la posibilidad de realizar modificaciones postraduccionales tales como la correcta formación de enlaces disulfuro, (Mayfield et al., 2007; Almaraz-Delgado et al., 2014). Es importante destacar que el cloroplasto contiene la maquinaria adecuada para formar enlaces disulfuro y ensamblar proteínas grandes y complejas, como anticuerpos completos (Tran et al., 2009). Uno de los principales inconvenientes de la expresión de proteínas en el cloroplasto de *C. reinhardtii* es que las secuencias de codificación proteica requieren optimización de codones para cumplir con el uso de codones en el orgánulo y se puedan expresar las proteínas heterólogas eficientemente (Franklin et al., 2002), además de que no presentan mecanismos de glicosilación adecuados para algunas proteínas; por lo tanto, esta microalga se puede usar para producir proteínas que exhiben poca o ninguna glicosilación.

Se ha demostrado que la microalga *C. reinhardtii* es un sistema ideal para la expresión de proteínas recombinantes con fines de producción comercial, ya que ofrece varias ventajas que incluyen: (1) una alta tasa de crecimiento, tiempos de duplicación de 5 a 8 horas, y densidades celulares de 10^7 células/ml; (2) la transformación genética es una herramienta estable que permite generar en 4 a 6 semanas, una producción a gran escala de proteína recombinante (Mayfield et al., 2007); (3) facilidad de cultivo en diferentes

tipos de biorreactores; (4) se pueden transformar sus tres genomas (núcleo, mitocondria y cloroplasto), lo que permite la localización dirigida de la expresión de proteínas recombinantes (Larosa y Remacle, 2013); (6) algunas cepas de *C. reinhardtii* se pueden cultivar en condiciones heterótrofas (utilizando acetato como fuente de carbono) y fototróficas (con luz como única fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono), en biorreactores y estanques al aire libre (Moon et al., 2013); (7) existe una amplia variedad de promotores y marcadores para la modificación genética de células; y (8) la FDA (Food and Drug Administration) considera a *C. reinhardtii*, como un organismo generalmente reconocido como seguro (GRAS), ya que no hay evidencia de componentes tóxicos o mutagénicos dentro de la célula (Murbach et al., 2018). Por todo lo anterior se abre la posibilidad de que se utilicen células recombinantes completas o extractos de estas (sin que se purifiquen las proteínas) como vacunas orales o en alimentos mejorados portando proteínas recombinantes. Por otra parte, el genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii* soporta la expresión de genes que codifican para una amplia variedad de proteínas recombinantes que incluyen indicadores como la enzima beta-glucuronidasa (Sakamoto et al., 1993), la luciferasa (Mayfield y Schultz, 2004) y la proteína verde fluorescente (Franklin et al., 2002); proteínas terapéuticas como vacunas (Surzycki et al., 2009) y hormonas (Dyo y Purton, 2018); enzimas industriales (Gangl et al., 2015; Richter et al., 2018) y enzimas para sintetizar metabolitos (Fukusaki et al., 2003; Papaefthimiou et al., 2019; Tevatia et al., 2019). Se ha visto que muchas de las proteínas recombinantes que se han cuantificado se acumulan de 2% a 20% del total de la proteína soluble (TSP) (Manuell et al., 2007; Rasala et al., 2010).

El interés de *C. reinhardtii* se ha centrado principalmente en la producción de proteínas terapéuticas, las cuales no afectan la biología del cloroplasto (Dyo y Purton, 2018). Estas incluyen vacunas para ganado, como una posible vacuna contra la fiebre aftosa (Sun et al., 2003) y una que puede proteger contra la gripe aviar (Castellanos-Huerta et al., 2016). También se han expresado vacunas humanas candidatas contra la malaria (Jones et al., 2013), la

infección por *Staphylococcus aureus* (Dreesen et al., 2010) y los tumores causados por el virus del papiloma humano (Demurtas et al., 2013). La ingeniería de cloroplastos también se ha utilizado para producir otras proteínas terapéuticamente valiosas, como los anticuerpos de cadena única larga (Mayfield et al., 2003), una clase de conjugados anticuerpo-fármaco conocidos como inmunotoxinas que son prometedoros en el tratamiento del cáncer (Tran et al., 2013), y alérgenos recombinantes para el tratamiento de alergias al maní y al polen de abedul (Gregory et al., 2016, Hirschl et al., 2017). Investigaciones recientes han demostrado la viabilidad de expresar la toxina Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* en el cloroplasto de *C. reinhardtii* como estrategia útil en el control de mosquitos, particularmente debido a la cohabitación de esta microalga y larvas de mosquitos en ciertos hábitats (Kang et al., 2018). A continuación, se describen las estrategias moleculares disponibles para diseñar la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii*, así como algunos ejemplos exitosos que han modificado el genoma del cloroplasto para obtener productos recombinantes en *C. reinhardtii* y una perspectiva de los desafíos futuros en la industria del cloroplasto con microalgas.

Sistemas de cultivo de *C. reinhardtii*

C. reinhardtii es capaz de crecer mixotróficamente; es decir, de forma autótrofa (puede producir su propio alimento) o heterótrofa (obtiene su alimento de fuentes externas), según la disponibilidad de compuestos orgánicos y la intensidad lumínica. Además, *C. reinhardtii*, se puede cultivar a gran escala en estanques abiertos o en fotobiorreactores. Los fotobiorreactores (FBRs) son sistemas cerrados transparentes, de plástico o vidrio, con geometrías de diversos tipos (tubulares, cilíndricas o planas). Estos sistemas tienen ventajas sobre los estanques abiertos al obtener una mayor productividad, fundamentalmente porque se mejora la eficiencia de la fotosíntesis y la capacidad de fijación del CO₂. Frente a los estanques abiertos, los FBRs necesitan un espacio menor y se puede mantener un monocultivo sin contaminación de otras especies, lo que permite tener un producto apto para su uso en la industria farmacéutica. Otra ventaja muy importante es que al ser sistemas cerrados los parámetros de

crecimiento más importantes como intensidad de luz (2500-5000 lux), temperatura (18-24°C), pH (8.2-8.7), cantidad de nutrientes y dióxido de carbono (1.85 g CO₂/g biomasa), se pueden monitorear y controlar, obteniendo un bioproceso robusto (Rosales-Mendoza et al., 2012). Se ha reportado que el uso de biorreactores tipo air-lift para el cultivo de microalgas como *C. reinhardtii* y *Dunaliella tertiolecta* bajo condiciones de fotoaclimatación, junto con un flujo de líquido controlado, un suministro de dióxido de carbono y eliminación de oxígeno no limitan la productividad en los rendimientos de biomasa (Janssen et al., 2000). Un desafío importante es el desarrollo y optimización de los FBRs para maximizar la productividad en *C. reinhardtii* y disminuir el consumo energético, con el fin de permitir la producción de proteínas recombinantes a gran escala. Estas metodologías deben incluir los siguientes parámetros operativos: relación altura/diámetro del reactor, velocidad de flujo, coeficiente de transferencia de masa (kLa), velocidad de mezcla, densidad inicial y penetración de luz (Wang et al., 2014), junto con el suministro de CO₂, la concentración de nutrientes, el pH, la salinidad y control de temperatura (Fernández et al., 2012), ya que todos estos parámetros pueden afectar la producción de proteínas recombinantes en microalgas.

En cambio, los estanques abiertos ofrecen la posibilidad de ser más baratos que los FBRs, en términos de inversión, mantenimiento y consumo energético. Los principales tipos de sistemas abiertos son estanques poco profundos, estanques circulares, estanques ovalados *raceway* con brazo rotatorio para la agitación del cultivo y sistemas en cascada o de capa delgada. Las desventajas son: susceptibles a contaminación, mezclado poco eficiente, baja productividad y una densidad celular dependiente de la superficie, y de la profundidad del estanque, lo que limita el tipo de microorganismo que se puede cultivar en estos sistemas (Borowitzka, 1999). A medida que las células reciben la iluminación y el intercambio de gases como el dióxido de carbono y oxígeno disminuyen con respecto a la distancia desde la superficie, se limita el crecimiento a cierta profundidad. Por lo tanto, el cultivo en estanques abiertos debe realizarse preferiblemente en capas delgadas y cubrir grandes áreas (Walker et al., 2005).

Además, aunque todavía no se conoce el impacto en los ecosistemas circundantes por la propagación de microalgas, la aceptación pública sigue siendo renuente al cultivo de algas transgénicas en estanques abiertos.

En general, las microalgas tienen la capacidad de crecer en escalas que van desde unos mililitros hasta 500 mil litros de forma rentable. En comparación con otros sistemas de cultivo celular, los costos adicionales de iluminación y agitación se compensan con los bajos costos del medio de cultivo. Por ejemplo, las proteínas terapéuticas complejas, como los anticuerpos (mAbs), se producen principalmente mediante el cultivo de células de mamíferos transgénicos. Los costos de producción de mAb en células de mamíferos cultivadas promedian unos \$150 dls por gramo de materia prima, mientras que en plantas transgénicas se ha estimado que la producción de mAb cuesta \$0.05 dls por gramo (Dove, 2002). Se estima que los costos de producción de mAb en sistemas de microalgas compitan con los de las plantas terrestres, dado que los costos de los medios para las algas son bastante razonables (\$0.002 dls por gramo), además las microalgas pueden crecer en cultivos continuos, en donde el medio de cultivo se puede reciclar (Mayfield et al., 2003).

Métodos de transformación para la ingeniería genética del cloroplasto

La ingeniería genética del genoma del cloroplasto (plastoma) se denomina transplastómica (Purton et al., 2013). Los genomas de los cloroplastos son moléculas circulares poliploides que poseen entre 100 y 200 genes, y la mayoría de ellos codifican los componentes centrales del aparato fotosintético o la maquinaria de transcripción y traducción del orgánulo. La transformación del cloroplasto se logró por primera vez utilizando *C. reinhardtii* mediante una mutante fotosintética que portaba una delección del gen del cloroplasto, con la cual se restauró a fototrofia mediante bombardeo de micropartículas con un plásmido que portaba el gen de tipo salvaje. El análisis molecular mostró que el locus mutante se había reparado mediante recombinación homóloga (HR) entre las secuencias del plastoma y el ADN introducido. Desde entonces, *C. reinhardtii* ha sido ampliamente usado

como modelo de laboratorio para estudios de genética inversa de la expresión génica del cloroplasto y la función fotosintética, con eliminaciones genéticas específicas o cambios dirigidos al sitio introducidos en el plastoma mediante ingeniería mediada por recombinación homóloga.

El método más utilizado para obtener células transplastómicas de *C. reinhardtii* es el bombardeo de micropartículas (biolística) con el dispositivo PDS-1000/He (Randolph-Anderson et al., 2015). Previo al bombardeo, *C. reinhardtii* debe esparcirse en medio sólido para inmovilizarlas. El dispositivo de bombardeo acelera las partículas de tungsteno u oro recubiertas de ADN utilizando helio a alta presión para bombardear las células inmovilizadas mantenidas a presión subatmosférica. Varios factores, incluida la naturaleza, el tamaño y la velocidad de las micropartículas; la distancia a las células inmovilizadas; el número de células que se bombardearán; la forma lineal o circular del plásmido recombinante y la concentración de ADN blanco, contribuyen a una eficiencia de transformación óptima mediante el bombardeo de micropartículas (Coll, 2006).

Una de las ventajas al utilizar partículas de oro es que tienen un tamaño y una forma uniformes y no reaccionan químicamente con otras sustancias. Una transformación estable ocurre cuando se usan partículas de oro de tamaño submicrónico debido a que las células sufren menos daño celular, por lo tanto, se recuperan más rápido después del bombardeo. Por el contrario, las micropartículas de tungsteno tienen forma irregular y tamaño heterogéneo, éstas suelen ser tóxicas para las células y pueden degradar el ADN diana; sin embargo, son más baratas (Randolph-Anderson et al., 2015). El elevado costo del dispositivo de bombardeo ha llevado a buscar alternativas más baratas y sencillas como el uso de perlas de vidrio. Otra técnica de transformación utilizada en microalgas es la agitación de protoplastos (células deficientes en la pared celular) con perlas de vidrio utilizando vórtices, esta técnica es simple y eficiente para la transformación de cloroplasto en *C. reinhardtii* (Economou et al., 2014). Con este método se propone que se generen huecos en la célula y en las membranas del cloroplasto debido a la acción abrasiva de las perlas y el ADN ingresa directamente al

cloroplasto. En este método, la pared celular actúa como una barrera física que evita la entrada de ADN en la célula. La pared celular puede eliminarse mediante digestión enzimática con autolisinas (gametolisina), enzimas que están activas durante la reproducción celular (Economou et al., 2014). También se ha desarrollado un método de transformación de cloroplasto mediante electroporación. La electroporación es el método de elección para introducir ADN en el genoma nuclear. Sin embargo, esta técnica también se ha utilizado para transferir ADN al cloroplasto de microalgas. El uso de cepas de pared delgada o deficiente de la pared celular mejora la eficiencia de transformación por electroporación (Shimogawara et al., 1998). La integración del ADN en el plastoma poliploide da como resultado una mezcla heteroplasmática de copias de plastoma transgénicas y no transformadas dentro de un solo cloroplasto. Después, se comprueba la presencia del gen de interés (GOI) en las colonias resistentes y se someten a múltiples rondas de selección de una sola colonia para garantizar que las líneas transformantes alcancen un estado homoplásmico estable en el que todas las copias del genoma poliploide contienen el marcador y el GOI (Figura 1).

