

Capítulo 15

Producción de lípidos en microalgas

Ruth Elena Soria Guerra
Juan Marcos Castro Tapia
*Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí*

Hans Christian Correa Aguado
*Instituto Politécnico Nacional
Unidad Interdisciplinaria de Ingeniería campus Zacatecas
(UPIIZ-IPN), Departamento de Ciencias Básicas*

Resumen

Las microalgas son consideradas como una fuente ideal para la producción sostenible de compuestos fisiológicamente activos tales como lípidos, proteínas y polisacáridos. Su gran capacidad para soportar condiciones ambientales adversas y su alta eficiencia fotosintética, conducen a una elevada productividad de biomasa bajo cortos periodos de tiempo. Adicionalmente, mediante la modificación de las condiciones de cultivo o a través de la ingeniería metabólica, es posible incrementar su biomasa y los metabolitos de interés. Las proteínas y los polisacáridos de la biomasa microalgal, pueden utilizarse de forma sostenible en la industria alimentaria para satisfacer las necesidades dietéticas tanto de humanos como de animales. Asimismo, el alto contenido de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados

en algunas microalgas, se puede aprovechar en la industria nutracéutica para facilitar la prevención o el tratamiento de una enfermedad y, en la industria de los biocombustibles, para la elaboración de biodiésel. En este capítulo, se presenta una visión general del efecto producido en las microalgas, por la modificación de las condiciones de cultivo tales como temperatura, pH, intensidad de luz, nutrientes, y uso de reguladores de crecimiento. Además, se describen algunas aplicaciones comerciales de los lípidos producidos por las microalgas.

Introducción

Hoy en día el 80% de la energía primaria proviene del petróleo, carbón y gas natural dejando en menor proporción a las energías renovables; definidas como fuentes prácticamente inagotables con respecto al tiempo de vida de un ser humano y cuyo aprovechamiento es técnicamente viable. Dentro de estos tipos de energías se encuentran: la solar, eólica, hidráulica, geotérmica y la biomasa; esta última se refiere al conjunto de productos energéticos y materias primas originadas a partir de la materia orgánica renovable que puede ser procesada para proveer formas bioenergéticas más elaboradas y adecuadas para el consumo final, de la que se pueden obtener biocombustibles líquidos como el biodiésel y bioetanol.

Existen 3 generaciones de biocombustibles que se pueden obtener a partir de lípidos provenientes de diferentes materias primas. En la primera generación los lípidos son producidos principalmente por cultivos alimenticios y semillas oleaginosas, por ejemplo, palma, colza, soya, girasol, coco, cacahuete, entre otros. El uso de aceites vegetales comestibles requiere del uso de enormes extensiones de tierra fértil y esto conlleva a la falta de alimentos para la población, la deforestación y la escasez de agua. En la segunda generación de biocombustibles, los lípidos se obtienen de plantas lignocelulósicas y desperdicios de cultivos, también con inconvenientes tales como los largos períodos de producción, el rendimiento lipídico restringido (menor al 5% del peso seco total) y la dependencia por las condiciones climáticas.

La sustentabilidad de la industria del biodiésel requiere de materias primas alternas que permitan operar continuamente y superar las limitaciones señaladas, apareciendo en respuesta a esta necesidad la tercera generación de biocombustibles. La tercera generación esta conformados por microorganismos

mos oleaginosos entre las que se encuentran las microalgas, las cuales son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes y eucariontes que se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (Fig. 15.1).

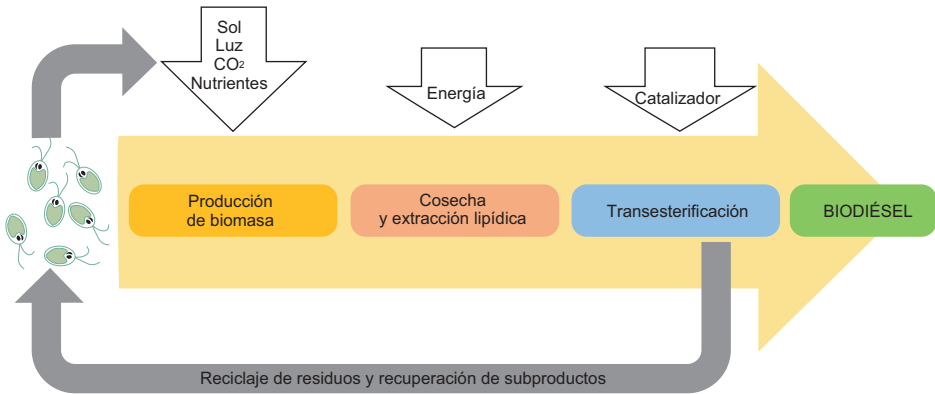


Figura 15.1. Esquema del proceso de producción de biodiésel a partir de microalgas.

Desafortunadamente se ha visto que es poco factible la producción de biodiésel a partir de microalgas, en base a los rendimientos actuales y a modelos económicos de las instalaciones de producción. Además, no todos los lípidos microalgales son satisfactorios para la producción de biodiésel, los apropiados son aquellos ácidos grasos (cadena larga saturados o monoinsaturados) libres y unidos covalentemente a un glicerol, llamados triacilglicéridos (TAGs).

Debido a lo anterior se han buscado estrategias que aumenten el porcentaje de lípidos de reserva. Algunas de estas estrategias consisten en exponer al organismo a diferentes condiciones de estrés fisiológico o químico como pueden ser: Limitación de nutrientes, cambios de pH, modificación en la longitud de onda irradiante, aumento o disminución de temperatura, uso de reguladores de crecimiento, etc. Otras estrategias están basadas en la ingeniería genética; produciendo cepas transgénicas que sobreexpresan enzimas clave en la biosíntesis de lípidos. En este capítulo se describe la biosíntesis de lípidos en microalgas y el fundamento de algunas estrategias utilizadas para incrementar la cantidad de lípidos.

Biosíntesis de lípidos en microalgas

Los lípidos en las microalgas están compuestos de lípidos polares y lípidos neutros. Los lípidos neutros se componen de TAGs formados por tres moléculas de ácidos grasos acopladas a una molécula de glicerol. La producción y acumulación de lípidos en las microalgas depende principalmente de la especie y de su constitución genética, pero también es afectada por diversas condiciones físicas y químicas del cultivo, como lo son la disponibilidad de nutrientes, salinidad, períodos e intensidad de luz, temperatura, pH, entre otros.

Se ha reportado que la composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas, donde la posición y el número de enlaces dobles (1 a 6) es variable, siendo por lo general *cis* la configuración de éstos. Los ácidos grasos de 16C (carbonos) a 18C son los más frecuentes, no obstante, moléculas de cadena media (10C, 12C, 14C) o demasiado larga (> 20C) predominan en algunas especies. Por lo general, en las microalgas dulceacuícolas prevalecen los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, observándose en menor proporción compuestos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés Polyunsaturated Fatty Acids). Estos últimos, ocasionalmente constituyen la mayor fracción de ácidos grasos en especies marinas. La variación del perfil de ácidos grasos entre los diversos grupos algales es considerable, variabilidad que igualmente se exhibe bajo distintas condiciones de cultivo.

El metabolismo lipídico de las algas es similar al de plantas superiores, particularmente en la biosíntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos, como consecuencia de la homología entre secuencias y la similitud de características bioquímicas observadas entre ciertos genes y enzimas de origen vegetal y algal involucrados en la producción de lípidos. En el cloroplasto ocurre la síntesis *de novo* de ácidos grasos, cuyo paso inicial consiste en la carboxilación de acetil-CoA dependiente de ATP para su conversión en malonil-CoA. Esta reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa y es considerada el paso limitante del proceso, ya que compromete el flujo de acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos, donde las unidades de acetil-CoA probablemente derivan del piruvato proveniente de la glucólisis. La reacción anterior es seguida por ciclos de adición descarboxilativa de malonil-CoA a unidades acilo y β -reducción, catalizados por el sistema ácido graso sintetasa, hasta producir moléculas de 16C y 18C saturadas (Fig. 15. 2).

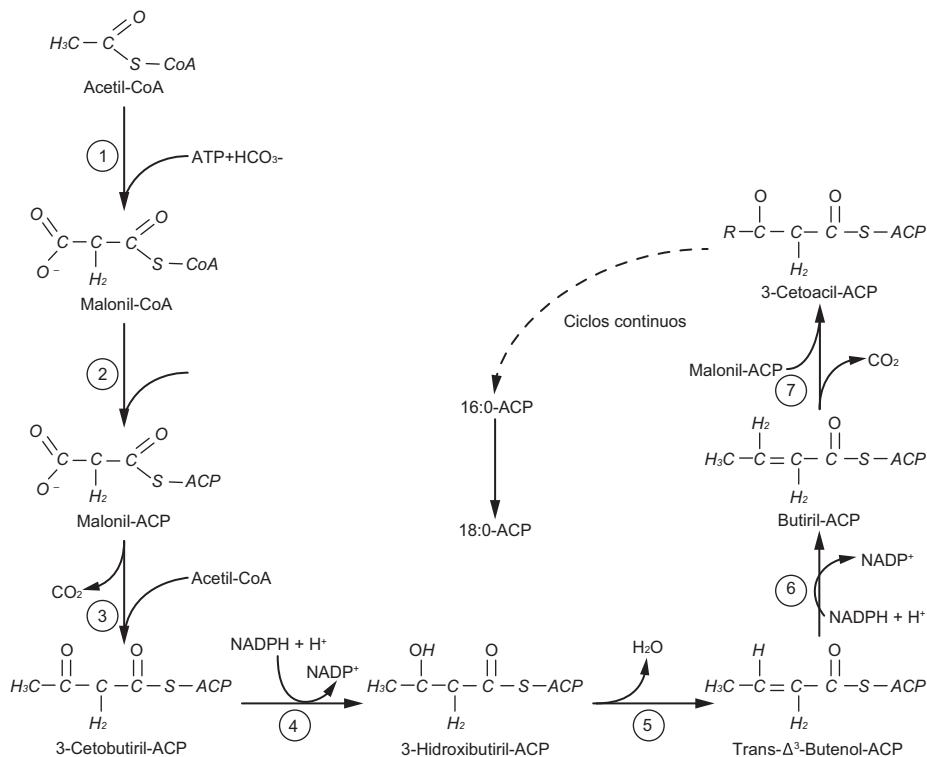


Figura 15. 2. Síntesis de lípidos por microalgas (Adaptado de (Garibay Hernández *et al.*, 2009). *Reacción 1: El Acetil-CoA entra al ciclo como sustrato para la enzima ACCasa y se obtiene el Malonil-CoA. Reacción 2: es catalizada la conversión de Malonil-CoA a Malonil-ACP por la Malonil-CoA: ACP transferasa (el Malonil-CoA es la molécula donadora de carbón en las siguientes reacciones de elongación). Reacción 3: descarboxilación del Malonil-CoA y la condensación con el Acetil-CoA. Reacción 4: reducción del 3-Cetobutiril-ACP por la 3-cetoacil-ACP reductasa. Reacción 5: deshidratación para la obtención de una insaturación en el carbono α por la enzima 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa. Reacción 6: reducción de la doble ligadura por la enoil-ACP reductasa. Reacción 7: ciclo de elongación (repetición del paso 3 al 6) hasta la obtención de ácidos grasos saturados de 16C o 18C o ambos.

El ácido palmítico (C16:0) y el ácido oleico (C18:1 ω 9) son los precursores de los ácidos grasos poliinsaturados, a su vez producidas mediante mecanismos de desaturación aerobia y elongación (Fig. 15. 3). Por su parte, se sugiere que la biosíntesis de triacilglicéridos en microalgas ocurre en el citosol y en el

retículo endoplásmico, esencialmente a través de la catálisis por acil-transferasas que realizan el traslado secuencial de ácidos grasos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde antes de la última transferencia, se requiere de la desfosforilación del ácido fosfatídico previamente formado, lo cual se ve representado en la Figura 15.4.

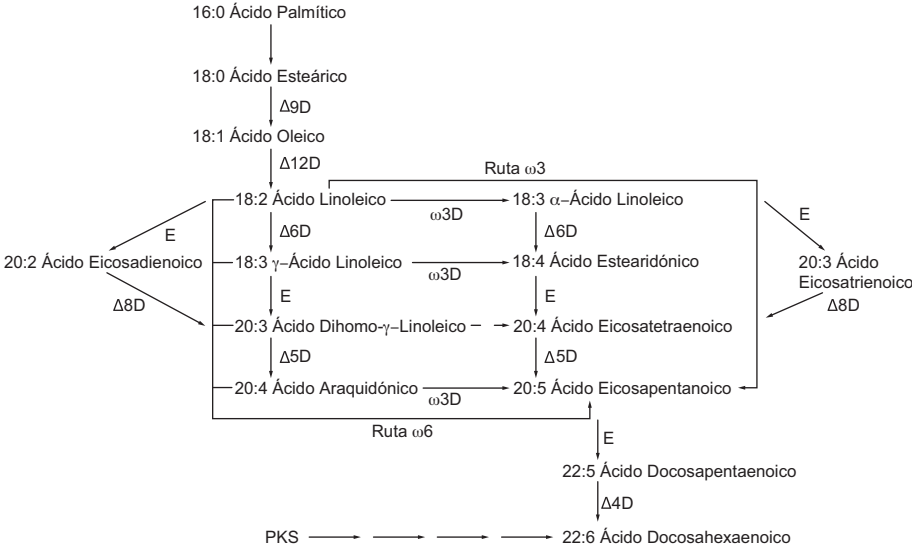


Figura 15.3. Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados en algas eucariotas (Adaptado de Harwood y Guschina, 2009).