Optimización del uso de codones para la expresión transgénica

Una consideración importante en la ingeniería genética del plastoma de *C. reinhardtii* es la preferencia por codones con adenina (A) o timina (T) en la tercera posición (aproximadamente 64%) sobre aquellos con citosina (C) o guanina (G). Un estudio mostró que la proteína verde fluorescente (GFP) con codones optimizados de acuerdo con el uso de codones del genoma del cloroplasto podría aumentar la acumulación de la proteína transgénica hasta 80 veces más en el cloroplasto (Franklin et al., 2002). Enfoques similares que utilizan el gen de anticuerpo humano y el gen de luciferasa con codones optimizados también respaldaron el papel significativo de la optimización de codones en la producción de proteínas dentro del cloroplasto de microalgas (Mayfield y Schultz, 2004). En consecuencia, la optimización de codones de los transgenes da como resultado una mejor eficiencia de traducción y, por lo tanto, niveles más altos de acumulación de proteínas. Actualmente, existen herramientas de software disponibles para el diseño de genes sintéticos con codones optimizados para la expresión de muchas de las proteínas recombinantes en el cloroplasto (Purton, 2007).

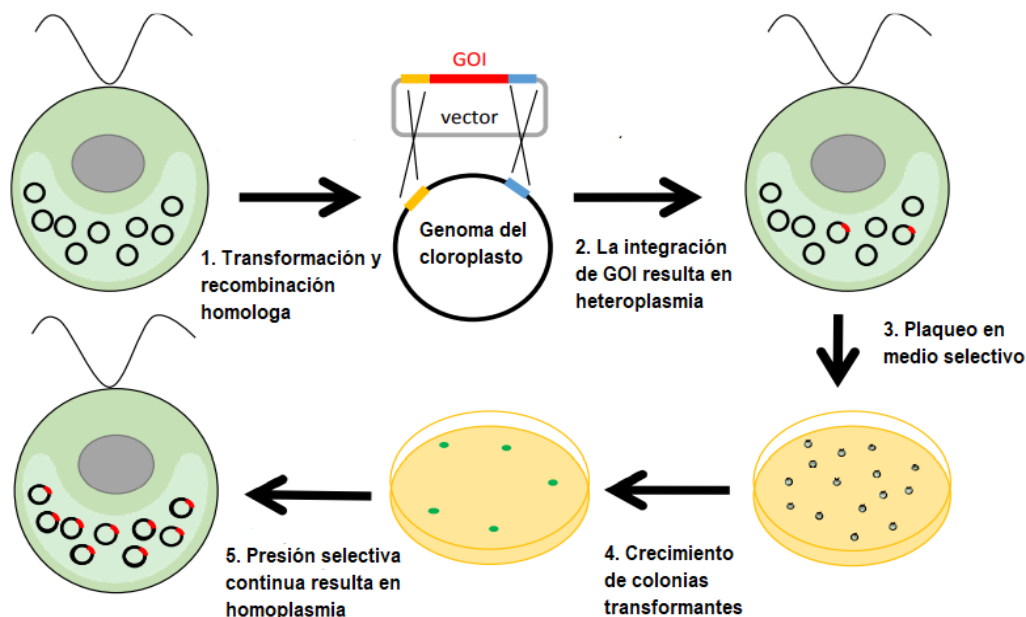


Figura 1. Transformación de cloroplasto de *C. reinhardtii*. El gen de interés (GOI) se inserta en algunas de las copias del plastoma mediante recombinación homóloga. Solo las células que contienen al menos una copia del transgén y el marcador de selección podrán sobrevivir en el medio selectivo y formarán colonias. Puede requerirse de múltiples rondas de selección de una sola colonia para lograr la homoplasma. Imagen adaptada de Esland et al., 2018.

Una última consideración es el sitio de integración, y esto está determinado por los elementos derivados del plasmoma que flanquean la construcción transgénica y median los dos eventos de cruzamiento, como se muestra en la Figura 1. Se han identificado varios sitios de integración 'neutrales' que permiten la integración de ADN exógeno sin alterar los genes endógenos ni afectar la expresión de genes cercanos (Taunt et al., 2018).

Marcador de selección

Un requisito importante para la transformación del plásmido es tener un marcador de selección. La inserción exitosa de ADN en el cloroplasto de microalgas es baja: uno de cada 10^5 - 10^6 células tratadas (Murbach et al., 2018). Por lo tanto, es esencial tener un método de selección que permita el desarrollo de colonias que surjan de estos eventos al tiempo que evita el crecimiento de células no transformadas. Los marcadores de selección para la transformación del cloroplasto se resumen en la Tabla 2.

La selección de las cepas transformadas se basan generalmente con genes bacterianos ("casetes") que confieren resistencia a los antibióticos (Bateman y Purton, 2000), sin embargo, debido a esto, el uso de

tales marcadores en productos comerciales no es deseable. El marcador seleccionable más utilizado para la ingeniería de cloroplasto es el gen *aadA* (Goldschmidt-Clermont, 1991). El gen bacteriano *aadA* codifica para la aminoglucósido adeniltransferasa (AAD), que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin, antibióticos que se dirigen al ribosoma 70S de bacterias y cloroplastos. En consecuencia, cuando la secuencia codificante se fusiona con un promotor de cloroplasto y regiones no traducidas de los genes (untranslated region: UTR) apropiado, el gen *aadA* puede servir como marcador dominante y portátil en algas y plantas. Un segundo marcador para la selección basada en antibióticos en *C. reinhardtii* es el gen *aphA6* (Bateman y Purton, 2000). Este gen de *Acinetobacter baumannii* codifica para la aminoglucósido fosfotransferasa que confiere resistencia a la kanamicina e inhibidores relacionados de los ribosomas 70S. Una selección alternativa basada en antibióticos implica el uso de variantes de los genes *rmsS* y *rmsL* del cloroplasto que codifican para los ARN ribosomales 16S y 23S, respectivamente. Las mutaciones puntuales específicas en *rmsS* pueden dar lugar a ribosomas resistentes a espectinomicina, estreptomycin o kanamicina, mientras que mutaciones en *rmsL* pueden dar lugar a resistencia a eritromicina (Randolph-Anderson et al., 2015).

Tabla 2. Marcadores de selección para la transformación del cloroplasto.

Marcador	Modo de selección	Referencia
<i>aadA</i>	Resistencia espectinomicina/estreptomycin	Goldschmidt-Clermont, 1991
<i>aphA6</i>	Resistencia kanamicina	Bateman y Purton, 2000
<i>rmsS</i> y <i>rmsL</i>	Resistencia espectinomicina, estreptomycin y eritromicina	Randolph-Anderson et al., 2015
<i>atpB</i>	Restauración de fotosíntesis (fototrofia)	Bateman y Purton, 2000
<i>nifH</i>	Restauración de fotosíntesis (fototrofia)	Cheng, Day, Dowson-Day, Shen y Dixon, 2005
<i>psbA</i>	Restauración de fotosíntesis (fototrofia)	Michelet al., 2011
<i>psbH</i>	Restauración de fotosíntesis (fototrofia)	Economou et al., 2014
<i>tscA</i>	Restauración de fotosíntesis (fototrofia)	Kindle, Richards, y Stern, 1991
<i>arg9</i>	Restauración síntesis de arginina (prototrofia)	Remacle et al., 2009
<i>ptxD</i>	Uso de fosfito como única fuente de fósforo	Changko et al., 2020

Artículos

Si bien los diversos métodos de selección descritos anteriormente se pueden utilizar para transformar cepas de tipo silvestre de *C. reinhardtii*, una estrategia alternativa es aprovechar el hecho de que esta especie puede prescindir por completo de la fotosíntesis y crecer heterotróficamente en una fuente de carbono como el acetato. En consecuencia, se han descrito cepas mutantes fotosintéticas que portan eliminaciones o mutaciones puntuales en el plastoma que alteran los genes esenciales de la fotosíntesis (Harris, 2001). La transformación de tales cepas con una copia de tipo silvestre del gen afectado proporciona una selección robusta, ya que la recombinación homóloga restaura una copia funcional del gen en el plastoma, lo que permite la selección de un fenotipo de tipo "silvestre" en medio mínimo (sin acetato). Como consecuencia, la homoplasma con marcadores basados en antibióticos se pueden obtener líneas homoplásmicas incluso después de una sola ronda de aislamiento con una sola colonia (Wannathong et al., 2016). Esto reduce el tiempo para generar transformantes estables a 3-4 semanas (Boynton y Gillham, 1993). El aspecto más

atractivo del uso de un gen endógeno para la selección es que las líneas transformantes están "libres de marcadores" (Chen y Melis, 2013; Bertalan et al., 2015). Como se ilustra en la Figura 2, un GOI se puede dirigir a un sitio neutral río arriba o río abajo del gen fotosintético incorporándolo en uno de los elementos que se usan para flanquear dentro de la construcción de transformación. El transformante resultante contiene sólo el GOI como ADN externo en su plastoma, lo que evita la transferencia de resistencia a antibióticos como el gen *aadA*. Es importante destacar que el uso del alelo de tipo silvestre de un gen endógeno como marcador seleccionable no corre el riesgo de comprometer la eficiencia traslacional o fotosintética, a diferencia de los marcadores basados en mutaciones puntuales dominantes como los genes con resistencia a espectinomicina, estreptomycin y eritromicina (*rrnS/L*). Los mutantes de cloroplasto no fotosintéticos de *C. reinhardtii* que se han empleado como receptores para dicho rescate fototrófico incluyen aquellos que portan grandes deleciones que afectan a los genes *tscA*, *psbA* y *atpB* (Boynton et al., 1988; Goldschmidt-Clermont, 1991).

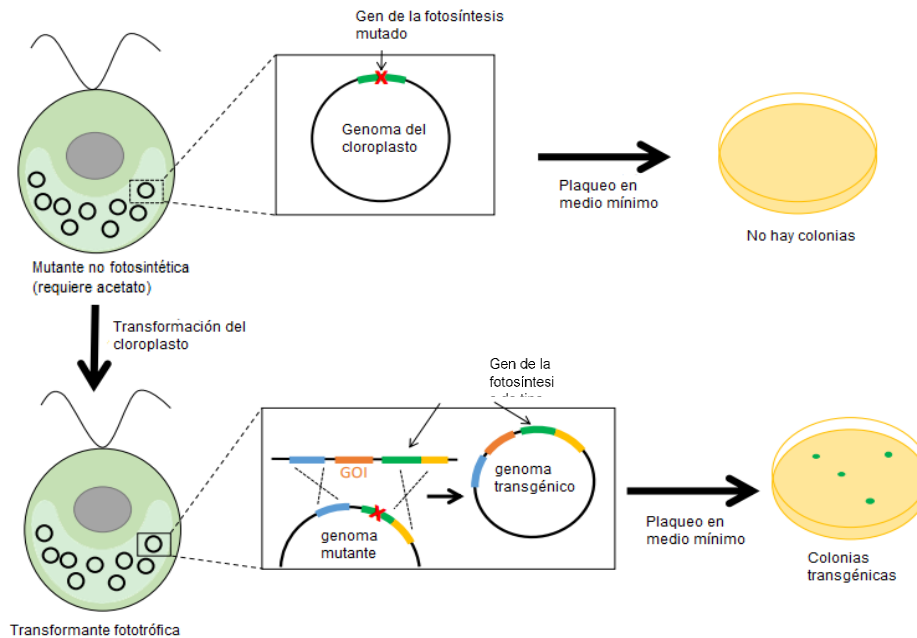


Figura 2. Selección basada en rescate fotosintético. La cepa receptora mutante de *C. reinhardtii* es incapaz de crecimiento fototrófico debido a una deleción o mutación puntual en un gen de fotosíntesis y debe mantenerse en un medio que contenga acetato. La transformación del receptor con el ADN del donante, incluida la versión de tipo silvestre del gen, da como resultado la restauración de la fotosíntesis y la integración concomitante del GOI, lo que permite que los transformantes crezcan en un medio mínimo. Imagen adaptada de Esland et al., 2018.

Existen otras estrategias de selección basadas en marcadores metabólicos que rescatan mutantes auxótrofos. La capacidad de *C. reinhardtii* de tipo silvestre para sintetizar arginina depende de una ruta biosintética que se encuentra predominantemente dentro del cloroplasto. Una enzima clave en esta vía es la N-acetilornitina aminotransferasa (codificada por el gen nuclear *arg9*), y los mutantes afectados en este gen requieren un medio que contenga arginina para sobrevivir (Remacle et al., 2009). Por lo tanto, *arg9* funciona un marcador metabólico en lugar de una enzima de resistencia a antibióticos, lo cual es preferible cuando se buscan estrategias ambientalmente seguras con aplicaciones industriales, evitando así los problemas de bioseguridad asociados a los marcadores con antibióticos. Otra enzima metabólica que se ha desarrollado recientemente como marcador seleccionable para el cloroplasto de *C. reinhardtii* se genera a partir del gen bacteriano *ptxD* que codifica para la fosfito oxidoreductasa (Changko et al., 2020). Los eucariotas y la mayoría de los procariontes no pueden utilizar fosfito (PO_3^{3-}) como fuente de fósforo, sin embargo, la enzima *ptxD* oxida el fosfito a la forma biodisponible en fosfato (PO_4^{3-}) (Kanda et al., 2014). En consecuencia, la enzima *ptxD* se puede utilizar como marcador general para transformar microorganismos de tipo silvestre, incluido *C. reinhardtii*, seleccionando el crecimiento en un medio que contiene fosfito como única fuente de fósforo.

Promotores y secuencias de regiones no traducidas del ARNm (UTRs)

Para obtener proteínas recombinantes con altos rendimientos en microalgas, el diseño en la construcción de expresión del transgén debe optimizarse en todas las etapas de la expresión génica, desde la transcripción hasta la estabilidad de la proteína recombinante en las que se deben incluir varios elementos reguladores. Para obtener niveles altos de transcripción, los elementos clave son los promotores y las regiones no traducidas del ARNm (UTRs) 5'/3'. En el cloroplasto de *C. reinhardtii* la subunidad grande de ribulosa bifsosfato carboxilasa (*rbcL*) (Dreesen et al., 2010), las proteínas D1 y D2 encontradas en el centro de reacción del fotosistema II (*psbD* y *psbA*) (Manuell et al., 2007; Rasala et al., 2010), la subunidad α de la adenosina trifosfatasa (*atpA*) (Sun et al., 2003) y sus respectivas regiones no traducidas (UTRs) son las opciones más elegidas (Surzycki et al., 2009). Los promotores del cloroplasto de *C. reinhardtii* usados para la expresión de proteínas heterólogas se resumen en la Tabla 3.

Se sabe que las estructuras secundarias de ARN son cruciales para la estabilidad de la transcripción, por ejemplo, los bucles de tallo (loops) que se encuentran a menudo en los extremos 5' y 3' de los ARNm afectan la transcripción. En un estudio se mostró que el tallo-bucle del ARN es esencial en el

Tabla 3. Promotores del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* utilizados para la expresión de proteínas heterólogas.

Promotor	Gen	Proteína	Nivel de expresión (% TPS)	Referencia
<i>atpA</i>	subunidad α de la adenosina trifosfatasa	CTBVP1	~ 3–4	Sun et al., 2003
<i>psbD</i>	Fotosistema II D1	M-SAA	~ 0.25	Manuell et al., 2007
<i>rbcL</i>	Subunidad grande de Rubisco	CTBD2	~ 0.7	Dreesen et al., 2010
<i>psbA</i>	Fotosistema II	14FN3	~ 3	Rasala et al., 2010

CTBVP1: Proteína de fusión que comprende la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa y la subunidad B de la toxina del cólera

M-SAA: Amiloide sérico asociado a la mama

CTBD2: Proteína de fusión que comprende el dominio de unión a fibronectina D2 de *S. aureus* y la subunidad B de la toxina del cólera

14FN3: Dominio 14 de la fibronectina humana

extremo 5' para la correcta transcripción del gen *rbcL* en *Chlamydomonas*. Alterar dicha estructura hace que las transcripciones sean inestables. Por lo tanto, estas regiones específicas dentro de los UTRs 5' pueden impactar la estabilidad del ARNm y usarse para aumentar o reducir la producción de proteínas recombinantes (Salvador et al., 2004; Suay et al., 2005). Además, se sabe que los UTR 5' de los ARNm en los plástidos contienen elementos clave como las proteínas de unión a RNA (RBP) las cuales podrían establecer un andamio proteico para las transcripciones del cloroplasto, ayudando a mejorar la estabilidad del ARN y el plegamiento del ARN (Nickelsen, 2003). En contraste, el UTR 3' tiene relativamente poca influencia en el nivel de expresión heteróloga. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la secuencia y la estructura de las UTRs 3' tienen papeles funcionales en la regulación de la elongación, terminación, estabilización y acumulación del ARNm (Blowers et al., 1993; Rott et al., 1998; Stern et al., 1991). Todas estas observaciones sugieren que la traducción y la acumulación de ARNm están determinadas principalmente por el promotor y el UTR 5' apropiado; por lo tanto, la elección de regiones promotoras y reguladoras son factores críticos que se deben considerar para cada proteína de interés con el fin de lograr un alto rendimiento de proteínas recombinantes.

Producción de proteínas recombinantes en cloroplasto de *C. reinhardtii*

Como se describió anteriormente, *C. reinhardtii* ha demostrado ser una plataforma muy versátil con diversas aplicaciones biotecnológicas, y es una alternativa muy atractiva para la producción de una amplia variedad de proteínas recombinantes con aplicación médica. Sin embargo, el número de informes exitosos sigue siendo bajo, especialmente en comparación con otros sistemas de expresión como *Escherichia coli*, células de mamífero (células de ovario de hámster chino, CHO) y plantas transgénicas. El uso de células de mamífero para producir proteínas recombinantes tiene la ventaja de que estas proteínas son idénticas a las de origen humano; sin embargo, el cultivo de estas células es costoso, además de que se corre el riesgo de tener contaminación viral o priónica (Kwon et al., 2018). Por otra parte, las bacterias pueden usarse para producir

proteínas recombinantes a gran escala, pero tienen la desventaja de carecer de muchas de las modificaciones postraduccionales (metilación, glucosilación) necesarias para las proteínas complejas. Como organismos eucariotas, las plantas transgénicas superan este obstáculo y se ha demostrado ampliamente que las plantas ofrecen un sistema económico para la expresión de ciertas proteínas en la industria biotecnológica (Daniell et al., 2001; Peters y Stoger 2011). En cambio, *C. reinhardtii* presenta tiempos cortos de producción, bajo riesgo de patogenicidad (no se conocen patógenos o toxinas que pudieran causar contaminación en el producto final, como en el caso de bacterias y células de mamíferos), y se ha demostrado su capacidad para sintetizar proteínas complejas de origen humano.

En los siguientes párrafos se describen algunos trabajos que han explotado el uso del cloroplasto de *C. reinhardtii* como plataforma para producir proteínas recombinantes de interés médico (Tabla 4). La primera proteína terapéutica expresada en el cloroplasto de *C. reinhardtii* fue el anticuerpo monocatenario contra la glicoproteína D del virus del herpes simple. El anticuerpo expresado formó enlaces disulfuro y se acumuló como una proteína soluble capaz de unirse a la proteína D del virus del herpes *in vitro* (Mayfield et al., 2003). El virus de la fiebre aftosa es un virus severo y altamente contagioso que afecta al ganado y tiene un impacto significativo en la economía.

La vacuna de subunidad viral contra la fiebre aftosa consistió en la proteína estructural VP1 fusionada con la subunidad B de la toxina del cólera, un potente adyuvante en mucosas, se expresó en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. El nivel de acumulación de la proteína VP1 alcanzó hasta un 3% de la proteína soluble total, fue más alto que el nivel informado en estudios previos en plantas. La proteína de fusión expresada tenía tanto antigenicidad como afinidad de unión hacia el gangliósido GM1 (Sun et al., 2003). La proteína E2 como candidata a vacuna contra el virus de la peste porcina clásica (CSFV) se expresó en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. Aunque la inmunización subcutánea de extractos de algas condujo a la inducción de una respuesta sistémica, la inmunización oral no dio como resultado una respuesta a nivel sistémico y mucosas (He et al., 2007). En 2007, se

Artículos

Tabla 4. Productos recombinantes expresados en cloroplasto de *C. reinhardtii*. Información adaptada de Shamriz y Ofoghi, 2016.

(TSP: Proteína total soluble. Dw: peso seco).

Aplicación	Proteína recombinante	Técnica de transformación	Respuesta encontrada	Nivel de expresión	Referencia
Anticuerpo	Anticuerpo dirigido contra la glicoproteína D del virus del herpes (HsV8-Lsc)	Biolística	El anticuerpo fue capaz de unirse a la proteína D del virus del herpes <i>in vitro</i>	1% TSP	Mayfield et al. (2003)
	Anticuerpo monoclonal humano contra el antígeno protector 83 del ántrax (PA83)	Biolística	El anticuerpo fue capaz de unirse y neutralizar la toxina del ántrax	0.01% Dw	Tran et al. (2009)
Vacuna	Descarboxilasa del ácido glutámico humano (hGDA65) contra diabetes tipo I	Biolística	Reacciona con sueros de pacientes diabéticos y es inmunogénico en ratones NOD	0.25-0.3% TSP	Wang et al. (2008)
	Dominio de unión a fibronectina D2 de <i>Staphylococcus aureus</i> fusionada con CTB de la toxina del colera	Biolística	Se indujeron respuestas inmunitarias sistémicas y mucosas por vía oral. El 80% de los ratones vacunados sobrevivieron al desafío letal de <i>S. aureus</i>	0.7% TSP	Dreesen et al., (2010)
	Proteína estructural E2 del virus de la peste porcina clásica (CSFV)	Biolística	La inmunización subcutánea de ratones con extractos de algas indujo la producción de anticuerpos contra la proteína E2	1.5-2% TSP	He et al., (2007)
Enzima	Diterpeno sintasa	Perlas de vidrio	El método de transformación es adecuado para la expresión heteróloga, la proteína se expresa de forma estable	3.7% TSP	Zedler et al., (2015)
Inmunotoxina	Un anticuerpo (ssFv) que reconoce a CD22, un epítipo de superficie de células B fusionada al dominio enzimático de la exotoxina A de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biolística	Las inmunotoxinas se produjeron en las células de <i>C. reinhardtii</i> sin ser tóxicas para ellas y enzimáticamente activas, se unen a las células B diana y las matan de manera eficiente <i>in vitro</i> .	0.3-0.4% TSP	Tran et al., (2013)
Proteína terapéutica	Isoforma 121 del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF)	Biolística	Activa en ensayo de unión al receptor VEGF	2% TSP	Rasala et al., (2010)
	Proteína B1 de grupo de alta movilidad (HMGB1)	Biolística	Activa en ensayo de quimiotaxis de fibroblasto	2.5% TSP	Rasala et al., (2010)

produjo una proteína amiloide sérica asociada a la mama bovina (M-SAA) y se demostró que la M-SAA se acumulaba en cloroplasto de forma soluble (>5% de la proteína total), sugiriendo que la proteína estaba correctamente plegada y era biológicamente activa. El hallazgo más importante de este estudio fue que el promotor *psbA* da como resultado un mayor nivel de acumulación de proteínas recombinantes en ausencia del gen *psbA* endógeno (Manuell et al., 2007). El gen de la descarboxilasa del ácido glutámico humano (hGAD65), un antígeno autoinmune principal para la diabetes tipo 1, se expresó bajo el control del promotor *rbcl* del cloroplasto. Wang y colaboradores (2008), demostraron que la acumulación de hGAD65 era mayor (0.25-0.3% de proteína total soluble) en comparación con el nivel obtenido de plantas transgénicas. La antigenicidad de hGAD65 expresada en *C. reinhardtii* se demostró con su inmunorreactividad a sueros diabéticos por ELISA y por su capacidad para inducir la proliferación de células del bazo de ratones diabéticos no obesos (NOD) (Wang et al., 2008).

Así mismo, en el cloroplasto de *C. reinhardtii* se expresó un anticuerpo monoclonal humano de longitud completa contra una proteína de *Bacillus anthracis*. Los resultados demostraron que el anticuerpo expresado tenía una estructura funcional y también una actividad de unión a antígeno similar a la expresada en el sistema de células animales CHO (Tran et al., 2009). En 2010, Rasala y colaboradores evaluaron la expresión de siete proteínas terapéuticas en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. Cuatro de las proteínas se acumularon a niveles superiores al 2% y fueron biológicamente activas, mientras que, para las tres proteínas restantes, no se detectó expresión debido a que estas proteínas se expresaban mal y eran muy inestables o sus regiones codificantes impidieron de alguna manera la traducción de los ARNm quiméricos (Rasala et al., 2010). También, se demostró por primera vez, que ciertas inmunotoxinas en su forma monomérica y dimerica pueden producirse en el cloroplasto de *C. reinhardtii* sin ser tóxicas, debido a que están secuestradas en el compartimento del cloroplasto (Tran et al., 2013).

Aunque el cloroplasto proporciona un entorno adecuado para la formación de enlaces disulfuro y el plegamiento adecuado de proteínas, la glicosilación deseable no se realiza en este compartimento. Sin embargo, el estado de glicosilación de las microalgas

está aún más cerca de los patrones humanos en comparación con la glicosilación en bacterias y levaduras. Los avances recientes en la glicoingeniería de microalgas modelos (*C. reinhardtii*, *P. tricornutum*) han mostrado que tienen un gran potencial para producir productos biofarmacéuticos no inmunogénicos en microalgas (Barolo et al., 2020). En 2013, Gregory y colaboradores, explotaron esta característica y expresaron con éxito las proteínas Pfs25 y Pfs28 pero sin glicosilar de *Plasmodium falciparum* en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. Por otra parte, se expresó la proteína E7 en *C. reinhardtii* con el propósito de generar una vacuna oral contra cáncer por VPH. La infección por el virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16) es la principal causa del desarrollo del cáncer de cuello uterino. Los resultados mostraron que en comparación con plantas de tabaco transplastómicas (0.1% PTS), el rendimiento obtenido de E7 fue mayor a 0.12% en fracción soluble. Así mismo, se lograron altos niveles de protección después de inyecciones subcutáneas con la proteína E7 generada en *C. reinhardtii* recombinante (Demurtas et al., 2013). El éxito de todos estos resultados para producir proteínas recombinantes basados en el cloroplasto de *C. reinhardtii* demuestra el potencial de esta plataforma para competir con los sistemas de producción actuales.

Desafíos futuros en la ingeniería del genoma del cloroplasto

La expresión exitosa de muchas proteínas recombinantes bioactivas (como enzimas y proteínas terapéuticas) en el cloroplasto de *C. reinhardtii* han demostrado el potencial de esta especie como plataforma para competir con los sistemas de producción actuales. Sin embargo, para la explotación comercial de *C. reinhardtii* se requerirá un mayor avance en la ingeniería del genoma del cloroplasto para abordar sus limitantes de tal forma que su uso industrial sea factible. Debido a que el sistema de expresión de las algas está todavía en investigación y desarrollo, existen muchas estrategias moleculares que aún se deben probar o mejorar para aumentar la acumulación de proteínas recombinantes. Por ejemplo: el desarrollo de marcadores adicionales para manipular cepas de tipo silvestre (fototróficas) que no se basan en la selección de antibióticos y, por lo tanto, lograr una mejor aceptación pública. La combinación de

ingeniería nuclear y cloroplasto permite obtener cepas en las que la síntesis del producto esté bajo control nuclear, o cepas que produzcan metabolitos nuevos (como: terpenoides o lípidos) a través de las vías biosintéticas localizadas en cloroplasto y citosol (Fuentes et al., 2018).