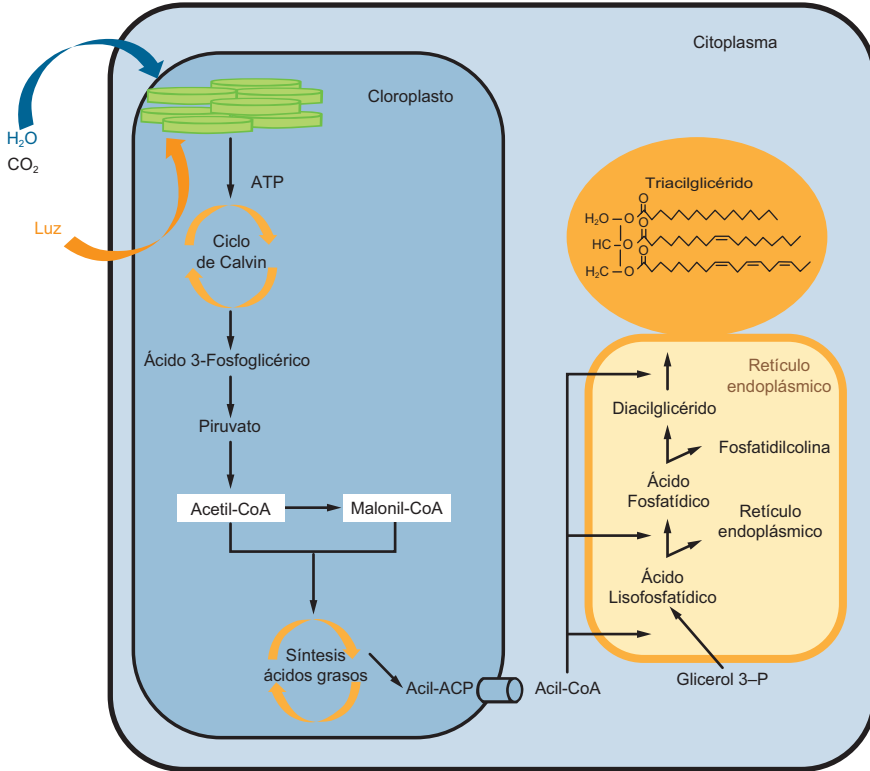


Figura 15.4. Biosíntesis de lípidos. En términos generales, en el sistema fotosintético a partir de la energía proporcionada por los fotones presentes en el flujo luminoso, se lleva a cabo la oxidación catalítica del agua con la consecuente formación de protones, electrones y O_2 , los cuales a su vez posibilitan la obtención de los productos fotosintéticos: ATP y NADPH. Estos productos fotosintéticos son el sustrato del Ciclo de Calvin en el cual el CO_2 es fijado en moléculas de 3 átomos de Carbono (3C), las cuales a su vez son asimiladas como carbohidratos, lípidos y proteínas. En el caso particular de los lípidos de microalgas, las moléculas de 3C son transformadas a piruvato y acetil-CoA en el cloroplasto, donde las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas y sometidas a numerosos ciclos de adición descarboxilativa y β -reducción para la síntesis de *novo* de ácidos grasos (grupos acilo: Acil-ACP). El mecanismo de transporte de ácidos grasos al exterior del citoplasma se desconoce. Posteriormente, los ácidos grasos son secuencialmente transferidos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde algunos intermediarios son desviados hacia la síntesis de lípidos de membrana (Tomado de Garibay Hernández *et al.*, 2009).

Condiciones para estimular la producción de lípidos

Se han llevado a cabo distintas estrategias para que las microalgas produzcan una mayor cantidad de lípidos, de las cuales la limitación de nitrógeno es considerada como la más eficiente para incrementar el contenido de lípidos neutros en las microalgas, en particular la de TAGs conformados por ácidos grasos con un elevado grado de saturación.

La adaptación de las microalgas a la limitación de nutrientes se caracteriza por la manifestación de respuestas específicas para el elemento limitado (inducción de sistemas de transporte de alta afinidad y de la síntesis de enzimas hidrolíticas para la liberación intra- o extracelular del nutriente), además de respuestas generales tales como cambios morfológicos, cese de la división celular, alteraciones en la permeabilidad de las membranas, acumulación de lípidos y/o polisacáridos, reducción de la actividad fotosintética y modificación de procesos metabólicos. Respuestas similares son inducidas por la deficiencia de fósforo, azufre y silicio, siendo el efecto de este último específico para las diatomeas. Asimismo, la disponibilidad de hierro influye en el contenido oleaginoso, aunque el mecanismo aún se desconoce. Sin embargo, el comportamiento de las microalgas ante la limitación de nutrientes es considerablemente variable y, por tanto, no es posible establecer una tendencia generalizada entre las especies de microalgas.

La acumulación de lípidos en especies oleaginosas, a pesar de la atenuación de la división celular, es consecuencia de la asimilación continua de carbono y su reorientación metabólica hacia la síntesis activa de ácidos grasos. Los lípidos bajo tales circunstancias funcionan como una reserva de carbono y energía, además de proteger al organismo contra el estrés fotooxidativo.

El pH y la salinidad son otros factores que modifican la síntesis de lípidos de diversas microalgas. Sin embargo, el tipo y cantidad de lípidos producidos también dependen de la especie y de la magnitud del cambio de estas variables. La intensidad luminosa es otra condición que modifica sustancialmente la acumulación de TAGs en las microalgas. Altas intensidades, inducen la producción de ácidos grasos con un elevado perfil de saturación, mientras que intensidades bajas, promueven la síntesis de lípidos polares altamente insaturados. A continuación, se detallan las estrategias mencionadas.

Limitación de nutrientes

Las microalgas son capaces de subsistir en condiciones ambientales extremas ya que son capaces de alterar su patrón metabólico para adaptarse a diversos entornos. Macronutrientes como nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S) son componentes esenciales para un correcto funcionamiento del mecanismo celular. Por ejemplo, el nitrógeno (N) es esencial en la producción de lípidos y forma parte de catalizadores e intermediarios del metabolismo primario de las microalgas; se encuentra en aminoácidos, en nucleótidos (incluyendo ADP/ATP y NADP⁺/NADPH), en vitaminas, clorofilas y ficobilinas cromóforas, así como en compuestos involucrados en la remoción de especies oxígeno-reactivas como el glutatión. El fósforo (P) desempeña un papel determinante en el crecimiento y eco-fisiología de las microalgas, es el suministro de energía en reacciones de señalización y es un elemento base para la construcción de ácidos nucleicos y de membranas lipídicas. La presencia de azufre (S) en microalgas es fundamental en compuestos estructurales (cisteína, metionina y sulfolípidos) y funcionales (glutatión, vitaminas y cofactores). Micronutrientes como hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), níquel (Ni), magnesio (Mg), calcio (Ca) y potasio (K) son importantes en reacciones redox, ácido-base y en la transmisión y almacenamiento de información y energía dentro de la célula.

La producción de lípidos en microalgas es afectada significativamente por la disponibilidad de nutrientes, cuando se someten a condiciones limitadas de éstos, la división celular decrece, pero la actividad biosintética de lípidos se mantiene e inclusive aumenta en algunas especies. Conforme el crecimiento celular de las microalgas disminuye, la síntesis de compuestos de membrana ya no es requerida y se promueve la conversión de ácidos grasos a TAGs como productos de almacenamiento de carbono y energía, en respuesta a las condiciones de estrés.

Déficit de nitrógeno

La limitación de N conduce a una acumulación de lípidos en diferentes especies de microalgas (Tabla 15.1). Al disminuir la proporción celular, en la membrana del tilacoide, se activa la acil hidrolasa y se estimula la hidrólisis de fosfolípidos; lo cual, en conjunto, aumenta la fracción intracelular de áci-

dos grasos de acil-CoA. Esta deficiencia de N también activa la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), que cataliza la conversión de la acil-CoA a TAG como mecanismo de defensa a las condiciones de estrés.

Diversos estudios han evaluado el efecto de diferentes condiciones de cultivo en microalgas con el propósito de inducir mayores productividades lipídicas. Se ha reportado que la temperatura (variando entre 20 y 30° C) y la concentración de N (entre 7 y 70 mg L⁻¹) afectan la productividad de lípidos y la composición de ácidos grasos en tres cepas de *Chlorella*. En general, se reporta la mayor productividad en cultivos con 3% de N y con temperaturas elevadas.

Tabla 15.1. Producción de lípidos en microalgas por estrés bajo deficiencia de N (N-).

Microalga Cepa/especie	Lípidos obtenidos *N+	Lípidos obtenidos **N-	Referencia
<i>S. rotundus</i>	29.2 ± 1.65 %	41.46 ± 1.94 %	(Dixit <i>et al.</i> , 2020)
<i>S. abundans</i>	31.4 %	48.12 %	(Rai y Gupta, 2017)
<i>N. salina</i>	33.0 %	56.1 %	(Fakhry y El Maghraby, 2015)
<i>N. oculata</i>	22-29 %	49.7 %	(Millán-Oropeza <i>et al.</i> , 2015)
<i>D. salina</i>	6-25 %	54.15 ± 2.71 %	(Gao <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. vulgaris</i>	18-20 %	53 %	(Mujtaba <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. zofingiensis</i>	27.3 %	54.5 %	(Feng <i>et al.</i> , 2011)

* N+: cultivos de microalgas sin deficiencia de N.

**N-: cultivos de microalgas con deficiencia de N

Después del hidrógeno (H), C y oxígeno (O), el N es uno de los componentes más abundantes en las células fotosintéticas. Las formas más comunes de N inorgánico utilizadas por las microalgas son nitrato (NO₃⁻), amonio (NH₄⁺) y ocasionalmente nitrito (NO₂⁻), aunque es el NO₃⁻ la forma preferida como fuente de N para la mayoría de las microalgas. Estudios en *Scenedesmus rotundus* MG910488 indican que una concentración de 3.5 mM induce el mayor porcentaje de lípidos, alcanzando hasta un 41%, mientras que la menor acumulación de lípidos (29%) se registró con la concentración de 17.6 mM de NaNO₃, mostrando que el estrés por deficiencia de N es una estrategia efectiva para aumentar la producción de lípidos en microalgas.

Déficit de fósforo

El fósforo es un nutriente crucial para todas las formas de vida, su rol principal lo encontramos en los ácidos nucleicos haciendo del fósforo esencial en la expresión y almacenamiento de la información genética. Generalmente, las concentraciones de fosfatos orgánicos en el agua exceden las de los fosfatos inorgánicos, no obstante, el dihidrógeno fosfato (H_2PO_4^-) y el hidrógeno fosfato (HPO_4^{2-}) son las formas de fósforo que las microalgas absorben más fácilmente.

La limitación de fósforo en microalgas provoca daños en el crecimiento y división celular. La ausencia de fósforo también reduce drásticamente la síntesis de fosfolípidos, lo que promueve la producción de sulfolípidos, lípidos de betaína y glucolípidos sin fósforo, además de la síntesis de TAG. Se ha reportado una acumulación mejorada de lípidos bajo limitación de fósforo en diferentes especies de microalgas (Tabla 15.2). En cultivos de *Chorella* sp. sometidos a bajas concentraciones de fósforo (32 μM), se ha observado un incremento en la productividad y el contenido de lípidos totales.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son ácidos grasos esenciales para el desarrollo de organismos marinos y muy apreciados por su efecto biológico en la salud humana, en esta categoría se encuentran los ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω 3), docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω 3) y araquidónico (AA, 20:4 ω 6) que han sido utilizados para el tratamiento de enfermedades del corazón, cáncer, artritis, degeneración muscular, etc. La limitación de fósforo es una estrategia que puede ser utilizada para producir PUFAs a escala industrial; esto se ha demostrado en el alga roja *Porphyridium purpureum*, en donde se ha reportado un aumento significativo en la producción de ácidos grasos, aminoácidos y EPA a bajas concentraciones de fósforo.

Tabla 15.2. Producción de lípidos en microalgas por estrés bajo deficiencia de P.

Microalga Cepa/especie	Ausencia/Limitación de P	Lípidos obtenidos	Referencia
<i>Monodus subterraneus</i>	Ausencia	39.3 % de TAGs	(Khozin-Goldberg y Cohen, 2006)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Ausencia	53 % de lípidos totales	(Xin <i>et al.</i> , 2010)

Si bien, la limitación de fósforo en cultivos de diversas cepas de microalgas genera una mayor acumulación de lípidos, también es cierto que en algunas otras cepas el comportamiento es opuesto, un ejemplo de lo anterior se observó en las microalgas *Nannochloris atomus* (Chlorophyceae) y *Tetraselmis* sp. (Prasinophyceae) que disminuyeron su producción de lípidos al someterse a bajas concentraciones de P.

Déficit de azufre

El azufre es uno de los elementos principales de las microalgas, frecuentemente es absorbido y asimilado como sulfato (SO_4^{2-}) que es la forma más abundante de S inorgánico en la naturaleza, aunque también puede asimilarse a partir de fuentes orgánicas en forma de sulfuro (S^{2-}). Desempeña un papel muy importante en la cadena transportadora de electrones, en la biosíntesis de proteínas y en el metabolismo de lípidos.