Actualmente, casi todos los informes de ingeniería del cloroplasto de *C. reinhardtii* involucran transgenes únicos (Purton et al., 2013; Young y Purton, 2018), y sólo hay un par de informes en los que dos transgenes se han co-transcrito con éxito o se han dirigido a loci separados (Dyo y Purton, 2018). Sin embargo, el avance en la ingeniería metabólica del cloroplasto en plantas abre nuevas oportunidades para la explotación del cloroplasto en microalgas (Saxena et al., 2014). A medida que se establezcan los métodos para la manipulación molecular y de ingeniería de procesos, se puede esperar que la producción aumente y los costos disminuyan, lo que podría hacer que la producción de proteínas recombinantes en microalgas sea un sistema económicamente rentable y de uso rutinario en un futuro próximo, para producir una amplia variedad de proteínas recombinantes. Actualmente, las empresas biotecnológicas interesadas en el uso comercial de *C. reinhardtii*, son pocas. Mera Pharmaceuticals, Inc. (<http://www.merapharma.com>), esta compañía cultiva algas transgénicas que expresan proteínas recombinantes dentro del cloroplasto. Phycotransgenics, (<http://www.phycotransgenics.com>), donde han desarrollado algas transgénicas para aplicaciones en el área de la salud animal y la biorremediación. Triton Algae Innovations (<https://www.tritonai.com>); Microsynbiotix (<https://www.microsynbiotix.com>) y Axitan (<http://www.axitan.com>), realizan investigaciones para usar el cloroplasto de *C. reinhardtii* como una plataforma para fabricar compuestos de alto valor, tales como vacunas y proteínas de calostro.

Conclusiones

Las estrategias moleculares en la ingeniería del genoma del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* han demostrado ser un campo importante en la producción de proteínas recombinantes de alto valor comercial. Sin embargo, es necesario optimizar el uso de la ingeniería del genoma

del cloroplasto de *C. reinhardtii* para posicionar a esta especie como una nueva plataforma de expresión para la industria biotecnológica. Hasta la fecha, la mayoría de los productos recombinantes de *C. reinhardtii* se encuentran en las primeras etapas de investigación y solo algunos de ellos se han probado en experimentos con animales. No obstante, *C. reinhardtii* tiene el potencial de ser uno de los principales modelos de investigación básica y aplicada en microalgas con fines de producción de proteínas de valor agregado con diferentes aplicaciones.

Referencias

- Almaraz-Delgado AL, Flores-Urbe J, Pérez-España VH, Salgado-Manjarrez E, Badillo Corona JA (2014) Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *AMB express*, 4(1):1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0057-4>
- Barolo L, Abbriano RM, Commault AS, et al. (2020) Perspectives for glyco-engineering of recombinant biopharmaceuticals from microalgae. *Cells*, 9(3), 633. <https://doi.org/10.3390/cells9030633>
- Bateman JM, Purton S (2000) Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: Expression vectors and a new dominant selectable marker. *Mol Gen Genet*, 263:404–410. <https://doi.org/10.1007/s004380051184>
- Bertalan I, Munder MC, Weiß C, Kopf J, Fischer D, Johanningmeier U (2015) A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol*, 195:60–66. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.017>
- Blowers AD, Klein U, Ellmore GS, Bogorad L (1993) Functional *in vivo* analyses of the 3' flanking sequences of the *Chlamydomonas* chloroplast *rbcL* and *psaB* genes. *Mol Gen Genet*, 238(3):339–349. <https://doi.org/10.1007/BF00291992>
- Bock R (2015) Engineering plastid genomes: methods, tools, and applications in basic research and biotechnology. *Annu Rev Plant Biol*, 66:211–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040212>

- Borowitzka MA (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol.* 70:313-321. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)
- Boynton J, Gillham N, Harris E, et al. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 240(4858):1534–1538. <https://doi.org/10.1126/science.2897716>
- Boynton JE, Gillham NW (1993) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas*. *Methods Enzymol*, 217:510–536. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17087-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)17087-1)
- Castellanos-Huerta I, Bañuelos-Hernández B, Téllez G, et al. (2016) Recombinant hemagglutinin of avian influenza virus H5 expressed in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* and evaluation of its immunogenicity in chickens. *Avian Dis*, 60(4):784–791. <https://doi.org/10.1637/11427-042816-Reg>
- Changko S, Rajakumar PD, Young R, Purton S (2020) The phosphite oxidoreductase gene, ptxD as a bio-contained chloroplast marker and crop-protection tool for algal biotechnology using *Chlamydomonas*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104(2):675–686. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10258-7>
- Chen HC, Melis A (2013) Marker-free genetic engineering of the chloroplast in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J*, 11:818–828. <https://doi.org/10.1111/pbi.12073>
- Coll J (2006) Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae: A review. *Spanish J Agri Res*, 4:316–330. <https://doi.org/10.5424/sjar/2006044-209>
- Daniell H (2006) Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol J*; 1:1071-9. <https://doi.org/10.1002/biot.200600145>
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* 6:219–226. [doi:10.1016/S1360-1385\(01\)01922-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01922-7)
- de Morais, MG, Vaz B, de Morais EG, Costa JA (2015) Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed Res Int*, 2015:835761. <https://doi.org/10.1155/2015/835761>
- Demain AL, Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*, 27:297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Demurtas OC, Massa S, Ferrante P, Venuti A, Franconi R, Giuliano GA (2013) *Chlamydomonas*-derived human papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection. *PLoS ONE*, 8(4):e61473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061473>
- Dreesen IAJ, Hamri GC-E, Fussenegger M (2010) Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *J Biotechnol*, 145:273–280. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.12.006>
- Dyo YM, Purton S (2018) The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Microbiology*, (Reading), 164:113–121. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000599>
- Dove A (2002) Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nat. Biotechnol.* 20, 777–779. <https://doi.org/10.1038/nbt0802-777>
- Economou C, Wannathong T, Szaub J, Purton S (2014) A simple, low-cost method for chloroplast transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In *Chloroplast biotechnology: Methods and protocols* (pp. 401–411). New York, NY: Springer Science, Business Media.
- Esland L, Larrea-Alvarez M, Purton S (2018) Selectable markers and reporter genes for engineering the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biology*, 7(4), 46. <https://doi.org/10.3390/biology7040046>
- Fernández I, Ación FG, Fernández JM, Guzmán JL, Magán JJ, Berenguel M (2012) Dynamic model of microalgal production in tubular photobioreactors. *Bioresour Technol.*, 126:172-181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.087>

- Franklin S, Ngo B, Efuet E, et al (2002) Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J*, 30:733–744. <https://doi.org/10.1046/j.1365313x.2002.01319.x>
- Fuentes P, Armarego-Marriott T, Bock R (2018). Plastid transformation and its application in metabolic engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 49, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.004>
- Fukusaki E, Nishikawa T, Kato K, Shinmyo A, Hemmi H, Nishino T, Kobayashi A (2003). Introduction of the archaeobacterial geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene into *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *J Biosci Bioeng*; 95:283–287. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(03\)80030-0](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(03)80030-0)
- Gallaher SD, Fitz-Gibbon ST, Strenkert D, Purvine SO, Pellegrini M, Merchant SS (2018) High-throughput sequencing of the chloroplast and mitochondrion of *Chlamydomonas reinhardtii* to generate improved de novo assemblies, analyze expression patterns and transcript speciation, and evaluate diversity among laboratory strains and wild isolates. *Plant J*, 93:545–565. <https://doi.org/10.1111/tpj.13788>
- Gangl D, Zedler JAZ, Włodarczyk A, Jensen PE, Purton S, Robinson C (2015) Expression and membrane-targeting of an active plant cytochrome P450 in the chloroplast of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 110, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.006>
- Goldschmidt-Clermont M (1991) Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: A selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res*, 19:4083–4089. <https://doi.org/10.1093/nar/19.15.4083>
- Gregory JA, Shepley-McTaggart A, Umpierrez M, et al. (2016) Immunotherapy using algal-produced Ara h 1 core domain suppresses peanut allergy in mice. *Plant Biotechnol J*, 14:1541–1550. <https://doi.org/10.1111/pbi.12515>
- Gregory JA, Topol AB, Doerner DZ, Mayfield S (2013) Alga-produced cholera toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines. *Appl Environ Microbiol*, 79:3917–3925. <https://doi.org/10.1128/AEM.00714-13>
- Harris EH (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52:363–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>
- Harris EH (2009) The *Chlamydomonas* sourcebook: introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use, Second Edition. Oxford: Academic Press.
- He DM, Qian KX, Shen GF, Zhang ZF, Yi-Nü L, Su ZL, Shao HB (2007) Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 55:26–30. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.10.042>
- Hirschl S, Ralser C, Asam C, et al. (2017) Expression and characterization of functional recombinant Bet v 1.0101 in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int Arch Allergy Immunol*, 173:44–50. <https://doi.org/10.1159/000471852>
- Janssen M, de Bresser L, Baijens T, Tramper J, Mur LR, Snel JFH, Wijffels RH (2000). Scale-up aspects of photobioreactors: effects of mixing-induced light/dark cycles. *J App Phycol* 12:225–237. <https://doi.org/10.1023/A:1008151526680>
- Jones CS, Luong T, Hannon M, et al. (2013) Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97:1987–1995. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4071-7>
- Kanda K, Ishida T, Hirota R, et al. (2014) Application of a phosphite dehydrogenase gene as a novel dominant selection marker for yeasts. *J Biotechnol*, 182:68–73. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.012>
- Kang S, Odom OW, Malone CL, Thangamani S, Herrin DL (2018) Expression of a synthetic gene for the major cytotoxin (Cyt1Aa) of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis in the chloroplast of wild-type *Chlamydomonas*. *Biology (Basel)*, 7(2):29. <https://doi.org/10.3390/biology7020029>

- Kwon YM, Kim KW, Choi TY, Kim SY, Kim J (2018) Manipulation of the microalgal chloroplast by genetic engineering for biotechnological utilization as a green biofactory. *World J Microbiol Biotechnol*; 34:183. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2567-8>
- Lapina T, Zalutskaya Z, Anikina A, Ermilova E (2013) Accumulation and export of glycerol in unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biol Commun*, 2:36–40. <https://biocomm.spbu.ru/article/view/2638>
- Larosa V, Remacle C (2013). Transformation of the mitochondrial genome. *Int J Dev Biol*, 57:659–665. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130230cr>
- Maikova A, Zalutskaya Z, Lapina T, Ermilova E (2016) The HSP70 chaperone machines of *Chlamydomonas* are induced by cold stress. *J Plant Physiol*, 204:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.07.012>
- Manuell AL, Beligni MV, Elder JH, et al. (2007) Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnol J*; 5:402-12. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00249.x>
- Mayfield SP, Franklin SE, Lerner RA (2003) Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100:438–442. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237108100>
- Mayfield SP, Manuell AL, Chen S, Wu J, Tran M, Siefker D, Marin-Navarro J (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin Biotechnol*, 18:126–133. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.02.001>
- Mayfield SP, Schultz J (2004) Development of a luciferase reporter gene, luxCt, for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J*; 37:449–458. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01965.x>
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, et al. (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318:245–250. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
- Moazami N, Ashori A, Ranjbar R, Tangestani M, Eghtesadi R, Nejad AS (2012) Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass Bioenergy*, 39:49–453. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.01.046>
- Moazami N, Ranjbar R, Ashori A, Tangestani M, Nejad AS (2011) Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island. *Biomass Bioenergy*, 35:1935–1939. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.039>
- Moazez Y, Memari HR, Ofoghi H, Roayaei M, Ahmadi DN (2013) Evaluation of *Spirulina platensis* resistance to different antibiotics to find a selectable marker for genetic transformation. *Jundishapur J Microbiol*, 7:e5456. <https://doi.org/10.5812/jjm.4556>
- Moon M, Kim CW, Park WK, Yoo G, Choi YE, Yang JW (2013) Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res*, 2:352–357. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.003>
- Murbach TS, Glávits R, Endres JR, Hirka G, Vértési A, Béres E, Szakonyiné IP (2018) A toxicological evaluation of *Chlamydomonas reinhardtii*, a Green Algae. *Int J Toxicol*, 37:53–62. <https://doi.org/10.1177/1091581817746109>
- Mussgnug JH (2015) Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99:5407–5418. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6698-7>
- Nickelsen J (2003). Chloroplast RNA-binding proteins. *Curr Genet*; 43:392–399. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0425-0>
- Ofoghi H, Mironova R, Moazami N, Domonsky N, Ivanov I (1999) Human calcitonin tetrameric gene: comparative expression in yeast and transgenic potato plants. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 13:20–24. <https://doi.org/10.1080/13102818.1999.10819012>
- Palomares LA, Estrada-Moncada S, Ramírez OT (2004) Production of recombinant proteins In P. Balbas, A. Lorence (Eds.), *Reviews and Protocols: Recombinant Gene Expression* (pp. 15–51). Springer.

- Papaefthimiou D, Diretto G, Demurtas OC, Mini P, Ferrante P, Giuliano G, Kanellis AK (2019). Heterologous production of labdane-type diterpenes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry*; 167:112082. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112082>
- Peters J, Stoger E (2011) Transgenic crops for the production of recombinant vaccines and anti-microbial antibodies. *Hum Vaccin* 7:367-374. doi:10.4161/hv.7.3.14303
- Pulz O (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57:287–293. <https://doi.org/10.1007/s002530100702>
- Purton S, Szaub J, Wannathong T, Young R, Economou C (2013). Genetic engineering of algal chloroplasts: Progress and prospects. *Russ J Plant Physiol*; 60:491–499. <https://doi.org/10.1134/S1021443713040146>
- Purton S (2007) Tools and techniques for chloroplast transformation of *Chlamydomonas*. *Adv Exp Med Biol*; 616:34–45. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75532-8_4
- Randolph-Anderson B, Boynton JE, Dawson J, Dunder E, Eskes R, Gillham NW, Heiser WC (2015). Sub-micron gold particles are superior to larger particles for efficient biolistic transformation of organelles and some cell types. *US/EG Bulletin (BIO-RAD)*. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2015.pdf. Consultado julio de 2021.
- Rasala BA, Muto M, Lee PA, et al. (2010) Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J*; 8:719-733. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00503.x>
- Remacle C, Cline S, Boutaffala L, Gabilly S, Larosa V, Barbieri MR, Hamel PP (2009) The ARG9 gene encodes the plastid-resident N-acetyl ornithine aminotransferase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*; 8:1460–1463. <https://doi.org/10.1128/EC.00108-09>
- Richter LV, Yang H, Yazdani M, Hanson MR, Ahner BA (2018) A downstream box fusion allows stable accumulation of a bacterial cellulase in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Biotechnol Biofuels*; 11:133. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1127-7>
- Rosales-Mendoza S, Paz-Maldonado LM, Soria-Guerra RE (2012) *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Rep*. 31:479–494. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1186-8>
- Rott R, Liveanu V, Drager RG, Stern DB, Schuster G (1998) The sequence and structure of the 3'-untranslated regions of chloroplast transcripts are important determinants of mRNA accumulation and stability. *Plant Mol Biol*; 36:307–314. <https://doi.org/10.1023/a:1005943701253>
- Sakamoto W, Kindle KL, Stern DB (1993) In vivo analysis of *Chlamydomonas* chloroplast *petD* gene expression using stable transformation of beta-glucuronidase translational fusions. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:497-501. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.497>
- Salehzadeh A, Ofoghi H, Roohvand F, Aghasadeghi MR, Parivar K (2012) Human calcitonin (hCT) gene expression and secretion by *Pichia pastoris*. *Rom Biotechnol Lett*; 17:7036–7042.
- Salvador ML, Suay L, Anthonisen IL, Klein U (2004) Changes in the 5'-untranslated region of the *rbcL* gene accelerate transcript degradation more than 50-fold in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet*; 45:176–182. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0470-8>
- Saxena B, Subramaniyan M, Malhotra K, Bhavesh, NS, Potlakayala, SD, Kumar S (2014) Metabolic engineering of chloroplasts for artemisinic acid biosynthesis and impact on plant growth. *J Biosci*. 39:33–41. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9402-z>
- Schötz F, Bathelt H, Arnold CG, Schimmer O (1972) The architecture and organization of the *Chlamydomonas* cell. Results of serial-section electron microscopy and a three-dimensional reconstruction. *Protoplasma*; 75:229-54. <https://doi.org/10.1007/BF01279818>

- Shamriz S, Ofoghi H, Amini-bayat Z (2016) Soluble expression of recombinant nerve growth factor in cytoplasm of *Escherichia coli*. Iran J Biotechnol, 14:16–22. <https://doi.org/10.15171/ijb.1331>
- Shamriz S, Ofoghi H (2016). Outlook in the application of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast as a platform for recombinant protein production. Biotechnol Genet Eng Rev; 32:92–106. <https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1307673>
- Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, Usuda H (1998). High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. Genetics; 148:1821–1828.
- Stern DB, Radwanski ER, Kindle KL (1991). A 3' stem/loop structure of the *Chlamydomonas* chloroplast *atpB* gene regulates mRNA accumulation in vivo. Plant Cell; 3:285–297. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.3.285>
- Su Z, Qian K, Tan C, et al. (2005) Recombination and heterologous expression of allophycocyanin gene in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. Acta Biochim Biophys Sin: 37:709–712. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00092.x>
- Suay L, Salvador ML, Abesha E, Klein U (2005) Specific roles of 5' RNA secondary structures in stabilizing transcripts in chloroplasts. Nucleic Acids Res; 33:4754–4761. <https://doi.org/10.1093/nar/gki760>
- Sun M, Qian K, Su, N, Chang H, Liu J, Shen G (2003) Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. Biotechnol Lett; 25:1087–1092. <https://doi.org/10.1023/a:1024140114505>
- Surzycki R, Greenham K, Kitayama K, et al. (2009) Factors effecting expression of vaccines in microalgae. Biologicals; 37:133-8. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.02.005>
- Taunt HN, Stoffels L, Purton S (2018) Green biologics: The algal chloroplast as a platform for making biopharmaceuticals. Bioengineered; 9:48–54. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1377867>
- Tevatia R, Payne S, Allen J, et al. (2019). A synthetic *cdo/csad* taurine pathway in the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Algal Research; 40:101491. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101491>
- Tran M, Van C, Barrera DJ, Pettersson PL, Peinado CD, Bui J, Mayfield SP (2013) Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. Proc Natl Acad Sci USA; 110:E15–E22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214638110>
- Tran M, Zhou B, Pettersson PL, Gonzalez MJ, Mayfield SP (2009) Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. Biotechnol Bioeng; 104:663–673. <https://doi.org/10.1002/bit.22446>
- Valledor L, Furuhashi T, Hanak AM, Weckwerth W (2013) Systemic cold stress adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol Cell Proteomics; 12:2032–2047. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.026765>
- Walker TL, Purton S, Becker DK, Collet C (2005) Microalgae as bioreactors. Plant Cell Rep; 24:629–641. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0004-6>
- Wang X, Brandsma M, Tremblay R, Maxwell D, Jevnikar AM, Huner N, Ma S (2008) A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). BMC Biotechnol; 8:87. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-87>
- Wang SK, Stiles AR, Guo C, Liu CZ (2014) Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. Eng. Life Sci. 14:550-559. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300170>

Artículos

Wannathong T, Waterhouse JC, Young REB, Economou CK, Purton S (2016) New tools for chloroplast genetic engineering allow the synthesis of human growth hormone in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 100:5467–5477. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7354-6>

Yan N, Fan C, Chen Y, Hu Z (2016) The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. *Int J Mol Sci*. 17:962. <https://doi.org/10.3390/ijms17060962>

Young R, Purton S (2018) CITRIC: cold-inducible translational readthrough in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel temperature-sensitive transfer RNA. *Microb Cell Fact*; 17:186. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1033-5>

Zedler JA, Gangl D, Hamberger B, Purton S, Robinson C (2015) Stable expression of a bifunctional diterpene synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Phycol*; 27:2271–2277. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0504-2>

Conceptos básicos y avances de la transformación genética de las microalgas

Helena Porta

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. 62210, México

helena.porta@ibt.unam.mx

Resumen

Las algas son un grupo de organismos fotosintéticos muy diverso del que se conocen cerca de 30,000 ejemplares diferentes. Dentro del ecosistema de la Tierra, generan gran parte del oxígeno que consumimos los seres vivos, sostienen la biodiversidad de las comunidades marinas, y son, también, organismos modelo para la bioingeniería de enzimas, la producción de biocombustibles y para la biorremediación, además de que brindan una alternativa más amable con el ambiente para la obtención de biomoléculas. De tal forma que la ingeniería genética de las microalgas es uno de los campos de la biotecnología más interesantes y con un desarrollo intensivo. En esta breve revisión se describen algunos eventos históricos; los sistemas más populares debido a su efectividad, como el uso de vectores empleados para transformar plantas y animales, la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o la biobalística; y algunos sistemas novedosos como la generación de librerías de herramientas para transformar el genoma de *Chlamydomonas reinhardtii*; las ventajas de conocer el genoma y plastoma para desarrollar vectores y elegir el uso de los sistemas de edición con nucleasas programables, entre los otros. El propósito general de esta revisión es proporcionar un panorama de los éxitos y de las dificultades enfrentados en este campo y que parecen estar directamente relacionados con la diversidad de este grupo de organismos.

Palabras clave: Transformación genética, microalgas.

Abstract

Coral Algae are a very diverse group of photosynthetic organisms of which about 30,000 different specimens are known. Within the Earth's ecosystem, they generate much of the oxygen that living beings consume, they also sustain the biodiversity of marine communities, and are model organisms for the bioengineering of enzymes, the production of biofuels, and bioremediation. In addition, algae provide a more friendly environmentally alternative to obtain biomolecules. Then, the genetic engineering of microalgae is one of the most interesting and intensively developed biotechnology fields. This brief review describes some historical events, the most popular systems due to their effectiveness, such as the use of vectors used to transform plants and animals, transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, and the use of microprojectiles to deliver DNA into the cell; and some novel systems such as the generation of "tool" libraries to transform the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*; the advantages of knowing the genome and the plastome to develop vectors, and the use of editing systems with programmable nucleases. The general purpose of this review is to provide an overview of the successes and difficulties faced in this field that seems to be directly related to the algae of interest.

Key words: Microalgae, genetic transformation.

Introducción

El término “alga” no se refiere a un grupo taxonómico, si no que, define a un grupo polifilético de organismos que no son plantas superiores, comparten un origen, pero a través de su evolución, adquirieron características similares que incluyen la capacidad de generar oxígeno a través de la fotosíntesis. Evolutivamente están relacionadas a las plantas superiores ya que, además de la fotosíntesis, comparten la mayoría de sus procesos metabólicos y producen compuestos de almacenamiento similares. Sin embargo, las plantas son organismos ampliamente diferenciados en comparación con las algas (Barsanti and Gualtieri 2014).

El tamaño y la forma de las algas es muy diverso, existen macroalgas gigantes de hasta 100 m de longitud y microalgas unicelulares como el plancton vegetal de entre 0.2 y 2 μm . Existen microalgas marinas y de agua dulce, también las hay terrestres creciendo en ambientes húmedos como rocas y troncos. Las algas se clasifican en algas procariotas verde-azules (cianobacterias), y

eucariotas como las rodofitas, feofitas, clorofitas, euglenofitas, carofitas, diatomeas, dinoflagelados, y criptofitas (Figura1)(<http://www.keweenawalgae.mtu.edu/>).

Algunas algas marinas pueden sobrevivir en profundidades de más de 200 m, en donde la penetración de la luz solar es escasa y debido a que poseen pigmentos accesorios pueden absorber y dirigir la energía luminosa a las clorofilas verdes a y b. Estas son las únicas moléculas que pueden convertir energía luminosa en energía química, pero no pueden absorber energía en el espectro luminoso que llega a esa profundidad. En contraste, las algas que viven expuestas a energía luminosa alta, poseen pigmentos que las protegen del foto-daño y de la fotooxidación. Además de vivir en diversos ambientes acuáticos y húmedos algunas microalgas son tolerantes a un amplio rango de temperatura, pH, turbidez, y concentraciones de O_2 y CO_2 .

A través de los años de generar conocimiento acerca de la biología de las microalgas, surgió gran interés en emplearlas para obtener la biomasa para la alimentación de peces, ganado y humanos. Actualmente,

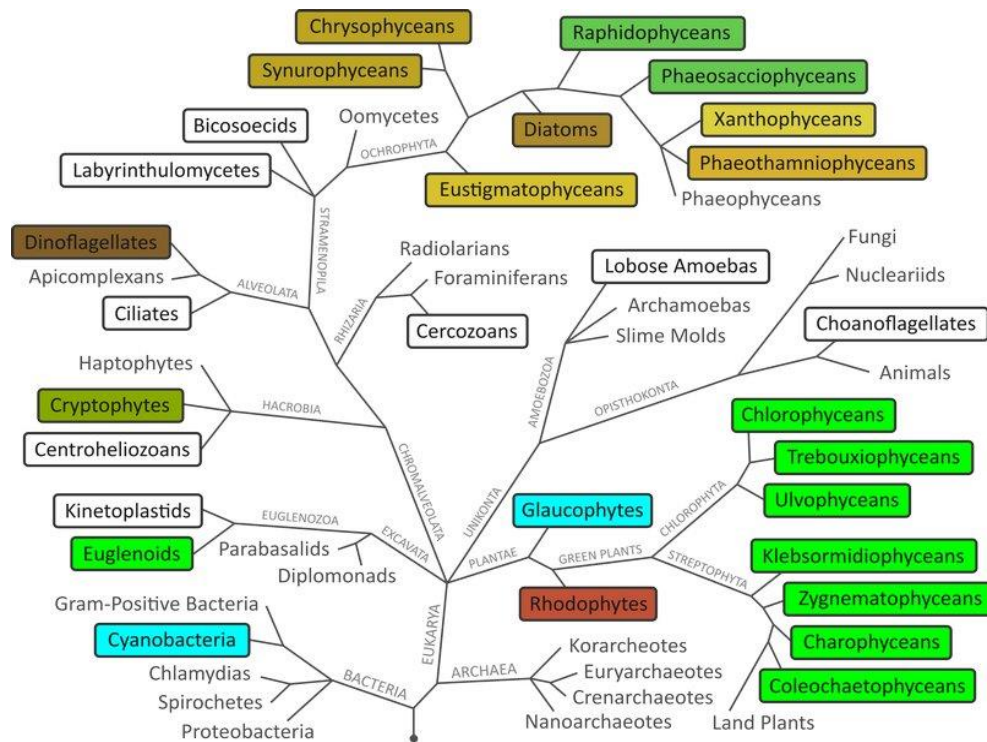


Figura 1. Relación filogenética de los diferentes grupos de organismos que incluyen en la base bacterias, eucariotas y archa. Se puede observar la diversidad de las algas que se encuentran enmarcadas.

Tomado de <http://www.keweenawalgae.mtu.edu/> (agosto 2021).

también hay un gran interés en la generación de biocombustibles, pigmentos como las ficobiliproteínas con colores azules y rojos (ficocianina, aloficociana, ficoeritrina) carotenoides (caroteno, xantofilas) y almidón y almidón florídeo, (polisacárido α -1,4-glucano), por citar algunos ejemplos que se describen a mayor detalle en otros capítulos de este número especial de la revista BioTecnología. En esta revisión se mencionarán algunas consideraciones y de los sistemas más populares para la transformación genética en algas.

Modificación genética de las microalgas

Debido a su diversidad, la generación de microalgas genéticamente modificadas es inherente al organismo ya que puede haber una gran cantidad de variables que la dificultan. En esta breve revisión se hablará de los métodos más comunes y prometedores para conseguir la sobreexpresión o la supresión de genes que permitan entender con mayor profundidad mecanismos de regulación genética, aspectos de biología molecular y fisiología en microalgas, así como la obtención de productos con interés biotecnológico en estos microorganismos.