Se ha demostrado que la deficiencia nutritiva de S afecta el volumen y crecimiento celular en microalgas, sin embargo, la respuesta a esta condición es un aumento en la síntesis de ácidos grasos, pigmentos y carbohidratos. Estudios con cultivos de *C. vulgaris* crecida en medio con S limitado y a pH distintos (5.0-8.0) indican que las variaciones en el pH no afectan significativamente la composición de ácidos grasos, sin embargo, en la deficiencia de S a pH = 7.5, se produce una mayor acumulación de lípidos totales (53%). En cultivos de *Dunalliella salina* privados de S se reportó un incremento en la producción de β -caroteno en más del doble (de 6.7 mg L⁻¹ a 15 mg L⁻¹), comparado con los cultivos en medios suplementados con azufre.

El efecto del aumento en la síntesis de lípidos por limitación o ausencia de azufre puede explicarse, al menos en *Chlamydomonas reinhardtii* por una represión en la síntesis de proteínas y un efecto simultáneo de sobre-expresión de genes involucrados en la síntesis de lípidos y una desviación del flujo metabólico de C hacia la síntesis de TAGs.

Otros ejemplos de la deficiencia o privación de S en cultivos de microalgas con relación a la producción de lípidos se muestran en la Tabla 15.3. Se puede observar que el comportamiento en diversas cepas y especies bajo la deficiencia/ausencia de S es similar en el aspecto de que existe un aumento general en la síntesis de lípidos totales. Esta estrategia, también ha mostrado

ser eficiente, si se pretende obtener una mayor síntesis de carbohidratos importantes para la generación de bioetanol.

Tabla 15.3. Producción de lípidos en microalgas por estrés bajo deficiencia de S.

Microalga Cepa/especie	Ausencia/Limitación de P	Lípidos obtenidos	Referencia
<i>P. kessleri</i>	Ausencia	Incremento en lípidos totales	(Yamazaki <i>et al.</i> , 2018)
<i>C. vulgaris</i>	Limitación	53.43 ± 3.93 %	(Sakarika y Kornaros, 2017)
<i>C. reinhardtii</i>	Limitación	36.98 %	(Morowvat y Ghasemi, 2016)
<i>Coccomyxa sp.</i>	Limitación	13.0 %	(Ruiz-Domínguez <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> , <i>C. lobophora</i> , y <i>P. kessleri</i>	Limitación	En <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> y <i>C. lobophora</i> los lípidos aumentaron entre 1.5 a 2.4 veces su producción. En <i>P. kessleri</i> el aumento fue de 24.3 a 59.7.	(Mizuno <i>et al.</i> , 2013)

Cambio de temperatura

La temperatura es un factor de estrés que influye en la tasa de crecimiento, la productividad neta de lípidos y los perfiles de ácidos grasos (FA, por sus siglas en inglés, Fatty Acids) en una amplia gama de especies de microalgas. Se ha reportado que se han utilizado temperaturas bajas o altas para modificar el perfil lipídico dependiendo de la especie, de manera general se ha observado que los niveles de insaturación en los FA aumentan a bajas temperaturas, mientras que los FA saturados totales aumentan a altas temperaturas. El nivel de insaturación es alto a bajas temperaturas principalmente debido a la mayor concentración de oxígeno disuelto (OD), que permite que las enzimas dependientes del oxígeno, conocidas como desaturasas ω -3, funcionen apropiadamente.

Se ha reportado que un aumento en la temperatura tiene un efecto positivo en la fotosíntesis y la división celular. Esta tendencia se explica por la mejora de las actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo de Calvin. Debido al estrés térmico se pueden ver afectadas las funcionalidades de las enzimas (inactivación o desnaturalización) o modificar las proteínas que están involucradas en los procesos fotosintéticos. Las altas temperaturas pueden

causar condiciones de estrés que modifiquen el equilibrio de energía y aumente la producción de radicales libres en exceso. Con el fin de contrarrestar el efecto de estos compuestos dañinos y asegurar el crecimiento, las microalgas son capaces de generar moléculas adicionales con propiedades antioxidantes. Los pigmentos como el β -caroteno, son capaces de contrarrestar la sobreproducción de los radicales libres.

En *Chlorella vulgaris*, una disminución de temperatura de 30 a 25 °C aumenta el contenido de lípidos en 2.5 veces sin afectar la tasa de crecimiento. Una tendencia similar se ha observado en *Scenedesmus sp*, donde una disminución de la temperatura de 25 a 20 °C aumenta el contenido de lípidos en 1.7 veces con un ligero efecto sobre la tasa de crecimiento, mientras que en *Nannochloropsis oculata*, la productividad de lípidos parece no depender de la temperatura.

En las microalgas *Scenedesmus acutus*, *Nannochloropsis oculata* y *Chlorella vulgaris* también se ha evaluado el efecto de la temperatura en la acumulación de lípidos. Se ha reportado que *S. acutus* acumula una mayor cantidad de lípidos (22%) a una de temperatura de 38 °C, mientras que en la misma temperatura *N. oculata* acumula un 15.7 % de lípidos, por otra parte *C. vulgaris* a una temperatura de 30 °C acumula hasta un 11% de lípidos.

En la Tabla 15.4 se describen algunas especies de microalgas en las que se evaluó el efecto del cambio de temperatura en la composición lipídica, lo que demuestra el interés por conocer la factibilidad de utilizar microalgas para la obtención de lípidos destinados a la producción de biodiésel.

Tabla 15.4. Inducción de lípidos en microalgas utilizando diferentes temperaturas
(Modificado de Sharma *et al.* (2012).

Microalga	Condición de estrés por temperatura	Contenido de lípidos
<i>Rhodomonas sp.</i> <i>Cryptomonas sp.</i> <i>Isochrysis sp.</i>	Rango de 27 °C a 30 °C	Aumento de un 15.5, 12.7 y 21.7 % respectivamente en lípidos totales.
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Aumento de 20 °C a 25 °C	Aumento de un 14.92 % de lípidos totales.
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Disminución de temperatura	Incremento de ácidos grasos insaturados.
<i>Nannochloropsis salina</i>	Aumento de temperatura	Aumento de los lípidos totales.
<i>Dunaliella salina</i>	Cambio de 30 °C a 12 °C	Aumento de los lípidos insaturados.

Microalga	Condición de estrés por temperatura	Contenido de lípidos
<i>Ochromonas danica</i>	Aumento de 15 °C a 30 °C	Aumento de los lípidos totales.
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Cambio de 25 °C a 10 °C	Aumento en la cantidad de ácido oleico
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Cambio de 25 °C a 10 °C durante 12 h	Rendimientos más altos de ácidos grasos poliinsaturados y ácido eicosapentaenoico
<i>Spirulina platensis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Botryococcus braunii</i>	Aumento de temperatura	Ácidos grasos saturados aumentados

Intensidad de luz y longitud de onda irradiante

Se ha reportado que el crecimiento de las microalgas bajo diferentes intensidades de luz y longitudes de onda ha dado como resultado cambios en el metabolismo de éstas alterando los perfiles lipídicos. A bajas intensidades de luz se induce a la formación de lípidos anfipáticos particularmente lípidos de membrana asociados con el cloroplasto (fosfolípidos y glucolípidos), sin embargo, el crecimiento es limitado; mientras que a altas intensidades de luz decrece el contenido de estos lípidos anfipáticos con un simultáneo incremento en la cantidad de lípidos neutrales de almacenamiento, principalmente triglicéridos (TAGs), no obstante, esto puede provocar foto-oxidación y foto-inhibición. Para evitar esto, es necesario optimizar la cantidad de luz emitida al cultivo para obtener un crecimiento adecuado y al mismo tiempo provocar la formación de TAGs.

Bajo estrés por alta intensidad de luz, el exceso de electrones de la cadena de transporte fotosintética puede inducir un exceso de producción de especies reactivas de oxígeno, esto puede causar la inhibición de la fotosíntesis y daño a la membrana. La formación de ácidos grasos de cadena larga como el C18 puede consumir aproximadamente 24 NADPH de la cadena de transporte de electrones, que es el doble requerido para la síntesis de carbohidratos y proteínas, y por lo tanto relaja la cadena de transporte de electrones bajo estas condiciones. Por lo anterior se puede concluir que la producción de TAGs bajo condiciones de alta intensidad de luz se puede deber a un mecanismo de protección para la célula. Los aceptores de electrones utilizados por el proceso de fotosíntesis podrían agotarse y esto llevaría a sintetizar ácidos grasos que

a su vez, se almacenan como TAGs, lo cual potencialmente ayuda a la célula para generar aceptores de electrones. Además, se sabe que la síntesis de TAGs está coordinada junto con la producción de carotenoides en algas. Las moléculas de la vía de los carotenoides como β carotenos, luteína y astaxantina están esterificados con los TAGs y secuestrados dentro de los cuerpos lipídicos. La distribución periférica de los cuerpos lipídicos ricos en carotenoides sirve como protectores para prevenir o reducir un exceso de luz que incide sobre el cloroplasto bajo estrés.

Por otro lado, las microalgas no aprovechan en su totalidad la radiación solar durante la fotosíntesis, sólo es útil el espectro comprendido entre los 400 y 700 nm de longitud de onda denominada “radiación fotosintéticamente activa”, región que representa el 42.3% del total de radiación recibida (Fig. 15. 5). La energía promedio de los fotones comprendidos en este rango es de 218 kJ calculando una eficiencia fotosintética máxima para microalgas de 7.6% respecto a la radiación solar total, valor que es superior al de las plantas C3 (2.4-4.3%) y C4 (1.3-3.7%).

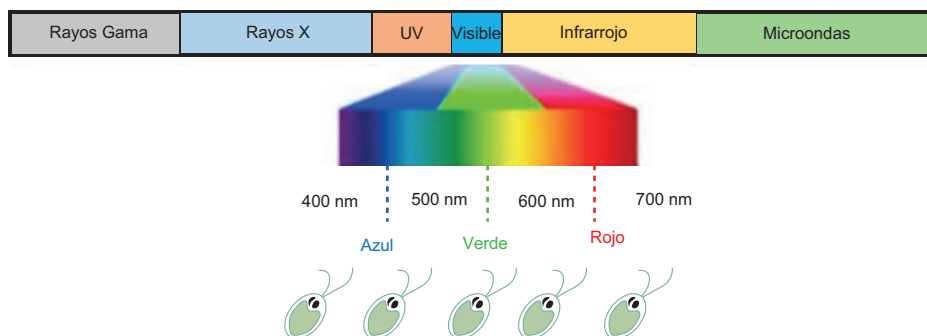


Figura 15. 5. Espectro electromagnético y radiación fotosintéticamente activa para las microalgas.

Se han estudiado diversos tipos de microalgas crecidas bajo diferentes longitudes de onda, entre los que destacan la luz roja (600-700 nm) y azul (400-500 nm), demostrando que la velocidad de crecimiento, el crecimiento celular y el contenido lipídico aumentan; en *Botryococcus braunii* la luz roja a 660 nm muestra una mejor eficiencia en el crecimiento, en la fijación del CO_2 y en la producción de hidrocarburos; bajo estrés por la luz azul (475 nm)

Chlorella vulgaris aumenta su velocidad de crecimiento y la productividad de biomasa en 14 días mientras que la luz roja (650 nm) y verde (510 nm) no fueron favorables. Bajo el crecimiento en luz azul (457 nm) usando lámparas LEDs, las microalgas marinas *Nannochloropsis sp.* y *Tetraselmis sp.* aumentaron su velocidad de crecimiento y su producción de ácidos grasos saturados comparados con el estrés de luz roja (660 nm), roja-azul y luz blanca.

Chlamydomonas reinhardtii contiene clorofila *a* y *b* asociadas a pigmentos, las cuales absorben principalmente en las regiones azul y rojo del espectro. Se conoce la existencia de un receptor de luz azul en *C. reinhardtii* que controla la producción de algunas enzimas esenciales que desencadenan varias etapas en la reproducción y en la formación de gametos. Esto ha sugerido que también existe un receptor de luz roja pero no se ha encontrado aún, a pesar de eso se ha encontrado que la luz roja está ligada a genes de regulación y desarrollo, mientras que tiene un papel menor en la formación de gametos. En esta misma microalga se han realizado estudios para conocer el efecto que tienen la luz roja y azul en el crecimiento, usando un sistema con láser individual y combinado a 655 nm (rojo), 680 nm (rojo), 655 nm + 474 nm (rojo-azul) y 680 nm + 474 nm (rojo-azul); se ha demostrado que el crecimiento y la división celular no son favorecidas bajo estas longitudes de onda específicas y solo se logró un incremento en la velocidad de crecimiento y de división celular bajo una combinación de luz roja y azul. De la misma manera, se ha estudiado el potencial de *C. reinhardtii* para acumular lípidos bajo luz blanca (400-700 nm), roja (650 nm) y verde (550 nm), encontrándose que la luz roja muestra un efecto positivo en el crecimiento de la microalga, el contenido de clorofila y en la cantidad de lípidos en comparación con los cultivos crecidos bajo luz blanca y verde.