Las modificaciones genéticas se utilizan en muchas áreas de la investigación científica como las levaduras, las bacterias, las algas, las plantas y las células de mamíferos. A la transferencia del gen deseado, su integración estable en el genoma de la célula blanco y a su expresión se le conoce como transformación genética; a el gen transferido se le conoce como "transgén" y a los organismos que se desarrollan después de una transferencia genética exitosa se les conoce como "transgénicos" (Babaoglu et al. 2000). El conocimiento relacionado a la modificación genética de microalgas tiene sus raíces en la transformación de plantas y como las algas forman parte del reino las plantas, las técnicas de transformación genética de las plantas se han empleado para expresar o inactivar genes en las microalgas.

Conceptualmente, la modificación genética de plantas y otros organismos, implica la inserción de ADN de otro organismo en el genoma del organismo de interés. Por ejemplo, insertar un gen que codifica para la enzima estilbeno sintasa de la uva en el tomate, para permitir la producción del compuesto nutraceutico resveratrol en niveles altos en los tomates (Giovinazzo et al. 2005). En las plantas, se emplean las modificaciones genéticas para

estudiar el efecto de genes de interés y para mejorar los rasgos de las plantas como: el rendimiento, la resistencia a enfermedades, la tolerancia al estrés y producción de nutrientes. Estos conceptos aplican sin duda a la transformación de microalgas.

Sistemas de transformación

Existen dos sistemas básicos para estudiar el efecto de una modificación genética en un organismo blanco: la transformación transitoria y la estable. Ambos se emplean en microalgas.

La expresión de un gen de forma transitoria en células de plantas u otros organismos se puede definir como la producción del mRNA y consecuentemente, de una proteína recombinante durante un período corto de tiempo (2-4 días) después de la transferencia de un ADN exógeno a las células blanco. La expresión es baja tanto en el número de células que expresan como en el nivel de la expresión. Los métodos de transformación transitoria son simples y rápidos y se emplea para contestar el efecto de introducir un gen en la célula y para probar la efectividad de un vector, de un promotor fusionado a un gen reportero. Por ejemplo, la transformación transitoria del gen reportero de la β -glucuronidasa (*gusA*) y la viabilidad de las células transformadas se ha empleado para determinar las condiciones óptimas de transformación, a la que se le denominó el índice de eficiencia de transformación. Este índice permitió definir las condiciones óptimas previas a la selección y obtención de transformantes estables en *Dunaliella tertiolecta* facilitando y asegurando éxito en la obtención del organismo transgénico (Norzagaray-Valenzuela et al. 2018).

La transformación estable se utiliza para la introducción y mantenimiento permanente de un gen en una planta, un alga, en general en cualquier organismo. El gen de interés estará completamente integrado en el genoma del hospedero. Igualmente, que, en la transformación transitoria, es fundamental el uso de marcadores, generalmente antibióticos, para una selección adecuada del organismo modificado, el cual se expresará de forma continua y también se expresará en generaciones posteriores del organismo.

Este tipo de transformación en algas se utiliza para, 1) la investigación de la función de los genes a largo plazo, 2) la producción a largo plazo de un rasgo genético y 3) la producción de

un compuesto a gran escala. En Rathod et al., se puede consultar una tabla con información histórica acerca de los métodos de transformación usados exitosamente en algas (Rathod et al. 2017).

La construcción de vectores y estrategias de selección empleados en algas

Para modificar un gen de interés en un alga se requiere del diseño y construcción de un vector de clonación. Los vectores de clonación son moléculas circulares de ADN extracromosomal que se auto replican independientemente del ADN que llevan insertado y que corresponde al gen se quiere introducir y expresar en el hospedero.

Los vectores para transformar algas se construyen típicamente con base en la selección de un segmento cromosómico propio del organismo de interés. El vector debe llevar: **1) una región promotora**, algunos ejemplos de promotores propios de algas son: el promotor de la proteína de choque térmico (heatshock protein 70, gen *hsp70A*) (Schroda et al. 2000); la región 5' no traducida del gene de la subunidad pequeña de la Ribulosa Bisfosfato carboxilasa (RuBisCO, gen *rbcS2*) de *C. reinhardtii* (Stevens et al. 1996); el promotor de la anhidrasa carbonica1 (DCA1) de *Dunaliella* sp. (Li et al. 2010); el promotor de la proteína de unión de fucoxantina-clorofila a/c (*fcp*) de una diatomea marina (Apt et al. 1996; Miyagawa-Yamaguchi et al. 2011); el promotor del gen de la *actina1* (*PyAct1*) de *Porphyra yezoensis* (Hirata et al. 2011) y el de la proteína de unión de la violaxantina/clorofila a (VCP) de *Nannochloropsis* sp. (Kilian et al. 2011). Recientemente, se reportó que los promotores endógenos de los genes *hsp90* y *epssII* de *Nannochloropsis gaditana* regulan eficientemente la expresión de la proteína reportera mCherry y los proponen como una herramienta útil para la expresión de genes de interés en esta microalga (Ramarajan M. et al. 2019). Se han propuesto el uso de promotores inducibles químicamente, por ejemplo, con L-ramnosa (Kelly et al. 2018), L-arabinosa (Cao et al. 2017), isopropil β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Nozzi et al. 2017), y níquel (Santos-Merino et al. 2018), para regular la expresión del gen de interés; sin embargo, no han resultado atractivos pues algunos son costosos y/o presentan dificultades para su remoción del producto final. En *Synechocystis* sp. se ha empleado el

promotor del gen *cpcG2*, el cual codifica para una proteína de unión del ficobilisoma, y tiene la virtud de responder a la luz que recibe el organismo: la luz verde reprime la expresión del gen reportero y la luz roja lo induce (Shono et al. 2021). Este sistema brinda la ventaja de no utilizan moléculas inductoras difíciles de remover o económicamente desfavorables para un proceso a escala de producción.

Importancia del conocimiento de la secuencia genómica

El conocimiento completo de la secuencia del genoma es una característica relevante para la manipulación genética en las algas y otros organismos, ya que permite conocer si existe homología de genes de diferentes fuentes y sitios de integración dentro del genoma. Hasta el momento se han secuenciado mas de 120 diferentes algas que incluyen fila como Miozoa, Bacillariophyta, Chlorophyta, Careohyta, Rodofitas, Cryptophyta, Haptophyta, Ochrophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Euglenozoa, y Cercozoa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <https://www.algaebase.org/>). En la tabla 1 se muestran una selección de estos proyectos de secuenciación genómica de algas con interés biotecnológico. También se cuenta con varios reportes de análisis de transcriptoma que permitirán un diseño adecuado del proyecto de transformación con una base de información genómica sólida (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbEST/>; <http://amoebidia.bcm.umontreal>).

Algunos promotores usados en plantas y animales se han empleado con éxito razonable, en la transformación de algas cuando no se cuenta con información de su genoma. Por ejemplo, el promotor del virus vacuolizante de simio 40 (SV40) se empleó con éxito para transformar el alga verde *Haematococcus pluvialis* (Teng et al. 2002). En un estudio reportado más recientemente, se evaluó la eficiencia de transformación transitoria del promotor SV40, el promotor del citomegalovirus de humano (CMV) y el del virus del mosaico de la coliflor 35S (CaMV 35S), usando como gen reportero a la proteína verde fluorescente (eGFP), en la clorofita *Tetraselmis subcordiformis*. Interesantemente se obtuvo la mejor tasa de transformación con el promotor CaMV 35S (Cui et al. 2016). Cuando no se tiene información suficiente de la secuencia del alga blanco se pueden emplear vectores de

Artículos

Tabla 1. Algas con interés biotecnológico de las que se conoce la secuencia genómica. (-) no se ha publicado.

Nombre	Filo	Tamaño (MB)	Cepa	Acceso en NCBI	Referencias
<i>Botryococcus braunii</i>	Chlorophyta	184.38	Mf 1.05b.01	GCA_000507305	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlorophyta	120.40	CC-503 cw92 mt+	GCA_000002595	(Barolo et al. 2020)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Chlorophyta	58.53	1230	ASM313072v1	-
<i>Chlorella variabilis</i>	Chlorophyta	46.15	NC64A	GCA_000147415	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	Chlorophyta	39.08	NJ-7	ASM972020v1	-
<i>Desmodesmus armatus</i>	Chlorophyta	116.30	SE107	GCA_007449985	-
<i>Dunaliella salina</i>	Chlorophyta	121.87	CCAP 19/18	GCA_002284615	-
<i>Euglena gracilis</i>	Euglenozoa	1435.52	Z	GCA_900893395	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Chlorophyta	363.77	SAG 192.80	GCA_003970955	-
<i>Haematococcus sp</i>	Chlorophyta	77.83	NG2	ASM433557v1	-
<i>Nannochloris sp.</i>	Chlorophyta	13.74	RS	GCA_004335565	-
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Chlorophyta	33.98	CCMP526	GCA_000240725	-
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Chlorophyta	29.26	LAMB2011	GCA_004519485	(Brown et al. 2019)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Chlorophyta	26.27	CCMP525	GCA_004335455	-
<i>Porphyridium purpureum</i>	Rhodophyta	22.19	CCMP1328	GCA_008690995	-
<i>Scenedesmus sp.</i>	Chlorophyta	151.89	PABB004	GCA_014905635	-
<i>Volvox carteri</i>	Chlorophyta	137.68	Eve	GCA_000143455	-
<i>Tetraselmis striata</i>	Chlorophyta	227.90	LANL1001	GCA_006384855	-
<i>Ulva mutabilis</i>	Chlorophyta	98.48	Wild Type	GCA_900538255	-
<i>Ulva prolifera</i>	Chlorophyta	87.89	YS-2018	GCA_004138255	-

Escherichia coli. Por ejemplo, la transformación exitosa de cepas de las microalgas verdes oleaginosas *Acutodesmus obliquus* y *Neochloris oleoabundans* se logró mediante la transferencia de un vector de expresión de *E. coli* y a través del sistema de conjugación propio de esta bacteria, y se reportó como una herramienta genética novedosa, que abre la posibilidad de transformación de estas microalgas para la obtención de grandes cantidades de triacilglicerol (Muñoz et al. 2019; Muñoz et al. 2019). Evidentemente con las facilidades actuales de obtención de la secuencia genómica se podrán diseñar vectores con promotores *ad hoc* para la transformación eficiente de la microalga de interés.

El vector también debe contener **2) un regulador de la transcripción**. En los vectores de expresión la inclusión de regiones

5' y 3' no traducidas impactan positivamente la expresión de los genes. Con construcciones químicas que incluyen el promotor y las regiones 5' y 3' de los genes codificados en el plasmoma de *C. reinhardtii*, *atpA*, *rbcl*, *psbA*, *psbD* y *16sRNA*, flanqueando al gen reportero *gfp* se observaron diferentes niveles de expresión en cada una de estas construcciones y que la región 3' básicamente no afecta estos niveles (Barnes et al. 2005). El sitio de unión a ribosoma (Ribosome binding site, RBS) también tiene un papel importante en la regulación de la transcripción de genes de cianobacterias de agua dulce y salada (Markley et al. 2015; Wang et al. 2018).

Una de las aplicaciones biotecnológicas más atractivas y de actualidad, radica en la obtención de proteínas de otros organismos en microalgas, para lo cual se han obtenido mejores resultados con la optimización del uso

de codones de la proteína exógena con el propio de la microalga blanco. Tal es el caso de la expresión de gen *ant1* en el cloroplasto de *Haematococcus pluvialis* para la producción de un péptido antimicrobiano propio de los peces teleósteos, la piscidina-4 (Wang et al. 2020). Actualmente, se han desarrollado aplicaciones bioinformáticas de libre acceso para la optimización del uso de codones y para determinar RBS.

En los vectores **3) los genes marcadores de la selección** forman una parte integral de estos y, en términos prácticos, son indispensables en el proceso de transformación. Como la mayoría de los organismos transformados, las células de microalgas transformadas se pueden diferenciar de las células no transformadas mediante la expresión de genes que codifican para proteínas que generan color, fluorescencia, permiten complementar una auxotrofia o que generan resistencia a un antibiótico u otro compuesto químico.

La expresión de genes que codifica para la β -glucuronidasa (*gus*), la β -galactosidasa (*LacZ*) o la proteína fluorescente (*GFP*, *mCherry*, entre otras), se usan cotidianamente como **4) genes reporteros** para seleccionar colonias transformadas y estables. Una nota importante, debido a que algunas algas tienen pigmentos fotosintéticos endógenos y otras sustancias fluorescentes se requiere un promotor fuerte para inducir la expresión de *gfp* y de esta manera prevenir la interferencia del fondo de fluorescencia endógeno (Watanabe et al. 2011).

Los métodos de selección más comúnmente usados se basan en la resistencia a antibióticos y marcadores metabólicos basados en la generación de mutantes auxotróficas. En contraste con las plantas superiores, las algas son resistentes a la neomicina, la kanamicina, y al cloranfenicol (Zienkiewicz et al. 2017), pero son típicamente sensible a la cloromicetina, la higromicina y al herbicida glufosinato. El uso de gen de la resistencia al bialafos (*bar*), que codifica para otro herbicida, se ha empleado exitosamente en la generación de vectores y expresión transgénica en *H. pluvialis* (Wang et al. 2020).

Los avances más importantes en la generación de vectores, la selección de promotores, de regiones reguladoras de la transcripción y marcadores de selección, se

han desarrollado en las cianobacterias, principalmente y en la microalga modelo *C. reinhardtii*. La información generada se encuentra agrupada en una biblioteca de herramientas moleculares denominado "Golden Gate Molecular Cloning" (MoClo) que incluye varios microorganismos con importancia biotecnológica (Crozet et al. 2018). MoClo contiene la información acerca de la generación de vectores y está organizada en "bloques" que se pueden usar como guías para el diseño y la generación de vectores. Aunque esta información se generó a partir de la investigación en organismos modelo como las cianobacterias, es atractiva para planear estrategias similares para algas eucariotas.

Métodos exitosos para la introducción de genes en algas

Para introducir una secuencia de ADN e integrarla en el genoma de la célula huésped, se han descritos sistemas no-biológicos que incluyen métodos físicos o químicos y sistemas biológicos. Con cualquiera de ellos, se desea obtener una eficiencia de transformación alta y estable. También se debe considerar que el sistema de transformación sea económico, reproducible, que genere múltiples eventos de transformación, y simplicidad técnica, por ejemplo, que no requiera el uso de protoplastos. Patrones simples de integración y un bajo número de copias del gen introducido, son factores importantes para minimizar la probabilidad de alteración génica no deseada en los sitios de inserción o el silenciamiento transgénico asociado a múltiples copias. Los sistemas más populares para la transformación de algas no biológicos son: la biobalística, la electroporación y la transformación mediada por partículas de vidrio o de carburo de silicio; y biológicos: transformación mediada por *Agrobacterium*, conjugación y transformación de protoplastos (Qin et al. 2012), (Ortiz-Matamoros, 2018 #40).

Biobalística

Micro proyectiles de tungsteno u oro cubiertos con ADN se "disparan" a las células de microalgas con un sistema de liberación de partículas que acelera los micro proyectiles con una ráfaga de gas presurizado. Las partículas portadoras de ADN penetran en el citoplasma, los orgánulos como cloroplastos y mitocondrias y el núcleo, introduciendo, así, el transgén al ADN contenido en los orgánulos

de la célula blanco. Una de las ventajas de este sistema es que atraviesa la pared celular y en principio, se pueden transformar microalgas recalcitrantes. Alguna de sus desventajas de este sistema son el alto costo y, que comparado con la transformación mediada por *A. tumefaciens*, puede ser menos eficiente. El bombardeo de partículas se ha utilizado con éxito para transformar una variedad de especies de microalgas, con y sin paredes celulares (Rathod et al. 2017).

Electroporación

La electroporación consiste en provocar un aumento significativo de la conductividad eléctrica y afectar la permeabilidad de la membrana plasmática celular mediante un campo eléctrico aplicado externamente. Este método es útil para transformar protoplastos y células con paredes delgadas y se emplea exitosamente para transformar *Cyanidioschyzon merolae*, *D. salina*, *Chlorella vulgaris* y *C. reinhardtii* (Rathod et al. 2017).

Transformación mediada por partículas inertes

Un método económico y menos complejo para transformar microalgas se basa en el uso de perlas de vidrio inertes. Involucra la agitación de una preparación homogénea de las células en presencia de las partículas inertes, el ADN y polietilenglicol. También se emplean “bigotes” de carburo de silicio. Estas partículas funcionan, aunque con baja eficiencia, para transformar algas con pared celular gruesa. Se ha empleado para transformar los dinoflagelados *Amphidinium* sp. y *Symbiodinium microadriaticum* (Te et al. 1998).

La transconjugación se ha empleado para la transferencia de ADN entre cianobacterias y una bacteria, generalmente *E. coli*, por vía directa de célula a célula (Tolonen et al. 2006). La transformación de protoplastos y polietilenglicol es una alternativa cuando hay dificultades para que el ADN penetre la pared celular. Sin embargo, la generación de protoplastos no es un procedimiento sencillo, ya que se requiere del establecimiento de las condiciones de las enzimas que degradan la pared celular para generarlos. Con este método se obtuvo la transformación estable del cocolitóforo *Pleurochrysis carterae* (Endo et al. 2016).

Transformación mediada por Agrobacterium

Agrobacterium es una bacteria patógena de plantas que se encuentra en el suelo y tiene la capacidad única de transferir parte de su propio ADN a las células vegetales. En la naturaleza, la transferencia del ADN bacteriano provoca una rápida división de las células vegetales y el desarrollo de un tumor vegetal. La transformación mediada por *Agrobacterium* se emplea ampliamente para la transformación genética de las plantas (Gelvin 2003). La selección de la cepa de *Agrobacterium* y el uso de D-glucosa y de la acetosiringona (compuesto fenólico atrayente de *Agrobacterium* que las plantas heridas liberan), mejoran la eficiencia de transformación de *Dunaliella* (Srinivasan and Gothandam 2016)). Diferentes tipos de algas se han transformado utilizando *Agrobacterium* (Rathod et al. 2017; Sproles et al. 2021).

Transformación de protoplastos

Los protoplastos se han utilizado ampliamente como una herramienta biotecnológica de transformación. Los protoplastos son células vivas que carecen de pared celular, básicamente homogéneas y totipotenciales. Su aislamiento, transformación y regeneración han sido de particular interés para el estudio de las algas rojas marinas *Porphyra* y *Gracilaria*, ya que constituyen una fuente importante de alimentación (nori) y para la obtención de productos biotecnológicos, en países como Japón. Se han reportado diferentes protocolos para la obtención de protoplastos en microalgas rojas en los que se considera el tipo de enzima para degradar la pared celular, pH, tiempo, azúcares para el equilibrio osmótico y la integridad de los protoplastos (Reddy et al. 2010).

Ingeniería genética del cloroplasto

La ingeniería genética del cloroplasto es una tecnología emergente que se puede utilizar para producir proteínas recombinantes a escala industrial o con fines medicinales y otras nuevas aplicaciones para mejorar las cepas de algas silvestres.

La ingeniería de plastomas (genoma del cloroplasto) es una herramienta versátil y útil para la expresión transgénica (Siddiqui et al. 2020). Los beneficios de la transformación

del plastoma comparada con la transformación nuclear, incluyen un mayor nivel de expresión transgénica, integración a través de recombinación homóloga, contención del transgén, carencia de silenciamiento de genes y defectos de posición. Expresar genes exógenos en el cloroplasto permite su localización específica en el genoma del cloroplasto por recombinación homóloga, comparando con la transformación nuclear en la que los eventos de integración al genoma son aleatorios. Estas características impactan en una mayor acumulación de las proteínas transgénicas cuando se expresan en cloroplastos que cuando se encuentra en el ADN nuclear. El mejor rendimiento de acumulación de proteínas exógenas cuyo transgén se integra en el genoma nuclear es de alrededor del 0.2% de la proteína soluble total (TSP) en comparación con casi el 10% de TSP obtenido en plástidos (Manuell et al. 2007). Para la transformación del plastoma también son importantes los sistemas de selección, promotores eficientes y las regiones reguladoras 5' y 3' no traducidas flanqueando al gen de interés (Yarra 2020). Los cloroplastos pueden transformarse con múltiples genes en un solo evento, debido a la disponibilidad de múltiples sitios de inserción, así como a la capacidad de procesar policistrones, permitiendo que todo un casete de genes se regule por un solo promotor (Rymarquis et al. 2006; Larrea-Alvarez and Purton 2020).

El uso de marcadores metabólicos para la selección en la transformación del cloroplasto basados en enzimas metabólicas se considera más amigable con el medio ambiente que los antibióticos y los herbicidas tradicionalmente usados en la transformación nuclear. Algunos ejemplos de estos marcadores incluyen a la mutante de *Chlamydomonas* de la acetilornitina aminotransferasa (síntesis de Arg, ARG9), auxotrófica para este aminoácido (Remacle et al. 2009). Recientemente, se propuso al gen bacteriano de la fosfito oxidoreductasa (*ptxD*), que se expresa abundantemente en el cloroplasto, pero contiene un codón Trp-Opl que le impide expresarse fuera del cloroplasto y por lo tanto la expresión del gen de selección está contenida en este orgánulo. Este vector se ha usado con éxito para producir en algas una vacuna contra un virus que afectan peces de granja (Changko et al. 2020). En el capítulo

“El potencial del genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii* para la producción de proteínas recombinantes” de este número especial de la Revista BioTecnología, se describen varios ejemplos de transformación mediante ingeniería genética del cloroplasto.

Edición del genoma de las microalgas con nucleasas programables

Los sistemas de nucleasas programables (NP) para la edición del ADN, se basan en la inducción de una ruptura de la doble cadena en un sitio específicamente diseñado en el genoma, seguido de la reparación de ésta. Estos sistemas están dirigidos a escindir una secuencia genómica elegida, lo cual es una gran ventaja cuando se requieren eliminar secciones precisas en los genomas o bien integrar en regiones específicas de algún cromosoma información genética, además de ser un tipo de edición indispensable para trabajos de ingeniería metabólica y biología sintética.

Las principales NP incluyen a las nucleasas “proteína de dedo de zinc”, las meganucleasas (del inglés ZFN y MN, respectivamente), la NP del tipo activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés), y el sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR-Cas). El evento de escisión inducido por las NP provoca procesos de reparación celular que a su vez median la modificación eficiente del ADN blanco.

El sistema ZFN es una endonucleasa artificial que consiste en una proteína de dedo de zinc (ZFP) fusionada al dominio de escisión de la enzima de restricción *FokI* (Urnov et al. 2010). Las meganucleasas son endonucleasas naturales que se pueden modificar para reconocer sitios específicos de entre 12 y 30 nucleótidos en el ADN blanco y se ha analizado su efectividad en la edición del genoma de diatomeas (Huang and Daboussi 2017).

Uno de los sistemas más populares empleados para la edición mediante NP es el del tipo activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés). Este sistema está constituido por enzimas de restricción diseñadas específicamente para cortar secuencias de ADN. Se construyen fusionando un dominio de unión al ADN efector una región activadora de la

transcripción TAL (del inglés: transcription activator-like), con un dominio de escisión del ADN. Los efectores de tipo activador de la transcripción (TALE) se pueden diseñar para unirse a prácticamente cualquier secuencia deseada del ADN, editando en ubicaciones específicas y se han reportado algunos ejemplos de su uso en algas (Razzaq et al. 2019).

Otro de los sistemas NP con gran popularidad actualmente es el sistema CRISPR-Cas. Biológicamente hablando, es un sistema inmunológico procarionte que confiere resistencia contra elementos genéticos extraños, como regiones de plásmidos y fagos; en los procariontes evolucionó para proporcionar una forma de inmunidad adquirida. CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas, por sus siglas en inglés) es una familia de secuencias de ADN que se encuentran en los genomas de bacterias y arqueas. Estas secuencias se derivan de fragmentos de ADN de bacteriófagos que previamente habían infectado al procarionte. Se utilizan para detectar y destruir el ADN de bacteriófagos similares durante infecciones posteriores. Cas9 (o "proteína 9 asociada a CRISPR") es una enzima que utiliza secuencias CRISPR como guía para reconocer y escindir cadenas específicas de ADN que son complementarias a la secuencia CRISPR. Las enzimas Cas9 junto con las secuencias CRISPR forman la base de una tecnología conocida como CRISPR-Cas9 que se puede utilizar para editar genes dentro de organismos, incluidas las algas (Razzaq et al. 2019).

En el 2013, Sisova et al., demostraron la utilidad del sistema ZFN para editar los genes del canal de protones de apertura por luz de rodopsina (COP3 y COP4) de *C. reinhardtii* (Sizova et al. 2013). Más adelante, se demostró que mediante las NP MN y TALEN la edición del gen de la uridil difosfato (UDP)-glucosa pirofosforilasa mejoró la acumulación de lípidos en la diatomea *Phaeodactylum tricorutum* (Daboussi et al. 2014). También, en *P. tricorutum* se exploró la edición del gen de la uridina monofosfato sintasa (UMP) con TALEN, para su uso como marcador de

selección, pero la eficiencia para la obtención de mutantes nulas se consideró baja, de alrededor del 16% (Serif et al. 2018).

El sistema mas exitoso para la edición de genes en microalgas es CRISPER/Cas9, sobre todo en *C. reinhardtii*. Sin embargo, se han enfrentado varios retos, principalmente evitar el efecto citotóxico de la expresión constitutiva de Cas9. Con tal fin, se implementaron métodos que incluyen su expresión transitoria y el uso de homólogos como Cpf1 (CRISPER/Cpf1) (Ferenczi et al. 2017). La eficiencia de transformación obtenida por varios grupos empleando diferentes estrategias para evitar la toxicidad de Cas9 va de 3 a 30% dependiendo de la estrategia empleada (Razzaq et al. 2019).

La adaptabilidad del sistema CRISPER se ha demostrado en *P. tricorutum*. Optimizando el uso de codones de Cas9 de *Staphylococcus pyogenes* al de *P. tricorutum*, se logró la disrupción del gen de la proteína cloroplástica SRP54 (CpSRP54), con una eficiencia de transformación del 30% y sin una aparente toxicidad por la expresión de Cas9 para esta diatomea (Nymark et al. 2016). Otro ejemplo exitoso del uso de CRISPER/Cas es la disrupción del gen de la ureasa de *Thalassiosira pseudonana*, otra diatomea, con una eficiencia del 60% (Hopes et al. 2016). El sistema CRISPER también se ha empleado para la disrupción del gen de la nitrato reductasa de *Nannochloropsis oceanica*, una microalga marina de uso biotecnológico para la producción de lípidos, sin embargo la eficiencia reportada es de apenas el 1% (Wang et al. 2017). Interesantemente, se ha desarrollado una línea de *N. gaditana* que produce lípidos eficientemente y que expresa constitutivamente Cas9 sin intoxicarse. Además, su eficiencia de transformación es de cerca del 78% (Ajjawi et al. 2017). La diferencia en la eficiencia de la edición genética de los sistemas NP muy probablemente depende de la diversidad de este grupo de organismos, por lo tanto, se requiere de ingenio y trabajo intenso para lograr el impacto biotecnológico deseado.