Algunos procesos implicados en el crecimiento de la microalga son afectados por la intensidad de luz como la fotoadaptación y fotoaclimatación los cuales conducen a cambios en las propiedades celulares de acuerdo con la disponibilidad de la luz y al aumento en la eficiencia fotosintética. La adaptación puede ocurrir a través de múltiples mecanismos como cambios en los tipos y cantidades de pigmentos, tasa de crecimiento, tasa de respiración oscura o la disponibilidad de ácidos grasos esenciales. La fotoaclimatación morfológica está acompañada por cambios en el número y volumen celular, así como en la densidad de las membranas tilacoideas. Estos resultados evidencian que no todas las especies de microalgas presentan el mismo comportamiento, ya que

además de la intensidad y longitud de onda, existen otros factores que pueden afectar los resultados.

Cambio de pH

Durante el crecimiento de microalgas, el pH del medio juega un papel importante ya que puede cambiar no solo la distribución de las especies de dióxido de carbono (Fig. 15. 6), sino también la disponibilidad de los metales traza y nutrientes esenciales para su crecimiento, así como la producción de clorofila. Se ha reportado que *C. reinhardtii* requiere un pH citosólico entre 7 y 7.5 para que sus orgánulos y otros procesos internos funcionen apropiadamente. Para mantener este pH citosólico, las proteínas de membrana utilizan ATP para evitar que en el entorno externo se genere un gradiente de H^+ y este pueda ser internalizado a la célula. Bajo condiciones ácidas externas se consume ATP adicional para mantener el pH citosólico de 7; por lo tanto, *C. reinhardtii* es energéticamente menos eficiente en ambientes ácidos. A medida que se agota el ATP, hay menos energía para el crecimiento y la reproducción celular.

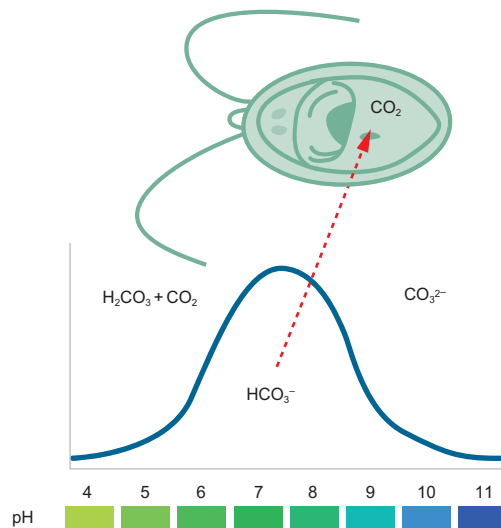


Figura 15. 6. Distribución del carbono por efecto del pH en *Chlamydomonas reinhardtii*. AC: Anhidrasa carbónica.

Se ha reportado que la acumulación de lípidos se maximiza cuando las células de *C. reinhardtii* están estresadas por cambios de pH, aunque su crecimiento es más lento, el almacenamiento de energía en forma de TAGs es mayor. En *C. reinhardtii* se ha evaluado el contenido de clorofila y de lípidos totales bajo pH diferentes (7, 7.8 y 8.5). A pH de 7.8 se ha observado un incremento en el crecimiento celular y una acumulación significativa de clorofila respecto al cultivo crecido a pH de 7.0 (control), mientras que a pH de 8.5 se registró una fuerte disminución en ambos parámetros en comparación con los otros valores de pH analizados. Con relación a los lípidos, el contenido aumento 3 y 2.3 veces más a pH 7.8 y 8.5, respectivamente, en comparación con el cultivo a pH 7. Los resultados sugieren que para *C. reinhardtii*, un pH de 7.8 podría ser el óptimo para maximizar el crecimiento y la acumulación de lípidos.

Resultados similares se han observado utilizando otras microalgas, por ejemplo, en *Nannochloropsis salina* también se ha estudiado la influencia del pH en el crecimiento celular y la acumulación de lípidos. De los valores de pH analizados (5, 6, 7, 8, 9 y 10) fue a pH 8 en donde se encontró una acumulación máxima de lípidos. Por otro lado, se ha reportado que la relación entre la concentración de nitrógeno y pH influye en la producción de biomasa y lípidos en los cultivos de *Chlorella sp.* y *Dunaliella salina*. En este estudio se reportó que *Chlorella sp.* crece mejor a pH 7.5 con una concentración inicial de nitrógeno de 0.1 mg L^{-1} , mientras que *Dunaliella salina* presentó mayor crecimiento a pH 8.5 sin afectar la concentración de nitrógeno utilizada.

De la misma manera, *Chlorella vulgaris* se ha crecido en cultivos bajo limitación de azufre a diferentes pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.5 y 11.0), los resultados indicaron que esta microalga es capaz de crecer a pH de 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 alcanzando la máxima productividad de biomasa a pH superior a 7; sin embargo, el cultivo a pH 7.5 alcanzó la mayor acumulación de lípidos (53%) mientras que a pH 8.0 el contenido de lípidos se redujo a 33%, se ha indicado también que la composición de ácidos grasos no está relacionada con el pH.

De la misma manera, la microalga *Scenedesmus abundans* fue crecida a 5 pH diferentes (5, 6, 7, 8 y 9) y 4 concentraciones iniciales de fosfato. A pH 8 se registró la mayor productividad de biomasa y de lípidos (26%), mientras que a pH 5 se redujo el contenido a 12%. Aunque el fosfato no mostró un efecto significativo en el crecimiento de la microalga, si causó una alteración en el perfil de FA. Estos estudios permiten comprender que incluso cuando se mo-

difican los mismos parámetros de crecimiento en un cultivo de microalgas, no se puede predecir un comportamiento general.

Uso de reguladores de crecimiento

Tradicionalmente, las hormonas vegetales y los reguladores sintéticos del crecimiento de las plantas se han considerado herramientas valiosas para dilucidar las respuestas fisiológicas de las plantas a los cambios ambientales. Además, su uso puede extenderse al campo de la producción de algas o microalgas para mejorar la viabilidad potencial de las aplicaciones comerciales de la producción de biomasa renovable. Puede ser posible reducir los costos de producción por tonelada de biomasa producida, aumentando así la rentabilidad de las industrias que producen algas para biocombustibles. Varios reguladores del crecimiento vegetal (RCs) tales como el ácido salicílico (SA), ácido 1-naftalenacético (NAA), giberelina A3 (GA_3), el ácido jasmónico (JA), entre otros, han sido investigados por sus efectos sobre el crecimiento de las microalgas en la última década.

Las auxinas desempeñan un papel versátil en el crecimiento y en el metabolismo de las microalgas; incluso concentraciones muy pequeñas de auxinas pueden estimular el crecimiento, la producción de biomasa y la biosíntesis de biomoléculas. Se han identificado diversas concentraciones de ácido indolacético (AIA) o sus derivados en extractos de microalgas y sobrenadantes, que presentan efectos estimulantes e inhibidores sobre el crecimiento y el metabolismo de microalgas. Se plantea la hipótesis de que las auxinas pueden promover el crecimiento al estimular la actividad fotosintética al incrementar el contenido de clorofila y activar los sistemas redox celulares.

Las citoquininas (CK) son derivados de adenina y adenosina, descubiertos a mediados del siglo XX. El tipo *cis*-zeatina es la citoquinina predominante en las microalgas. También se ha descubierto que las CK desempeñan un papel clave en los procesos biológicos de las microalgas, incluida la inducción de la división celular, la estimulación de los procesos de crecimiento y el aumento de la actividad fotosintética. En condiciones adversas, las CK de microalgas tienen un efecto protector sobre las actividades fisiológicas, especialmente la fotosíntesis.

El ácido acetilsalicílico fue sintetizado a partir del ácido salicílico; el ácido salicílico (SA) es un miembro de una clase de pequeñas moléculas fenólicas en

plantas que se definieron como un anillo aromático sustituido con un grupo hidroxilo o sus derivados. Se ha especulado que algunos ácidos fenólicos funcionan como reguladores del crecimiento cuando se aplican a las microalgas.

En *C. vulgaris* FACHB-9 se ha evaluado el efecto de diferentes concentraciones de ocho reguladores de crecimiento (RCs): (SA, NAA, GA₃, 6-bencil aminopurina (6-BA), 2,4 epibrasinólido (EBR), ácido abscísico (ABA), etefón (ETH) y espermidina (SPD) en la acumulación de lípidos, ácidos grasos poliinsaturados, proteínas y carotenoides en la microalga, también se evaluó la expresión transcripcional de algunos genes implicados en la síntesis de FA con la finalidad de comprender el mecanismo molecular de la bioacumulación de lípidos. Los resultados indicaron que los RCs son útiles para inducir la acumulación de lípidos en esta microalga, además de proteínas solubles, carotenoides y PUFAs. Se encontró también que ABA es el RC más efectivo para aumentar el contenido total de lípidos y la productividad de estos hasta en 3 y 2 veces más respectivamente, en comparación con los controles. Los tratamientos con 6-BA, NAA, ABA y ETH provocaron que las células de *C. vulgaris* acumularan PUFAs, especialmente Ácido Linoleico (LNA), Ácido docosahexaenoico (DHA), Ácido araquidónico (ARA) y Ácido eicosapentaenoico (EPA). Similar a los lípidos, la acumulación de carotenoides también se indujo en las células de *C. vulgaris* con todos los RCs utilizados, excepto el ABA. Por el contrario, solo el SA fue efectiva para inducir la acumulación de proteínas.

En la Tabla 15.5 se resumen los efectos de los reguladores en el crecimiento y los bioproductos que se obtienen de las distintas microalgas evaluadas.

Tabla 15.5. Efectos de los reguladores de crecimiento en microalgas
(Modificado de Han *et al.*, 2018)

Regulador de crecimiento	Microalga	Efecto
Ácido Indolacético	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Aumento en el crecimiento celular, producción de biomasa, biosíntesis de pigmentos (clorofila a y carotenoides totales) y en la biosíntesis de ácidos grasos.
Ácido Indolacético	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Aumento el crecimiento 1.9 veces respecto al control, aumento de ácidos grasos (ácidos palmítico, oleico, linoleico y α -linolénico).
Ácido Abscísico	<i>Chlorella saccharophila</i>	Aumento de lípidos, principalmente de triacilglicéridos.
Bencil- aminopurina y Kinetina	<i>Chlorella protothecoides</i>	Aumento en la producción de biomasa y la síntesis de lípidos (particularmente ácido α -Linoleico).
Ácido Giberélico (GA3)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Aumento en el crecimiento celular, aumento en el contenido y la productividad lipídica.
	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Mejora en la productividad lipídica de hasta 7 veces más respecto al control.
Etefón	<i>Chlorella vulgaris</i>	Incremento en la acumulación de ácidos grasos saturados, α -tocoferol, ácido g-aminobutírico, asparagina, prolina

Sobreexpresión de genes y factores de transcripción involucrados en la biosíntesis de lípidos

Las estrategias basadas en ingeniería genética proponen la sobreexpresión de genes que codifican para enzimas clave en la síntesis de ácidos grasos y TAGs; como por ejemplo la sobreexpresión de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) que cataliza la primera reacción limitante en la biosíntesis de ácidos grasos al transformar el acetil-CoA en malonil-CoA (Fig. 15. 7). Sin embargo, este enfoque no ha tenido mucho éxito en el aumento de las reservas de lípidos ya que el aumento o disminución de la expresión de estas enzimas parece provocar “cuellos de botella” en otros pasos de la ruta. Esta estrategia aún se encuentra en estudio a fin de lograr identificar las enzimas clave para aumentar estas reservas de energía, descifrando los transcriptomas de las cepas ante distintas condiciones de estrés. Sin embargo, existen reportes en los cuales se

ha demostrado que la sobreexpresión de las isoformas de la enzima diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) tipo 2 inducen un aumento en la cantidad de ácidos grasos formando gotas lipídicas en el citoplasma cuando la microalga se somete a estrés. La DGAT forma parte de la familia de aciltransferasas y juega un papel importante en el metabolismo de los glicerolípidos al participar en la fase final de la síntesis de triglicéridos (Fig. 15. 7).

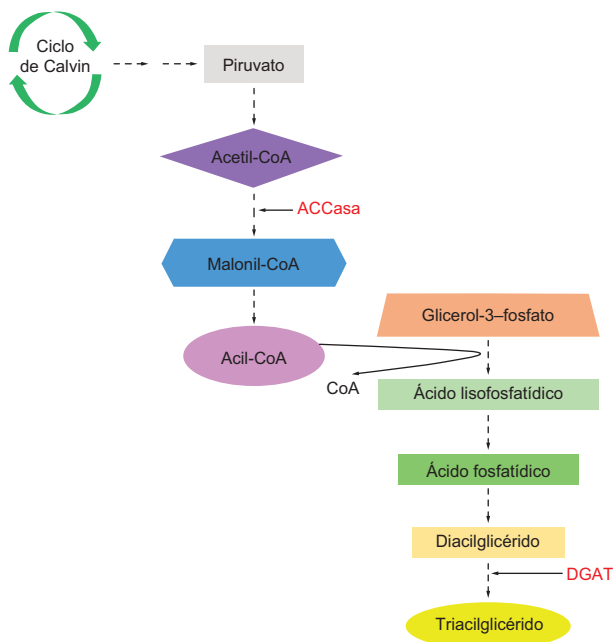


Figura 15. 7. Biosíntesis de lípidos en microalgas. ACCasa: acetil-CoA carboxilasa; DGAT: diacilglicerol aciltransferasa.