Conclusiones

En poco más de una década, los avances reportados acerca de la transformación de algas son significativos y en algunos casos impactantes, no solo por investigar el comportamiento básico de estos importantes organismos, sino también por la generación de herramientas biotecnológicas específicas. Como se mencionó al inicio de esta revisión, las algas incluyen una gran diversidad de organismos, desde cianobacterias hasta algas macroscópicas, y por lo tanto no hay métodos o sistemas generales aplicables para su mejoramiento genético. Sin embargo, en estos años, se han descrito una serie de “bloques” con los que se ha logrado construir vectores con promotores regulables, métodos de selección, de transformación, la transformación de núcleo o cloroplasto y sistemas de edición del genoma muy diversos, y métodos más accesibles para estudios de genómica, transcriptómica y proteómica. Con todo el desarrollo científico y biotecnológico, seguramente en los años por venir veremos la generación de tecnología y conocimiento básico novedoso para la transformación genética de las microalgas.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México a través del proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM: IT201119.

Referencias

- Ajjawi I, Verruto J, Aqui M, Soriaga LB, Coppersmith J, Kwok K, Peach L, Orchard E, Kalb R, Xu W, Carlson TJ, Francis K, Konigsfeld K, Bartalis J, Schultz A, Lambert W, Schwartz AS, Brown R, Moellering ER (2017) Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. *Nat Biotechnol* 35 (7):647-652. doi:10.1038/nbt.3865
- Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossman AR (1996) Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mol Gen Genet* 252 (5):572-579. doi:10.1007/BF02172403
- Babaoglu M, Davey MR, Power JB (2000) Genetic engineering of grain legumes: key transformation events. *Agri Biotech Net* 2:1-12
- Barnes D, Franklin S, Schultz J, Henry R, Brown E, Coragliotti A, Mayfield SP (2005) Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. *Mol Genet Genomics* 274 (6):625-636. doi:10.1007/s00438-005-0055-y
- Barolo L, Abbriano RM, Commault AS, George J, Kahlke T, Fabris M, Padula MP, Lopez A, Ralph PJ, Pernice M (2020) Perspectives for Glyco-Engineering of Recombinant Biopharmaceuticals from Microalgae. *Cells* 9 (3). doi:10.3390/cells9030633
- Barsanti L, Gualtieri P (2014) *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Second Edition. CRS Press.
- Brown RB, Wass TJ, Thomas-Hall SR, Schenk PM (2019) Chromosome-Scale Genome Assembly of Two Australian *Nannochloropsis oceanica* Isolates Exhibiting Superior Lipid Characteristics. *Microbiol Resour Announc* 8 (48). doi:10.1128/MRA.01288-19
- Cao YQ, Li Q, Xia PF, Wei LJ, Guo N, Li JW, Wang SG (2017) AraBAD based toolkit for gene expression and metabolic robustness improvement in *Synechococcus elongatus*. *Sci Rep* 7 (1):18059. doi:10.1038/s41598-017-17035-4
- Changko S, Rajakumar PD, Young REB, Purton S (2020) The phosphite oxidoreductase gene, *ptxD* as a bio-contained chloroplast marker and crop-protection tool for algal biotechnology using *Chlamydomonas*. *Appl Microbiol Biotechnol* 104 (2):675-686. doi:10.1007/s00253-019-10258-7
- Crozet P, Navarro FJ, Willmund F, Mehrshahi P, Bakowski K, Lauersen KJ, Perez-Perez ME, Auroy P, Gorchs Rovira A, Sauret-Gueto S, Niemeyer J, Spaniol B, Theis J, Trosch R, Westrich LD, Vavitsas K, Baier T, Hubner W, de Carpentier F, Cassarini M, Danon A, Henri J, Marchand CH, de Mia M,

- Sarkissian K, Baulcombe DC, Peltier G, Crespo JL, Kruse O, Jensen PE, Schroda M, Smith AG, Lemaire SD (2018) Birth of a photosynthetic chassis: a MoClo toolkit enabling synthetic biology in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synth Biol* 7 (9):2074-2086. doi:10.1021/acssynbio.8b00251
- Cui Y, Qu L, Zhao J, Qin S (2016) Transient expression of the enhanced green fluorescence protein (egfp) gene in *Tetraselmis subcordiformis* (Chlorodendrales, Chlorophyta) with three exogenous promoters. *Phycologia* 55 (5):564-567. doi:10.2216/15-136.1
- Daboussi F, Leduc S, Marechal A, Dubois G, Guyot V, Perez-Michaut C, Amato A, Falciatore A, Juillerat A, Beurdeley M, Voytas DF, Cavarec L, Duchateau P (2014) Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nat Commun* 5:3831. doi:10.1038/ncomms4831
- Endo H, Yoshida M, Uji T, Saga N, Inoue K, Nagasawa H (2016) Stable nuclear transformation system for the coccolithophorid alga *Pleurochrysis carterae*. *Sci Rep* 6:22252. doi:10.1038/srep22252
- Ferenczi A, Pyott DE, Xipnitou A, Molnar A (2017) Efficient targeted DNA editing and replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cpf1 ribonucleoproteins and single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (51):13567-13572. doi:10.1073/pnas.1710597114
- Gelvin SB (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67 (1):16-37, table of contents. doi:10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003
- Hirata R, Jeong WJ, Saga N, Mikami K (2011) Heterologous activation of the *Porphyra tenera* HSP70 promoter in Bangiophycean algal cells. *Bioeng Bugs* 2 (5):271-274. doi:10.4161/bbug.2.5.16938
- Hopes A, Nekrasov V, Kamoun S, Mock T (2016) Editing of the urease gene by CRISPR-Cas in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Methods* 12:49. doi:10.1186/s13007-016-0148-0
- Huang W, Daboussi F (2017) Genetic and metabolic engineering in diatoms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372 (1728). doi:10.1098/rstb.2016.0411
- Kelly CL, Taylor GM, Hitchcock A, Torres-Mendez A, Heap JT (2018) A rhamnase-Inducible system for precise and temporal control of gene expression in cyanobacteria. *ACS Synth Biol* 7 (4):1056-1066. doi:10.1021/acssynbio.7b00435
- Kilian O, Benemann CS, Niyogi KK, Vick B (2011) High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (52):21265-21269. doi:10.1073/pnas.1105861108
- Larrea-Alvarez M, Purton S (2020) Multigenic engineering of the chloroplast genome in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbiology (Reading)* 166 (6):510-515. doi:10.1099/mic.0.000910
- Li J, Lu Y, Xue L, Xie H (2010) A structurally novel salt-regulated promoter of duplicated carbonic anhydrase gene 1 from *Dunaliella salina*. *Mol Biol Rep* 37 (2):1143-1154. doi:10.1007/s11033-009-9901-z
- Manuell AL, Beligni MV, Elder JH, Siefker DT, Tran M, Weber A, McDonald TL, Mayfield SP (2007) Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas chloroplast*. *Plant Biotechnol J* 5 (3):402-412. doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00249.x
- Markley AL, Begemann MB, Clarke RE, Gordon GC, Pflieger BF (2015) Synthetic biology toolbox for controlling gene expression in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *ACS Synth Biol* 4 (5):595-603. doi:10.1021/sb500260k
- Miyagawa-Yamaguchi A, Okami T, Kira N, Yamaguchi H, Onhishi K, Adaci M (2011) Stable nuclear transformation of the diatom *Chaetoceros* sp. *Phycological Research* 59 (2):113-119. doi:https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2011.00607.x

- Muñoz CF, Sturme MHJ, D'Adamo S, Weusthuis RA, Wijffels RH (2019) Stable transformation of the green algae *Acutodesmus obliquus* and *Neochloris oleoabundans* based on *E. coli* conjugation. *Algal Research* 39
- Muñoz CF, Weusthuis RA, D'Adamo S, Wijffels RH (2019) Effect of single and combined expression of lysophosphatidic acid acyltransferase, glycerol-3-phosphate acyltransferase, and diacylglycerol acyltransferase on lipid accumulation and composition in *Neochloris oleoabundans*. *Front Plant Sci* 10:1573. doi:10.3389/fpls.2019.01573
- Norzagaray-Valenzuela CD, German-Baez LJ, Valdez-Flores MA, Hernandez-Verdugo S, Shelton LM, Valdez-Ortiz A (2018) Establishment of an efficient genetic transformation method in *Dunaliella tertiolecta* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Microbiol Methods* 150:9-17. doi:10.1016/j.mimet.2018.05.010
- Nozzi NE, Case AE, Carroll AL, Atsumi S (2017) Systematic approaches to efficiently produce 2,3-butanediol in a marine cyanobacterium. *ACS Synth Biol* 6 (11):2136-2144. doi:10.1021/acssynbio.7b00157
- Nymark M, Sharma AK, Sparstad T, Bones AM, Winge P (2016) A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Sci Rep* 6:24951. doi:10.1038/srep24951
- Ortiz-Matamoros MF, Villanueva MA, Islas-Flores T (2018) Genetic transformation of cell-walled plant and algae cells: delivering DNA through the cell wall. *Brief Funct Genomics* 17 (1):26-33. doi:10.1093/bfpg/elx014
- Qin S, Lin H, Jiang P (2012) Advances in genetic engineering of marine algae. *Biotechnol Adv* 30 (6):1602-1613. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.05.004
- Ramarajan M. FM, Abbriano R., Pernice M., P.J. R (2019) Novel endogenous promoters for genetic engineering of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana* CCMP526. *Algal Research* 44:101708
- Rathod JP, Gade MR, Rathod DR, Dudhare M (2017) A review on molecular tools of microalgal genetic transformation and their application for overexpression of different genes. *Int J of Curr Microbiol and Appl Sci* 6 (12):3191-3207. doi:https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.6.12.373
- Razzaq A, Saleem F, Kanwal M, Mustafa G, Yousaf S, Imran Arshad HM, Hameed MK, Khan MS, Joyia FA (2019) Modern trends in plant genome editing: An inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox. *Int J Mol Sci* 20 (16). doi:10.3390/ijms20164045
- Reddy CRK, Gupta V, Jha B (2010) Developments in biotechnology of red algae. In: Seckbach J, Chapman DJ (eds) *Red algae in the genomic age*. Springer, London, New York, pp 309-342
- Remacle C, Cline S, Boutaffala L, Gabilly S, Larosa V, Barbieri MR, Coosemans N, Hamel PP (2009) The ARG9 gene encodes the plastid-resident N-acetyl ornithine aminotransferase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 8 (9):1460-1463. doi:10.1128/EC.00108-09
- Rymarquis LA, Higgs DC, Stern DB (2006) Nuclear suppressors define three factors that participate in both 5' and 3' end processing of mRNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant J* 46 (3):448-461. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02711.x
- Santos-Merino M, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F (2018) Engineering the fatty acid synthesis pathway in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 improves omega-3 fatty acid production. *Biotechnol Biofuels* 11:239. doi:10.1186/s13068-018-1243-4
- Schroda M, Blocker D, Beck CF (2000) The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J* 21 (2):121-131. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00652.x
- Serif M, Dubois G, Finoux AL, Teste MA, Jallet D, Daboussi F (2018) One-step generation of multiple gene knock-outs in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* by DNA-free genome editing. *Nat Commun* 9 (1):3924. doi:10.1038/s41467-018-06378-9

- Shono C, Ariyanti D, Abe K, Sakai Y, Sakamoto I, Tsukakoshi K, Sode K, Ikebukuro K (2021) A green light-regulated T7 RNA polymerase gene expression system for Cyanobacteria. *Mar Biotechnol (NY)* 23 (1):31-38. doi:10.1007/s10126-020-09997-w
- Sizova I, Greiner A, Awasthi M, Kateriya S, Hegemann P (2013) Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *Plant J* 73 (5):873-882. doi:10.1111/tpj.12066
- Sproles AE, Fields FJ, Smalley TN, Le CH, Badary A, Mayfield SP (2021) Recent advancements in the genetic engineering of microalgae. *Algal Research* 53:102158
- Srinivasan R, Gothandam KM (2016) Synergistic action of D-glucose and acetosyringone on *Agrobacterium* strains for efficient *Dunaliella* transformation. *PLoS One* 11 (6):e0158322. doi:10.1371/journal.pone.0158322
- Stevens DR, Rochaix JD, Purton S (1996) The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet* 251 (1):23-30. doi:10.1007/BF02174340
- Te MR, Lohuis, Miller DJ (1998) Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs. *The Plant Journal* 13:427-435
- Teng C, Quin S, Liu J, Yu D, Liang C, Tseng C (2002) Transient expression of *lacZ* in bombarded unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J of Appl Phycol* 14:495-500
- Tolonen AC, Liszt GB, Hess WR (2006) Genetic manipulation of *Prochlorococcus* strain MIT9313: green fluorescent protein expression from an RSF1010 plasmid and Tn5 transposition. *Appl Environ Microbiol* 72 (12):7607-7613. doi:10.1128/AEM.02034-06
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 11 (9):636-646. doi:10.1038/nrg2842
- Wang B, Eckert C, Maness PC, Yu J (2018) A genetic toolbox for modulating the expression of heterologous genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *ACS Synth Biol* 7 (1):276-286. doi:10.1021/acssynbio.7b00297
- Wang K, Cui Y, Wang Y, Gao Z, Liu T, Meng C, Qin S (2020) Chloroplast genetic engineering of a unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* with expression of an antimicrobial peptide. *Mar Biotechnol (NY)* 22 (4):572-580. doi:10.1007/s10126-020-09978-z
- Wang Y, Lee YY, Santaus TM, Newcomb CE, Liu J, Geddes CD, Zhang C, Hu Q, Li Y (2017) In situ enzymatic conversion of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 biomass into fatty acid methyl esters. *Bioenergy Res* 10 (2):438-448. doi:10.1007/s12155-016-9807-2
- Yarra R (2020) Plastome engineering in vegetable crop: current status and future prospects. *Mol Biol Rep* 47 (10):8061-8074. doi:10.1007/s11033-020-05770-3
- Zienkiewicz M, Krupnik T, Drozak A, Golke A, Romanowska E (2017) Chloramphenicol acetyltransferase-a new selectable marker in stable nuclear transformation of the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Protoplasma* 254 (1):587-596. doi:10.1007/s00709-015-0936-9



www.smbb.com.mx