La microalga *C. reinhardtii* se ha transformado via nuclear sobreexpresando dos isoformas de la enzima DGAT2; de acuerdo a los resultados, las cepas transgénicas obtenidas acumulan una mayor cantidad de lípidos, de manera particular, la cepa sobreexpresante de la isoforma 3 duplicó la cantidad de lípidos respecto a la cepa sin transformar. Resultado similar se ha reportado para la misma microalga, pero transformada con el gen DGAT de *Brassica napus*, al igual que el caso anterior, las cepas transgénicas presentaron un aumento del doble en los lípidos neutros totales comparados con la cepa no modificada.

Sin embargo, se ha sugerido en los últimos años que la regulación de las vías metabólicas debe estudiarse en el contexto de toda la célula y no en un solo paso de la ruta metabólica. En este sentido, los factores de transcripción (TFs) pueden regular la expresión o la actividad de varias enzimas relacionadas con los productos deseados. Estos pueden actuar reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, reclutando a otros factores o uniéndose directamente a la ARN polimerasa. Este enfoque es más prometedor ya que no solo se afecta a una de las proteínas o enzimas, sino a todo el conjunto de proteínas de la ruta metabólica evitando así los “cuellos de botella”. Las investigaciones más recientes se enfocan en la búsqueda de TFs que regulan la biosíntesis de lípidos en microalgas. En años anteriores se han descubierto en plantas los factores de transcripción tipo-Dof (DNA-binding-with-one-finger), los cuales están implicados en la ruta de biosíntesis de lípidos en semillas de soya. De manera particular, los genes *GmDof4* y *GmDof11* aumentan la cantidad de lípidos totales en semillas de *Arabidopsis* transgénicas y aumentan la expresión de genes que están asociados con la biosíntesis de ácidos grasos. Este factor de transcripción también se ha encontrado en otros organismos incluyendo *C. reinhardtii*.

La cepa de *C. reinhardtii* ha sido modificada para sobreexpresar el gen *GmDof11* que codifica para el factor de transcripción tipo Dof. Los resultados indicaron una mayor cantidad de lípidos en las cepas recombinantes respecto a la cepa no transformada. También se reportó que la sobreexpresión del TF Dof incrementó la expresión de varios genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y glicerolípidos. Estas mismas transformantes se sometieron a estrés por inanición de nitrógeno y azufre, ya que se ha reportado que una combinación de estrategias (por ejemplo, ingeniería genética y déficit de nutrientes) podría incrementar aún más el contenido lipídico. Los resultados demostraron que las cepas sobreexpresantes del TF Dof bajo privación de azufre y nitrógeno acumulan 2.6 y 2.7 veces, respectivamente, en relación a la cepa sin transformar sometida al mismo tipo de estrés nutricional. Es relevante el hecho de que las rutas metabólicas no solo se ven afectadas por el nivel de expresión de los factores de transcripción, sino también por las condiciones de estrés nutricional. Una estrategia basada en cultivar microalgas sobreexpresantes de TFs en un medio con concentraciones optimizadas de nutrientes podría aumentar el rendimiento de la obtención de lípidos.

El método de TFs es una tecnología muy prometedora y es probable que pueda proporcionar el avance necesario que permita la producción rentable

de lípidos de microalgas. Sin embargo, ésta todavía se encuentra en fase inicial y el primer paso importante sería identificar varios TFs que regulan la biosíntesis de lípidos en microalgas. Otra estrategia que puede ser prometedora es la sobreexpresión de más de una enzima clave en la producción de TAGs para mejorar la biosíntesis de lípidos.

Aplicaciones de los lípidos producidos en microalgas

Hoy en día es imperativo que, al satisfacer nuestras necesidades de alimentos, de transporte y de cuidado de la salud, preservemos nuestro medio ambiente, pues es la única manera de vivir saludablemente y garantizar el desarrollo de futuras generaciones. Mitigar la contaminación ambiental y tratar de solucionar el problema de la demanda energética mundial, puede lograrse con el desarrollo y uso de nuevas fuentes renovables de combustibles que sean eficientes y compatibles con la infraestructura actual. Enormes esfuerzos se han dedicado a la búsqueda de combustibles alternativos que suplan en menor o mayor grado el consumo de combustibles fósiles, en este sentido, los metabolitos de las microalgas, y en particular los lípidos, pueden desplazar parcial e incluso totalmente, nuestra dependencia a los combustibles fósiles ya que pueden ser convertidos fácilmente en biodiésel por un proceso de transesterificación. La transesterificación es un proceso catalítico de intercambio de un grupo alcoxi de un éster por un alcohol (aceptor de acilo), esto convierte a los triglicéridos en ésteres alquílicos de ácidos grasos y glicerol (Fig. 15.8). Este proceso también se le conoce también como alcoholisis ya que utiliza alcoholes de cadena corta como el etanol y metanol como aceptores de acilo, siendo este último el más utilizado comercialmente debido a su bajo costo.

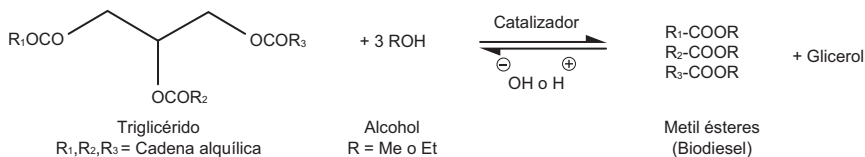


Figura 15.8. Proceso de transesterificación de un aceite (triglicéridos) a biodiésel.

El aceite de microalgas parece ser el único con el potencial para desplazar al diésel convencional. A diferencia de otros cultivos oleaginosos, las microalgas crecen extremadamente rápido y algunas son ricas en aceite (Tabla 15. 6). Una gran cantidad de microalgas duplican su biomasa en tan sólo 24 h y su contenido de aceite puede llegar hasta un 80% en peso de biomasa seca.

Tabla 15.6. Comparación del rendimiento de aceite microalgal con otras materias primas. (Basada en datos publicados por Mata *et al.* (2010).

Microalga Cepa/especie	% aceite en peso de biomasa	Rendimiento de aceite (L / ha /año)
Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	44	172
Cáñamo (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363
Soya (<i>Glycine max</i> L.)	18	636
Jatrofa (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974
Girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070
Higuerilla (<i>ricinus communis</i> L.)	48	1307
Palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366
Microalgas (contenido bajo de aceite)	30	58,700
Microalgas (contenido medio de aceite)	50	97,800
Microalgas (contenido alto de aceite)	70	136,900

Otra ventaja del diésel obtenido del aceite de microalgas es que es renovable, no tóxico y ecológico; presenta un punto de inflamación más alto, mayor biodegradabilidad, mejor número de cetano y emite menos gases de efecto invernadero respecto al diésel proveniente de fuentes fósiles. Se han investigado nuevas estrategias para disminuir costos de producción y comercialización de este biocombustible, desafortunadamente, el precio de su manufactura por técnicas convencionales sigue siendo muy alto como para desplazar por completo al diésel convencional.

Además del aceite extraído de microalgas que puede ser útil para elaborar el biodiésel, es posible obtener otros bioproductos de interés industrial. Se han

reportado numerosos componentes en las microalgas como son: proteínas, antioxidantes, clorofilas, carotenoides, ácido fólico, polisacáridos, PUFAs, triglicéridos y vitaminas, que se utilizan comercialmente en diferentes sectores industriales (por ejemplo, en alimentos funcionales, nutraceuticos, productos farmacéuticos, cosméticos, acuicultura, etc.). Los PUFAs de las microalgas tienen un mercado biotecnológico muy prometedor, ya que poseen un olor mucho menos desagradable que el aceite de pescado y tienen un menor riesgo de contaminación por metales, esto se aprovecha para darle un valor agregado a la leche y mejorar la nutrición en niños pequeños.

Se ha publicado que algunas aves de corral han sido alimentadas con microalgas como *Nannochloropsis oceánica* para aumentar sus niveles de PUFAs en carne y huevos. También se ha reportado la adición de ácido EPA y DHA a partir *Cryptocodinium cohnii* y *Schizochytrium* en las fórmulas infantiles y en el mercado de alimentos saludables. Otro ejemplo, es el de Nutrinova[®], una empresa alemana que invita a las personas vegetarianas a consumir suplementos con DHA, debido a que los índices en sangre en personas que lo obtienen a través de las plantas es insuficiente. Se ha propuesto que el aceite obtenido a partir de microalgas satisface las necesidades básicas de DHA en vegetarianos. Martek Biosciences Corporation es una empresa que también ha apostado por el aceite de microalgas; a través de una cepa mejorada de *Schizochytrium* obtienen un aceite (rico en DHA y EPA) con un perfil de ácidos grasos que es muy parecido al obtenido por otras fuentes. La empresa Martek[®] ha solicitado la aprobación para su uso en galletas y aceites de cocina (Martek Biosciences Corporation 2011). Thrive[®] es otra empresa que actualmente vende aceite comestible de microalga con un bajo contenido en grasas saturadas (“Thrive[®] culinary oil” 2020).

Con relación a los cosméticos (cremas o lociones), los ácidos grasos cumplen una función importante en la piel, intervienen en la pérdida de agua trans-epidérmica y en la restauración de la barrera de permeabilidad. Se ha reportado también que la astaxantina proveniente de microalgas presenta la propiedad de renovar la piel y es capaz de disminuir las arrugas (patas de gallo), así mismo disminuye el tamaño de manchas por la edad, mejora la elasticidad y textura de la piel y el contenido de humedad de la capa de corneocitos.

Existen también los llamados marinosomas[®] (liposomas basados en extractos de lípidos de microalgas y otros organismos marinos con altas cantidades de PUFAs), éstos están adquiriendo importancia comercial debido a

que proporcionan efectos nutritivos y protectores para la piel. Actualmente, se siguen investigando otras clases de compuestos derivados de microalgas para su aplicación en cosméticos (Tabla 15.7).

Tabla 15.7. Uso potencial de derivados microalgales en cosméticos
(Basada en datos de Mourelle *et al.*, 2017).

Molécula bioactiva	Microalga/cianobacteria	Uso potencial en cosméticos	Referencia
β -carotenos	<i>Dunaliella salina</i>	Antioxidantes	(Hamed, 2016)
Astaxantina	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Antioxidantes y protector solar	(Hamed, 2016; Koller <i>et al.</i> , 2014)
Licopeno	<i>Anabaena vaginicola</i>	Antioxidante Anti-envejecimiento Pantalla solar	(Hashtroudi <i>et al.</i> , 2013; Singh <i>et al.</i> , 2012)
Escitonemina	Cianobacterias marinas	Pantalla solar	(Takamatsu <i>et al.</i> , 2003)
Vitamina E (α-tocoferol)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Tetraselmis suecica</i>	Antioxidante	(Carballo-Cárdenas <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Reparador de colágeno	(Koller <i>et al.</i> , 2014)
Extractos de microalgas	<i>Scenedesmus vacuolatus</i> , <i>Phaeodactylum</i> <i>Tricornutum</i> y <i>Chlorella kessleri</i>	Antioxidantes	(Morelli y Scarano, 2004; Sabatini <i>et al.</i> , 2009)

En la industria alimentaria, los carotenoides de microalgas también tienen potenciales aplicaciones. Los carotenoides como el α - y β -caroteno, licopeno, β -criptoxantina, zeaxantina y luteína tienen usos comerciales como colorantes naturales para alimentos. El β -caroteno reúne dos propiedades importantes: es un poderoso antioxidante y a la vez su coloración, que varía desde el rojo hasta el amarillo, por lo cual proporciona color natural a la margarina, queso, pescado, yema de huevo, zanahorias, jitomates, espinacas melones, peras, etc., es por esto que se usa como colorante en frituras, mantequilla para palomitas de maíz, en imitaciones de lácteos, gelatinas, dulces, etc. Una de las principales ventajas del uso de carotenoides en la industria alimentaria es que tienen un impacto positivo en la salud humana, sin embargo, el potencial de las microalgas como fuente de colorante para alimentos sigue siendo limitado debido a

la termo- y foto-inestabilidad de los pigmentos. Aun así, *Dunaliella salina*, se cultiva como fuente de β -caroteno para utilizarlo como precursor de vitamina A, como colorante naranja y como suplemento de vitamina C; la astaxantina obtenida a partir de *Haematococcus* es útil en acuicultura para pigmentar la carne de peces, y para la piel de pollo se han utilizado la luteína, zeaxantina y cantaxantina.

Las microalgas tienen numerosos compuestos lipídicos que están presentes actualmente en nutracéuticos, por ejemplo, vitaminas: A (Retinol), D, y E (Tocoferol). Sin olvidar también a los ácidos grasos AA (ω 6), DHA (ω 3) y el EPA. Microalgas como *Spirulina*, *Chlorella*, *D. salina* y *Aphanizomenon flos-aquae* son las cepas más utilizadas para comercializar sus productos. Los ácidos grasos de estas microalgas son excelentes para el cuidado de la salud, son anticancerígenos, tienen actividad antioxidante y propiedades antivirales y antibacterianas, participan en procesos de antiinflamación e inmunomodulación; además, se han observado efectos positivos contra la hiperlipidemia, daño por radiación, diabetes, intoxicación por metales pesados y/o toxicidad inducida por químicos, en reacciones alérgicas y anemia.

El desarrollo de productos a partir de microalgas tiene un gran potencial, su riqueza en metabolitos biológicamente activos es de vital importancia para diversos sectores de la industria y, a medida que la población humana continúe creciendo, estos microorganismos serán clave en la búsqueda desenfrenada de satisfacer la necesidad global de alimentos, energías y nutrición, así como en la mejora y conservación del medio ambiente y de la salud.

Protocolo

En esta sección se describe un protocolo para la cuantificación de lípidos totales, lípidos neutros y saponificación de muestras de microalgas:

Cuantificación de lípidos totales

1. Cosechar la biomasa al final de la cinética de crecimiento mediante centrifugación.
2. Dejar secar las muestras por 1 día a 70 °C dentro de una estufa de secado y se registrar el peso

3. Añadir 10 mL de metanol absoluto para extraer la clorofila de las muestras y agitar vigorosamente.
4. Centrifugar para remover el sobrenadante con la clorofila.
5. Agregar 5 mL de agua destilada y homogenizar por vortex.
6. Sonicar a una amplitud de 60% por 5 s y reposar por otros 5 s, repetir este paso 4 veces.
7. Añadir 10 mL de una mezcla cloroformo-metanol (2:1, v:v), homogenizar por vórtex y reposar por 24 h a -20 °C.
8. Posterior a este tiempo, centrifugar a 4500 rpm por 20 min, transferir la fase orgánica a un nuevo tubo.
9. Añadir 5 mL de NaCl 0.9% (w/v) para crear un sistema bifásico, del cual se recupera la fase inferior, la cual contiene los lípidos totales.
10. Centrifugar a 4500 rpm por 10 min para facilitar la separación de la fase superior.
11. Para eliminar los residuos acuosos, incubar las muestras a 70 °C dentro de una estufa de secado hasta la evaporación completa y registrar los pesos obtenidos.

Saponificación

Este protocolo describe la saponificación de las muestras para remover los restos de clorofila.

1. Añadir 10 mL de una solución de NaOH al 1% a las muestras (lípidos extraídos) e incubar a 70 °C durante 1 hora.
2. Añadir 10 mL de la mezcla cloroformo:metanol (2:1, v/v), y homogenizar por vortex.
3. Añadir 3 mL de NaCl a 0.9% y agitar vigorosamente para generar 2 fases.
4. La fase superior contiene los productos derivados de la separación de la clorofila.

Este procedimiento permite realizar una saponificación en presencia de NaOH, lo que conlleva a la producción de clorofilina soluble en agua y fitol (los cuales son solubles en fase acuosa y en la fase orgánica (fase inferior) se encuentran los lípidos totales.

5. Retirar la fase acuosa y dejar en incubación la fase inferior a 70 °C para registrar finalmente el peso de los lípidos totales sin clorofila.

Cuantificación de lípidos neutros

El Rojo de Nilo es un colorante fluorescente ampliamente utilizado para la cuantificación de lípidos neutros en microalgas. Usualmente, la intensidad de fluorescencia de las muestras teñidas se correlaciona con el contenido de lípidos neutros utilizando una curva estándar y a partir de esta es posible deducir la concentración de lípidos neutros de las muestras desconocidas interpolando los valores de intensidad de fluorescencia en la curva. Este protocolo describe la cuantificación de lípidos neutros utilizando el colorante Rojo Nilo (método modificado de Bertozzini *et al.* (2011)).

1. Centrifugar las muestras durante 20 minutos a 6000 rpm a temperatura ambiente.
2. El pellet conseguido se resuspende en 1 mL de medio Bold, para eliminar las impurezas presentes durante el crecimiento celular.
3. Tomar 200 μL y depositarlos en un pocillo de una placa de 96 pozos de fondo oscuro (realizar en ensayo por triplicado).
4. Registrar la lectura de fluorescencia de las muestras utilizando una longitud de onda de Excitación de 525nm y 580–640nm de Emisión.
5. Después de la lectura, añadir 5 μL de Rojo de Nilo (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en isopropanol) y dejar reposar por 5 min.
6. Registrar la lectura de fluorescencia de las muestras utilizando una longitud de onda de Excitación de 525nm y 580–640nm de Emisión.
7. Restar el valor de fluorescencia obtenida después de añadir la solución de Rojo de Nilo al valor obtenido de fluorescencia que emiten las muestras de cultivo por sí mismas (paso 4) para determinar la fluorescencia de los TAGs presentes en las muestras.
8. Haciendo uso de una curva estándar de trioleína, interpolar el resultado de fluorescencia obtenida para conocer la concentración de TAGs.

La trioleína es un triacilglicérido (TAG) monoácido. Son simples o monoácidos si contienen solo un tipo de ácido graso, diácido si contienen dos tipos de ácidos grasos y triácido si son tres grupos acilos diferentes. Las longitudes de cadena de los ácidos grasos en los triacilglicéridos que se producen de forma natural pueden ser de diferentes longitudes y saturaciones, pero 16, 18 y 20 carbonos son los más comunes (Bertozzini *et al.*, 2011).

Para la elaboración de la curva estándar de trioleína en medio basal bold se realizó lo siguiente:

1. En todos los puntos de la curva se añadieron 180 mL de medio basal bold
2. Dado que la concentración final de trioleína es diferente en cada punto de la curva, los volúmenes de trioleína cambiaron en cada punto de acuerdo a lo descrito en la Tabla 8.

Tabla 15.8. Reactivos y volúmenes utilizados para la generación de la curva estándar de trioleína

Concentración [mg/L]	Medio Bold [μL]	Isopropanol [μL]	Trioleína [μL]
0	180	20	0
1	180	19.8	0.2
2	180	19.6	0.4
3	180	19.4	0.6
4	180	19.2	0.8
5	180	19	1
6	180	18.8	1.2
7	180	18.6	1.4
8	180	18.4	1.6
9	180	18.2	1.8
10	180	18	2
15	180	17	3
20	180	16	4

3. Después de preparar la curva, registrar la lectura de fluorescencia de los estándares utilizando una longitud de onda de excitación de 525nm y 580–640nm de emisión.
4. Realizar una regresión lineal para después interpolar en esta curva los valores de fluorescencia de las muestras problema.

Abreviaturas:

% Por ciento
 °C Grados Celcius
 µL microlitro
 6-BA 6-bencilaminopurina
 AA Ácido araquidónico
 ABA Ácido abscísico
 AC Anhidrasa carbónica
 ACCasa Acetil Co-A carboxilasa
 ACDP palmitoil desaturasa
 ACP proteína transportadora de acilo
 ADN Ácido desoxirribonucleico
 ADP Adenosín difosfato
 AIA Ácido indolacético
 ARN Ácido ribonucleico
 ATP Adenosín trifosfato
 CK Citoquininas
 CO₂ Dióxido de carbono
 CoA Coenzima-A
 DGAT Diacilglicerol aciltransferasa
 DHA Docosaheptaenoico
 Dof DNA-binding-with-one-finger (por sus siglas en inglés)
 EBR 2,4 epibrasinólido
 EPA Ácido eicosapentaenoico
 ETH Etefón
 FA Ácidos grasos (por sus siglas en inglés, Fatty Acids)
 FAD ácido graso desaturasa
 FAS ácido graso sintasa
 FATA ácido graso acil-ACP tioesterasa
 GA₃ Giberelina A3
 GPAT glicerol-3-fosfato aciltransferasa
 h horas
 H⁺ Ion hidronio
 H₂PO₄⁻ Dihidrógeno fosfato
 HPO₄⁻² Hidrógeno fosfato

JA Ácido jasmónico
KAS cetoacil ACP sintasa
LNA Ácido Linoleico
LPAAT ácido lisofosfatídico aciltransferasa
LPAT lisofosfatidil aciltransferasa
mg/L miligramos por litro
min minutos
MT malonil transferasa
NAA Ácido 1-naftalenacético
NaCl Cloruro de sodio
NADP⁺ Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato oxidada
NADPH Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato reducida
NaNO₃ Nitrato de sodio
NaOH Hidróxido de sodio
nm nanómetro
p Potencial de hidrógeno
PT palmitoil tioesterasa
PUFAs Ácidos grasos poliinsaturados (por sus siglas en inglés, Polyunsaturated Fatty Acids)
RCs Reguladores del crecimiento vegetal
rpm Revoluciones por minuto
s segundos
SA Ácido salicílico
SAD estearoil ACP desaturasa
SO₄⁻² Sulfato
SPD Espermidina
ST estearoil tioesterasa
TAGs Triacilglicéridos
TFs Factores de transcripción
UV Ultravioleta
v/v Relación volumen: volumen
w/v Relación peso: volumen
WT línea no transformada

Glosario

Ácido graso: Ácido orgánico que se combina con la glicerina para formar las grasas, y que cumple funciones fisiológicas importantes.

Acuicultura: Cultivo de especies acuáticas vegetales y animales.

Alimento funcional: Alimento que, además de su función nutritiva básica, aporta ventajas al organismo.

Aminoácido: Sustancia química orgánica en cuya composición molecular entran un grupo amino y otro carboxilo.

Anfipático: Dicho de una molécula o de una sustancia que tiene propiedades tanto hidrófilas como hidrófobas.

Anticancerígeno: Perteneciente o relacionado con la prevención o el retraso de la aparición del cáncer.

Antioxidante: Sustancia o producto que evita la oxidación.

Antiviral: Dicho de un medicamento, de una sustancia, de un procedimiento, etc., que se utiliza para combatir los virus.

Auxina: Hormona vegetal que ocasiona el crecimiento de las plantas por elongación celular.

Biodegradable: Dicho de una sustancia que puede ser degradada por acción biológica.

Biomasa: Materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

Bioproductos: Materiales, productos químicos y energía derivados de recursos biológicos renovables.

Biocombustibles: Combustibles producidos a partir de biomasa, esto es, desechos de organismos vegetales disponibles en el medio ambiente.

Biosíntesis: Síntesis de compuestos orgánicos realizada por seres vivos o *in vitro* mediante enzimas.

Carbohidrato o polisacárido: Sustancia orgánica formada por carbono, hidrógeno y oxígeno, en la que estos dos últimos elementos se encuentran en la proporción de dos a uno.

Caroteno: Pigmento de origen vegetal o animal, de color rojo, anaranjado o amarillo, que se encuentra en el tomate, la zanahoria, la yema de huevo, etc., y que, en los animales, se transforma en vitamina A.

Carotenoide: Semejante al caroteno en estructura y propiedades.

- Catalizador:** Dicho de una sustancia que, en pequeña cantidad, incrementa la velocidad de una reacción química y se recupera sin cambios esenciales al final de la reacción.
- Centrifugar, centrifugación:** Aprovechar la fuerza centrífuga para secar ciertas sustancias o para separar los componentes de una masa o mezcla según sus distintas densidades.
- Cepa:** Grupo de organismos emparentados, como las bacterias, los hongos o los virus, cuya ascendencia común es conocida.
- Citosol:** Región celular comprendida entre la membrana plasmática y el núcleo, con los órganos celulares que contiene.
- Citoquinina o citoquina:** Polipéptido responsable del crecimiento y la diferenciación de distintos tipos de células.
- Clorofila:** Pigmento propio de las plantas verdes y de ciertas bacterias, que interviene activamente en el proceso de la fotosíntesis.
- Clorofilina:** Mezcla semisintética de sales de cobre y sodio derivada de la clorofila.
- Cloroplasto:** Orgánulo de las células vegetales en el que tiene lugar la fotosíntesis.
- Cofactor:** Pequeña molécula necesaria para la actividad de una enzima.
- Configuración *cis-trans* o isomerismo *cis-trans*:** Término utilizado en química que se refiere a la disposición espacial de los átomos dentro de las moléculas. Los prefijos *cis* y *trans* provienen del latín: “del mismo lado” y “del lado opuesto”, respectivamente.
- Cromóforo:** Dicho de un agrupamiento químico que causa la coloración de una sustancia.
- Diatomea:** Alga unicelular, que vive en el mar, en el agua dulce o en la tierra húmeda, y que tiene un caparazón silíceo formado por dos valvas de tamaño desigual.
- Estrés o factor estresante:** Cualquier estímulo, externo o interno (físico, químico, acústico o somático) que, de manera directa o indirecta, propicia la desestabilización en el equilibrio dinámico del organismo.
- Eucarionte o eucariota:** Células que presentan un núcleo diferenciado, protegido por una membrana y con citoplasma organizado.
- Enzima:** Proteína que cataliza específicamente una reacción bioquímica del metabolismo.
- Especie:** Cada uno de los grupos en que se dividen los géneros y que se componen de individuos que, además de los caracteres genéricos, tienen en

común otros caracteres por los cuales se asemejan entre sí y se distinguen de los de las demás especies.

Factor de transcripción: proteína que se une a secuencias específicas de ADN, controlando así la transcripción de la información genética de ADN a ARN mensajero.

Fotosíntesis: Proceso metabólico específico de ciertas células de los organismos autótrofos, como las plantas verdes, por el que se sintetizan sustancias orgánicas gracias a la clorofila a partir de dióxido de carbono y agua, utilizando como fuente de energía la luz solar.

Fotón: Cada una de las partículas que, según la física cuántica, constituyen la luz y, en general, la radiación electromagnética.

Gameto: Cada una de las células sexuales, masculina y femenina, que al unirse forman el huevo de las plantas y de los animales.

Gen: Secuencia de ADN que constituye la unidad funcional para la transmisión de los caracteres hereditarios

Hidrólisis: Desdoblamiento de una molécula por la acción del agua.

Hiperlipemia: Nivel de lípidos en la sangre superior al normal.

Ingeniería genética: Tecnología de la manipulación y transferencia del ADN de unos organismos a otros, que posibilita la creación de nuevas especies, la corrección de defectos génicos y la fabricación de numerosos compuestos útiles.

Isoforma: Distintas formas de una misma proteína.

Lípido: Cada uno de los compuestos orgánicos que resultan de la esterificación de alcoholes, como la glicerina y el colesterol, con ácidos grasos.

Longitud de onda: Distancia entre dos puntos correspondientes a una misma fase en dos ondas consecutivas.

Macronutriente: Sustancia esencial para el desarrollo de un organismo, que se debe ingerir en cantidades elevadas.

Metabolismo: Conjunto de reacciones químicas que efectúan las células de los seres vivos con el fin de sintetizar o degradar sustancias.

Metabolito: Producto del metabolismo.

Micronutriente: Sustancia que, en pequeñas cantidades, es esencial para el desarrollo de un organismo.

Microorganismos fotosintéticos: Organismos microscópicos capaces de capturar la energía solar y usarla para la producción de compuestos orgánicos.

Número o índice de cetano: Tiempo que transcurre entre la inyección del carburante y el comienzo de su combustión.

Nutracéutico: Producto alimenticio que combina propiedades nutritivas y otras beneficiosas para la salud.

Oleaginoso: Aceitoso.

pH: Medida de acidez o alcalinidad que indica la cantidad de iones de hidrógeno presentes en una solución o sustancia.

Procarionte o procariota: Organismos que no disponen de un núcleo celular. Su ADN, por lo tanto, se encuentra esparcido a lo largo del citoplasma.

Productividad: Relación entre lo producido y los medios empleados, tales como mano de obra, materiales, energía, etc.

Proteína: Sustancia constitutiva de la materia viva, formada por una o varias cadenas de aminoácidos.

Radicales libres: Átomos o conjuntos de ellos que disponen de un electrón sin aparejar, una condición que les confiere inestabilidad y reactividad

Redox: Dicho de una reacción química que se caracteriza por la oxidación de un reactante y la reducción del otro.

Regulador de crecimiento: Pequeñas sustancias químicas producidas naturalmente por las plantas para regular su crecimiento y desarrollo.

Retículo endoplásmico: Conjunto laberíntico de conductos y espacios membranosos del interior de la célula, con funciones de síntesis y transporte de sustancias.

Saponificar: Transformar en jabón una sustancia grasa combinándola con sosa.

Sobreexpresión: Expresar un determinado gen más de lo normal. Esto significa que se producen más copias de ARNm, lo que generalmente conduce a un aumento en los productos proteicos que el gen codifica.

Sustentabilidad: Proceso que tiene por objetivo encontrar el equilibrio entre el medio ambiente y el uso de los recursos naturales.

Tilacoide: Sacos aplanados que son independientes de la membrana interna del cloroplasto. Sitio de las reacciones captadoras de luz de la fotosíntesis y de la fotofosforilación.

Transgénico: Dicho de un organismo vivo que ha sido modificado mediante la adición de genes exógenos para lograr nuevas propiedades.

Vitamina: Cada una de las sustancias orgánicas que existen en los alimentos y que, en cantidades pequeñísimas, son necesarias para el perfecto equilibrio de las diferentes funciones vitales.

Bibliografía

- Abdel-Daim, M. M., Farouk, S. M., Madkour, F. F., & Azab, S. S. (2015). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Spirulina platensis* in comparison to *Dunaliella salina* in acetic acid-induced rat experimental colitis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 37(2), 126-139. <https://doi.org/10.3109/08923973.2014.998368>
- Abdelhafez, H. M., & El-Wahsh, A. M. (2019). Hypolipidemic effects of aphanizomenon flos-aquae and slimquick on cardiac muscle fibers of the adult male albino rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 77(3), 5258-5275. <https://doi.org/10.12816/ejhm.2019.55488>
- Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M. C., & Ahmed, Z. (2013). Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource Technology*, 131, 246-249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.159>
- Baba, M., Kikuta, F., Suzuki, I., Watanabe, M. M., & Shiraiwa, Y. (2012). Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology*, 109, 266-270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.059>
- Balat, M., & Balat, H. (2010). Progress in biodiesel processing. *Applied Energy*, 87(6), 1815-1835. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.01.012>
- Bartley, M. L., Boeing, W. J., Dungan, B. N., Holguin, F. O., & Schaub, T. (2014). pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1431-1437. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0177-2>
- Benning, C., Huang, Z. H., & Gage, D. A. (1995). Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317(1), 103-111. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1141>
- Berner, T., Dubinsky, Z., Wyman, K., & Falkowski, P. G. (1989). Photoadaptation and the “package” effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 25(1), 70-78. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1989.00070.x>
- Bertozzini, E., Galluzzi, L., Penna, A., & Magnani, M. (2011). Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral

- lipids in microalgae using Nile red. *Journal of Microbiological Methods*, 87(1), 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.018>
- Bishop, W. M., & Zubeck, H. M. (2012). Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 2(5), e1000147. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000147>
- Blair, M. F., Kokabian, B., & Gude, V. G. (2014). Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 665-674. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.005>
- Bochenek, M., Etherington, G. J., Koprivova, A., Mugford, S. T., Bell, T. G., Malin, G., & Kopriva, S. (2013). Transcriptome analysis of the sulfate deficiency response in the marine microalga *Emiliania huxleyi*. *New Phytologist*, 199(3), 650-662. <https://doi.org/10.1111/nph.12303>
- Borowitzka, M. A. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 7(1), 3-15. <https://doi.org/10.1007/BF00003544>
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743-756. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
- Borowitzka, M. A., Beardall, J., & Raven, J. A. (2016). *The Physiology of Microalgae: Vols. 6 BT-Th*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2>
- Brányiková, I., Maršálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., & Vítová, M. (2011). Microalgae—novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 766-776. <https://doi.org/10.1002/bit.23016>
- Brown, M. R., Dunstan, G. A., Norwood, S. J., & Miller, K. A. (1996). Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology*, 32(1), 64-73. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00064.x>
- Capell, T., & Christou, P. (2004). Progress in plant metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(2), 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.01.009>
- Carballo-Cárdenas, E. C., Tuan, P. M., Janssen, M., & Wijffels, R. H. (2003). Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*, 20(4), 139-147. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00040-6)

- Cheirsilp, B., & Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110, 510-516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.125>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26(3), 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, 48(6), 1146-1151. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>
- Czerpak, R., Bajguz, A., Gromek, M., Kozłowska, G., & Nowak, I. (2002). Activity of salicylic acid on the growth and biochemism of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(1), 45. <https://doi.org/10.1007/s11738-002-0020-x>
- Das, P., Lei, W., Aziz, S. S., & Obbard, J. P. (2011). Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresource Technology*, 102(4), 3883-3887. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.102>
- Deng, X.-D., Gu, B., Li, Y.-J., Hu, X.-W., Guo, J.-C., & Fei, X.-W. (2012). The roles of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 genes in the biosynthesis of triacylglycerols by the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Plant*, 5(4), 945-947. <https://doi.org/10.1093/mp/sss040>
- Deng, X., Fei, X., & Li, Y. (2011). The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(3), 260-270. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.557>
- Dionisio, M. L., Tsuzuki, M., & Miyachi, S. (1989). Blue light induction of carbonic anhydrase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*, 30(2), 215-219. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077732>
- Dismukes, G. C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G. M., & Posewitz, M. C. (2008). Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 235-240. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.007>

- Dixit, R., Singh, S., & Singh, A. (2020). Effect of nitrogen deficiency on the physiology and biochemical composition of microalga *Scenedesmus rotundus*-MG910488. *Journal of Basic Microbiology*, 60(2), 158-172. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900383>
- Dorval Courchesne, N. M., Parisien, A., Wang, B., & Lan, C. Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*, 141(1), 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.02.018>
- Dubinsky, Z., Matsukawa, R., & Karube, I. (1995). Photobiological aspects of algal mass culture. *Journal of Marine Biotechnology*, 2, 61-65. <https://doi.org/10.4155/bfs.09.10>
- Eid, F., Asmaa A.M., Eldahshan, A. A., & Hamid, S. M. (2018). The possible radio protective role of aphanizomenon Flos-Aquae (AFA) on heart of the adult male albino rats. *The Egypt Journal of Hospital Medicine*, 71(7), 3559-3571. <https://doi.org/10.12816/0047676>
- Elias, P. M. (1981). Lipids and the epidermal permeability barrier. *Archives of Dermatological Research*, 270(1), 95-117. <https://doi.org/10.1007/BF00417155>
- Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A., & Otero, A. (2004). The cell composition of *Nannochloropsis sp.* changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal of Microbiology and Biotchnology*, 20(1), 31-35. <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000013288.67536.ed>
- Fakhry, E. M., & El Maghraby, D. M. (2015). Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *Nannochloropsis salina*. *Botanical Studies*, 56(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40529-015-0085-7>
- Fazal, M. A., Haseeb, A. S.M. A., & Masjuki, H. H. (2013). Investigation of friction and wear characteristics of palm biodiesel. *Energy Conversion and Management*, 67, 251-256. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2012.12.002>
- Fazeli Danesh, A., Ebrahimi, S., Salehi, A., & Parsa, A. (2017). Impact of nutrient starvation on intracellular biochemicals and calorific value of mixed microalgae. *Biochemical Engineering Journal*, 125, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.017>
- Feng, P., Deng, Z., Hu, Z., & Fan, L. (2011). Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. *Bio-*

- resource Technology*, 102(22), 10577-10584. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.109>
- Fredriksson, S., Elwinger, K., & Pickova, J. (2006). Fatty acid and carotenoid composition of egg yolk as an effect of microalgae addition to feed formula for laying hens. *Food Chemistry*, 99(3), 530-537. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.018>
- Gao, Y., Yang, M., & Wang, C. (2013). Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. *Bioresource Technology*, 147, 484-491. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.066>
- Gatrell, S. K., Kim, J., Derksen, T. J., O'Neil, E. V, & Lei, X. G. (2015). Creating ω -3 Fatty-acid-enriched chicken using defatted green microalgal biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(42), 9315-9322. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03137>
- Gaytán-Luna, D. E., Ochoa-Alfaro, A. E., Rocha-Uribe, A., Pérez-Martínez, A. S., Alpuche-Solís, Á. G., & Soria-Guerra, R. E. (2016). Effect of green and red light in lipid accumulation and transcriptional profile of genes implicated in lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology Progress*, 32(6), 1404-1411. <https://doi.org/10.1002/btpr.2368>
- Giordano, M., Pezzoni, V., & Hell, R. (2000). Strategies for the allocation of resources under sulfur limitation in the green alga *Dunaliella salina*; *Plant Physiology*, 124(2), 857-864. <https://doi.org/10.1104/págs.124.2.857>
- Gordon, H. T., Bauernfeind, J. C., & Furia, T. E. (1983). Carotenoids as food colorants. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 18(1), 59-97. <https://doi.org/10.1080/10408398209527357>
- Grossman, A. R., Lohr, M., & Im, C. S. (2004). *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 119-173. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092328>
- Halperin, S. A., Smith, B., Nolan, C., Shay, J., & Kralovec, J. (2003). Safety and immunoenhancing effect of a *Chlorella*-derived dietary supplement in healthy adults undergoing influenza vaccination: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Canadian Medical Association Journal*, 169(2), 111-117. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12874157>
- Hamed, I. (2016). The evolution and versatility of microalgal biotechnology: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1104-1123. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12227>

- Han, X., Zeng, H., Bartocci, P., Fantozzi, F., & Yan, Y. (2018). Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: A review. *Fermentation*, 4(2), 25. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020025>
- Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., & Mayfield, S. (2010). Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels*, 1(5), 763-784. <https://doi.org/10.4155/bfs.10.44>
- Harwood, J. L., & Guschina, I. A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 91(6), 679-684. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.11.004>
- Hashtroudi, M. S., Shariatmadari, Z., Riahi, H., & Ghassempour, A. (2013). Analysis of *Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola* from Northern Iran, as rich sources of major carotenoids. *Food Chemistry*, 136(3), 1148-1153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.055>
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 185-196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
- Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., & Sakaguchi, M. (2000). Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 12(3), 435-439. <https://doi.org/10.1023/A:1008175217194>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, 54(4), 621-639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Huang, K., & Beck, C. F. (2003). Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 6269-6274. <https://doi.org/10.1073/pnas.0931459100>
- Hung, C.-H., Ho, M.-Y., Kanehara, K., & Nakamura, Y. (2013). Functional study of diacylglycerol acyltransferase type 2 family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett*, 587(15), 2364-2370. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.002>
- Ibáñez-Salazar, A., Rosales-Mendoza, S., Rocha-Uribe, A., Ramírez-Alonso, J. I., Lara-Hernández, I., Hernández-Torres, A., Paz-Maldonado, L. M. T., Silva-Ramírez, A. S., Bañuelos-Hernández, B., Martínez-Salgado, J. L.,

- & Soria-Guerra, R. E. (2014). Over-expression of Dof-type transcription factor increases lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, 184, 27-38. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.003>
- Janssen, M., Tramper, J., Mur, L. R., & Wijffels, R. H. (2003). Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(2), 193-210. <https://doi.org/10.1002/bit.10468>
- Jayappriyan, K. R., Rajkumar, R., Venkatakrisnan, V., Nagaraj, S., & Rengasamy, R. (2013). *In vitro* anticancer activity of natural β -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3(2), 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.08.003>
- Khotimchenko, S. V, & Yakovleva, I. M. (2005). Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*, 66(1), 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.10.024>
- Khozin-Goldberg, I., & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67(7), 696-701. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010>
- Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6, 52-63. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Koničková, R., Vaňková, K., Vaníková, J., Vánová, K., Muchová, L., Subhanová, I., Zadinová, M., Zelenka, J., Dvořák, A., Kolář, M., Strnad, H., Rimpeľová, S., Ruml, T., Wong, R. J., & Vitek, L. (2014). Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. *Annals of Hepatology*, 13(2), 273-283. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)30891-9](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)30891-9)
- Kumar, V., Bhatnagar, A. K., & Srivastava, J. N. (2011). Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(32), 7043-7048. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1175>
- Kuriakose, G. C., & Kurup, M. G. (2008). Evaluation of renoprotective effect of *aphanizomenon flos-aquae* on cisplatin-induced renal dysfunction in rats. *Renal Failure*, 30(7), 717-725. <https://doi.org/10.1080/08860220802134730>

- Kuwahara, S. S., Cuello, J. L., Myhre, G., & Pau, S. (2011). Growth of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* under red and blue lasers. *Optics and Lasers Engineering*, 49(3), 434-438. <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2010.11.015>
- Li, Q., Du, W., & Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5), 749-756. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1625-9>
- Li, T., Xu, J., Wu, H., Wang, G., Dai, S., Fan, J., He, H., & Xiang, W. (2016). A saponification method for chlorophyll removal from microalgae biomass as oil feedstock. *Marine Drugs*, 14(9), 162. <https://doi.org/10.3390/md14090162>
- Liang, K., Zhang, Q., Gu, M., & Cong, W. (2013). Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella sp.* *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 311-318. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9865-6>
- Lin, B., Ahmed, F., Du, H., Li, Z., Yan, Y., Huang, Y., Cui, M., Yin, Y., Li, B., Wang, M., Meng, C., & Gao, Z. (2018). Plant growth regulators promote lipid and carotenoid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1549-1561. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1350-9>
- Liu, B., & Zhao, Z. (Kent). (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82(8), 775-780. <https://doi.org/10.1002/jctb.1744>
- Liu, J.G., Hou, C.W., Lee, S.Y., Chuang, Y., & Lin, C.C. (2011). Antioxidant effects and UVB protective activity of *Spirulina (Arthrospira platensis)* products fermented with lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 46(7), 1405-1410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.03.010>
- Liu, J., Qiu, W., & Song, Y. (2016). Stimulatory effect of auxins on the growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*. *Algal Research*, 18, 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.027>
- Liu, X.J., Jiang, Y., & Chen, F. (2005). Fatty acid profile of the edible filamentous cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* at different temperatures and developmental stages in liquid suspension culture. *Process Biochemistry*, 40, 371-377. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.018>
- Mandotra, S. K., Kumar, P., Suseela, M. R., Nayaka, S., & Ramteke, P. W. (2016). Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresource Technology*, 201, 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.042>

- Martínez Sancho, M. E., Jiménez Castillo, J. M., & El Yousfi, F. (1997). Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Process Biochemistry*, 32(8), 657-664. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00017-4)
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Matos, J., Cardoso, C., Bandarra, N. M., & Afonso, C. (2017). Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review. *Food & Function*, 8(8), 2672-2685. <https://doi.org/10.1039/C7FO00409E>
- Mayo, A. W., & Noike, T. (1996). Effects of temperature and pH on the growth of heterotrophic bacteria in waste stabilization ponds. *Water Research*, 30(2), 447-455. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00150-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00150-6)
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energy*, 34(1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.04.014>
- Millán-Oropeza, A., Torres -Bustillos, L. G., & Fernández-Linares, L. (2015). Simultaneous effect of nitrate (NO³⁻) concentration, carbon dioxide (CO₂) supply and nitrogen limitation on biomass, lipids, carbohydrates and proteins accumulation in *Nannochloropsis oculata*. *Biofuel Research Journal*, 2(1), 215-221. <https://doi.org/10.18331/BRJ2015.2.1.8>
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A Review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 7, 546. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>
- Mizuno, Y., Sato, A., Watanabe, K., Hirata, A., Takeshita, T., Ota, S., Sato, N., Zachleder, V., Tsuzuki, M., & Kawano, S. (2013). Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresource Technology*, 129, 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.030>
- Morelli, E., & Scarano, G. (2004). Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Science*, 167(2), 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.001>
- Morowvat, M. H., & Ghasemi, Y. (2016). Rapid determination of lipid accumulation under sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii* microalga

- using fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *International Journal of Pharmacology and Clinical Research*, 8(9), 1356-1360.
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.-G., & Lee, K. (2012). Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*, 123, 279-283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.057>
- Ochoa-Alfaro, A. E., Gaytán-Luna, D. E., González-Ortega, O., Zavala-Arias, K. G., Paz-Maldonado, L. M. T., Rocha-Uribe, A., & Soria-Guerra, R. E. (2019). pH effects on the lipid and fatty acids accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology Progress*, 35(6), e2891. <https://doi.org/10.1002/btpr.2891>
- Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., Aremu, A. O., Okem, A., Lovász, C., Molnár, Z., & van Staden, J. (2016). Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains. *Algal Research*, 16, 141-149.
- Pan, J. M., Haring, M. A., & Beck, C. F. (1997). Characterization of blue light signal transduction chains that control development and maintenance of sexual competence in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 115(3), 1241-1249. <https://doi.org/10.1104/págs.115.3.1241>
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635-648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Rai, M. P., & Gupta, S. (2017). Effect of media composition and light supply on biomass, lipid content and FAME profile for quality biofuel production from *Scenedesmus abundans*. *Energy Conversion and Management*, 141, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.05.018>
- Ras, M., Steyer, J.P., & Bernard, O. (2013). Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12(2), 153-164. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., & Olsen, Y. (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *Journal of Phycology*, 30(6), 972-979. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00972.x>
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobio-

- reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100-112. <https://doi.org/10.1002/bit.22033>
- Roesler, K., Shintani, D., Savage, L., Boddupalli, S., & Ohlrogge, J. (1997). Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-Coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. *Plant Physiology*, 113(1), 75- 81. <https://doi.org/10.1104/págs.113.1.75>
- Ruiz-Domínguez, M. C., Vaquero, I., Obregón, V., de la Morena, B., Vilchez, C., & Vega, J. M. (2015). Lipid accumulation and antioxidant activity in the eukaryotic acidophilic microalga *Coccomyxa* sp. (strain onubensis) under nutrient starvation. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1099-1108. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0403-6>
- Rupprecht, J. (2009). From systems biology to fuel—*Chlamydomonas reinhardtii* as a model for a systems biology approach to improve biohydrogen production. *Journal of Biotechnology*, 142(1), 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.02.008>
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Muylaert, K., & Foubert, I. (2012). Microalgae as an alternative source of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technology*, 24(6), 128-130. <https://doi.org/10.1002/lite.201200197>
- Sabatini, S. E., Juárez, Á. B., Eppis, M. R., Bianchi, L., Luquet, C. M., & Ríos de Molina, M.C. (2009). Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(4), 1200-1206. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.01.003>
- Sakarika, M., y Kornaros, M. (2016). Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. *Bioresource Technology*, 219, 694-701. doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.033
- Sakarika, M., & Kornaros, M. (2017). Kinetics of growth and lipids accumulation in *Chlorella vulgaris* during batch heterotrophic cultivation: Effect of different nutrient limitation strategies. *Bioresource Technology*, 243, 356-365. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.110>
- Salas-Montantes, C. J., González-Ortega, O., Ochoa-Alfaro, A. E., Camarena-Rangel, R., Paz-Maldonado, L. M. T., Rosales-Mendoza, S., Rocha-Uribe, A., & Soria-Guerra, R. E. (2018). Lipid accumulation during nitrogen and sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii* overexpressing a transcription factor. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1721-1733. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1393-6>

- Sato, A., Matsumura, R., Hoshino, N., Tsuzuki, M., & Sato, N. (2014). Responsibility of regulatory gene expression and repressed protein synthesis for triacylglycerol accumulation on sulfur-starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 444. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00444>
- Servel, M.-O., Claire, C., Derrien, A., Coiffard, L., & De Roeck-Holtzhauer, Y. (1994). Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry*, 36(3), 691-693. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89798-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89798-8)
- Shah, S., Sharma, S., & Gupta, M. N. (2003). Enzymatic transesterification for biodiesel production. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 40(6), 392—399. <http://europepmc.org/abstract/MED/22900366>
- Shaker, S., Morowvat, M. H., & Ghasemi, Y. (2017). Effects of sulfur, iron and manganese starvation on growth, β -carotene production and lipid profile of *Dunaliella salina*. *Journal of Young Pharmacists*, 9(1), 107-114. <https://doi.org/10.5530/jyp.2017>
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., & Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532-1553. <https://doi.org/10.3390/en5051532>
- Shen, X.F., Liu, J.J., Chauhan, A. S., Hu, H., Ma, L.L., Lam, P. K. S., & Zeng, R. J. (2016). Combining nitrogen starvation with sufficient phosphorus supply for enhanced biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* fed on acetate. *Algal Research*, 17, 261-267. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.018>
- Singh, P., Rani, B., Chauhan, A. K., & Maheshwari, R. (2012). Lycopene's antioxidant activity in cosmetics meadow. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(1), 46-47.
- Song, D., Fu, J., & Shi, D. (2008). Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24(3), 341-348. [https://doi.org/10.1016/S1872-2075\(08\)60016-3](https://doi.org/10.1016/S1872-2075(08)60016-3)
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Su, G., Jiao, K., Li, Z., Guo, X., Chang, J., Ndikubwimana, T., Sun, Y., Zeng, X., Lu, Y., & Lin, L. (2016). Phosphate limitation promotes unsaturated fatty acids and arachidonic acid biosynthesis by microalgae *Porphyridium purpureum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(7), 1129-1136. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1589-6>

- Takamatsu, S., Hodges, T. W., Rajbhandari, I., Gerwick, W. H., Hamann, M. T., & Nagle, D. G. (2003). Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *Journal of Natural Products*, 66(5), 605-608. <https://doi.org/10.1021/np0204038>
- Takeshita, T. (2011). Competitiveness, role, and impact of microalgal biodiesel in the global energy future. *Applied Energy*, 88(10), 3481-3491. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.02.009>
- Tang, G., & Suter, P. M. (2011). Vitamin A, nutrition, and health values of algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. *Journal of Pharmacy and Nutrition Science*, 1(2), 111-118. <https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/61173/>
- Teo, C. L., Atta, M., Bukhari, A., Taisir, M., Yusuf, A. M., & Idris, A. (2014). Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Biore-source Technology*, 162, 38-44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.113>
- Tominaga, K., Hongo, N., Karato, M., & Yamashita, E. (2012). Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. *Acta Biochimica Polonica*, 59(1), 43-47. https://doi.org/10.18388/abp.2012_2168
- Vahmani, P., Fredeen, A. H., & Glover, K. E. (2013). Effect of supplementation with fish oil or microalgae on fatty acid composition of milk from cows managed in confinement or pasture systems. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6660-6670. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6914>
- Vo, T.S., Ngo, D.H., & Kim, S.K. (2012). Marine algae as a potential pharmaceutical source for anti-allergic therapeutics. *Process Biochemistry*, 47(3), 386-394. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.12.014>
- Wang, H.W., Zhang, B., Hao, Y.J., Huang, J., Tian, A.G., Liao, Y., Zhang, J.S., & Chen, S.Y. (2007). The soybean Dof-type transcription factor genes, GmDof4 and GmDof11, enhance lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Journal*, 52(4), 716-729. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03268.x>
- Weissig, H., & Beck, C. F. (1991). Action spectrum for the light-dependent step in gametic differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 97(1), 118-121. <https://doi.org/10.1104/pags.97.1.118>
- Wijffels, R. H. (2008). Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 26(1), 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.10.002>

- Williams, P. J. le B., & Laurens, L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy Environmental Science*, 3(5), 554-590. <https://doi.org/10.1039/B924978H>
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., & Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. *Archives of Toxicology*, 90(8), 1817-1840. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5>
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* *Bioresource Technology*, 101(14), 5494-5500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>
- Xin, L., Hong-ying, H., & Yu-ping, Z. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, 102(3), 3098-3102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>
- Yamazaki, T., Konosu, E., Takeshita, T., Hirata, A., Ota, S., Kazama, Y., Abe, T., & Kawano, S. (2018). Independent regulation of the lipid and starch synthesis pathways by sulfate metabolites in the green microalga *Parachlorella kessleri* under sulfur starvation conditions. *Algal Research*, 36, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.022>
- Yanagisawa, S. (2002). The Dof family of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 7(12), 555-560. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02362-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02362-2)
- Ying, K., Gilmour, D. J., & Zimmerman, W. B. (2014). Effects of CO₂ and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 6(3), 167-173. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000138>
- Yusuf, N. N. A. N., Kamarudin, S. K., & Yaakub, Z. (2011). Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 52(7), 2741-2751. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.12.004>
- Zhekisheva, M., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I., Zarka, A., & Cohen, Z. (2002). Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal of Phycology*, 38(2), 325-331. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01107.x>